

**Einfluß von neurohumoralen Faktoren und
moderater Hyperglykämie auf das
Kontraktionsverhalten ventrikulärer
Herzmuskelzellen**

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

GOLOZAR SOLTANPOUR

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 2004

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 2004

© 2004 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, WETTENBERG
Printed in Germany



VVB LAUFERSWEILER VERLAG
édition scientifique

GLEIBERGER WEG 4, D-35435 WETTENBERG
Tel: 06406-4413 Fax: 06406-72757
Email: VVB-IPS@T-ONLINE.DE

www.doktorverlag.de

Einfluß von neurohumoralen Faktoren und moderater Hyperglykämie auf das Kontraktionsverhalten ventrikulärer Herzmuskelzellen

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

vorgelegt von

Golozar Soltanpour

aus Shahi (Ghaemshahr)

Gießen, 2003

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

Leiter: Professor Dr. Dr. H. M. Piper

Gutachter: Prof. Dr. Schlüter

Gutachter: Prof. Dr. Voss

Tag der Disputation: 09.07.2004

Inhaltsverzeichnis	1
1. Kapitel: Einleitung	4
1.1. Myokardhypertrophie und Herzinsuffizienz	4
1.2. Katecholamine, Myokardhypertrophie und Herzinsuffizienz	5
1.3. Angiotensin, TGF- β , Myokardhypertrophie und Herzinsuffizienz	7
1.4. Hyperglykämie und Herzinsuffizienz	8
1.5. Methodische Voraussetzungen	9
1.6. Zielsetzung	10
2. Kapitel: Material	11
2.1. Chemikalien	11
2.2. Medien	12
2.3. Puffer	13
2.4. Geräte und Laborbedarf	14
2.4.1. Zellpräparation und Zellkultur	14
2.4.2. System zur Erkennung von Zellgrenzen während der Kontraktion	15
2.4.3. Sonstige Geräte	15
2.4.4. Verbrauchsmaterialien	15
2.4.5. Software	15
3. Kapitel: Methoden	16
3.1. Präparation isolierter Herzmuskelzellen und deren Inkubation	16
3.2. Messung von Myokardzell-Kontraktion im elektrischen Feld	17
3.2.1. Probenvorbereitung	17
3.2.2. Elektrische Stimulation und Steuerung der Myokardzell-Kontraktion	18

3.2.3. Messung der Kontraktionsparameter	19
3.2.4. Messprotokoll	21
3.3. Statistik	22
4. Kapitel: Ergebnisse	23
4.1. Lastfreie Kontraktion isolierter Herzmuskelzellen nach anhaltender <i>Noradrenalin</i> -Exposition	23
4.2. Einfluss anhaltender <i>Noradrenalin</i> -Inkubation auf die β -adrenerg vermittelte maximale Zellverkürzung	24
4.3. Einfluss von Last auf isolierte Herzmuskelzellen nach anhaltender <i>Noradrenalin</i> -Exposition	25
4.4. Lastfreie Kontraktion isolierter Herzmuskelzellen nach anhaltender <i>Isoprenalin</i> -Exposition	26
4.5. Einfluss anhaltender <i>Isoprenalin</i> -Inkubation auf die β -adrenerg vermittelte maximale Zellverkürzung	27
4.6. Einfluss von Last auf isolierte Herzmuskelzellen nach anhaltender <i>Isoprenalin</i> -Exposition	29
4.7. Lastfreie Kontraktion isolierter Herzmuskelzellen nach anhaltender <i>Angiotensin-II</i> -Exposition	30
4.8. Einfluss anhaltender <i>Angiotensin-II</i> -Inkubation auf die β -adrenerg vermittelte maximale Zellverkürzung	32
4.9. Einfluss von Last auf isolierte Herzmuskelzellen nach anhaltender <i>Angiotensin-II</i> -Exposition	33
4.10. Lastfreie Kontraktion isolierter Herzmuskelzellen nach anhaltender <i>TGF-β</i> -Exposition	34
4.11. Einfluss von externer Last auf das Kontraktionsverhalten isolierter Herzmuskelzellen nach anhaltender <i>TGF-β</i> -Exposition	35
4.12. Einfluss chronischer <i>Glukose</i> -Inkubation auf das Kontraktionsverhalten adulter ventrikulärer Herzmuskelzellen unter lastfreien Bedingungen	36
4.13. Einfluss chronischer <i>Glukose</i> -Inkubation auf die maximale β -adrenerge Rezeptorstimulierbarkeit	37

4.14. Einfluss von externer Last auf das Kontraktionsverhalten isolierter Herzmuskelzellen nach anhaltender <i>Glukose</i> -Exposition	38
4.15. Einfluss von externer Last auf das Kontraktionsverhalten isolierter Herzmuskelzellen nach anhaltender <i>Glukose</i> -Exposition unter Hemmung der p38-MAP-Kinase	39
5. Kapitel: Diskussion	41
5.1. Hauptbefunde	41
5.2. Die Rolle der Katecholamine für die Kontraktion der Herzmuskelzellen	42
5.3. Die Rolle des Angiotensin-II für die Kontraktion der Herzmuskelzellen	43
5.4. Die Wirkung des Zytokins TGF- β auf das Kontraktionsverhalten der Herzmuskelzellen	44
5.5. Schlussfolgerung aus den Experimenten zur Myokardhypertrophie und Zellfunktion	45
5.6. Einfluss moderater Hyperglykämie auf das Kontraktionsverhalten der Herzmuskelzellen	46
5.7. Schlussfolgerung	47
6. Kapitel: Zusammenfassung	48
Literaturverzeichnis	50
Danksagung	53

1. Kapitel: Einleitung

1.1. Myokardhypertrophie und Herzinsuffizienz

Die Entstehung einer Myokardhypertrophie auf der Grundlage einer Hypertonie ist ein eigenständiger Risikofaktor, der mit der Entwicklung einer Herzinsuffizienz einhergeht (Levy et al., 1990). Während die Wirkung einer chronischen Druckbelastung auf zellulärer Ebene heute recht gut charakterisiert ist, ist die Auswirkung auf die Zellfunktion weitgehend ungeklärt. Untersuchungen der vergangenen Jahre haben gezeigt, dass eine Myokardhypertrophie zwar durch eine chronische Druckbelastung ausgelöst wird, diese aber primär auf der Wirkung von lokalen oder systemisch erhöhten Freisetzungen von Neurotransmittern, Hormonen oder Zytokinen beruht. Eine solchermaßen sich entwickelnde Myokardhypertrophie lässt sich in drei Phasen einteilen:

- 1.) die Phase der chronischen Druckbelastung, in der Hormone, Neurotransmitter und Zytokine direkt auf die noch nicht hypertrophierten Herzmuskelzellen einwirken. Viele dieser Transmitter und Agonisten sind in der Lage, akut die Zellkontraktion zu verbessern und können somit eine Adaptation an eine erhöhte Nachlast bewerkstelligen.
- 2.) die Phase der chronischen Wirkung der Agonisten auf die Herzmuskelzellen, die charakterisiert ist durch eine hypertrophe Wachstumsphase, einhergehend mit Veränderungen in der intrazellulären Signalweitergabe und einer veränderten Expression von Proteinen. Im Allgemeinen wird diese Phase als adaptiver Prozess aufgefasst, der es der Zelle ermöglicht, auch länger anhaltend einer erhöhten Nachlast kompensatorisch entgegen zu wirken.
- 3.) die Phase, in der die hypertrophierte Herzmuskelzelle dekompenziert, das heißt, nicht mehr in der Lage ist, adäquat auf eine erhöhte Nachlast zu reagieren.

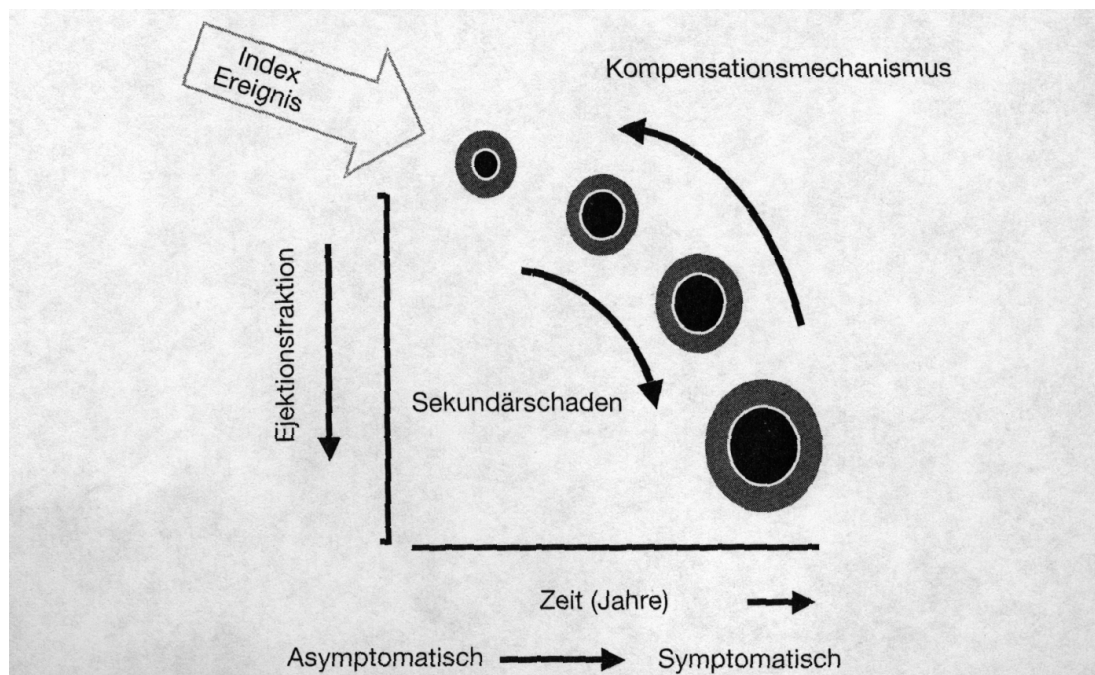


Abb.1: Progression der Herzinsuffizienz durch Aktivierung von neurohumoralen und inflammatorischen Kompensationsmechanismen (modifiziert nach D. L. Mann von Erland Erdmann).

1.2. Katecholamine, Myokardhypertrophie und Herzinsuffizienz

Pharmakologische und gentechnische Untersuchungen auf experimenteller Ebene haben inzwischen gut belegt, dass die primäre Antwort des Myokards auf eine akute Druckerhöhung der Aktivierung α -adrenerger Rezeptoren bedarf. So kann eine druckinduzierte Myokardhypertrophie durch Prazosin, einem Inhibitor der α -adrenergen Rezeptoren, wirksam unterdrückt werden (Morgan et al., 1991). Transgene Mäuse, die entweder myokardial keine Katecholamine mehr bilden können oder denen durch einen genetischen „knock out“ die myokardiale Expression von α_1 -adrenergen Rezeptoren fehlt, können auf eine akute Druckbelastung, durch ein „banding“ der Aorta provoziert, nicht mit einer Hypertrophie reagieren (Cho et al., 1999; O'Connell et al., 2002). Auf zellulärer Ebene lässt sich zeigen, dass eine selektive Stimulation α_{1A} -adrenerger Rezeptoren unter lastfreien Bedingungen über eine Aktivierung der Proteinkinase C, des PI 3-Kinase/Akt-Signaltransduktionsweges und der Aktivierung der transkriptionellen Aktivität und Kapazität innerhalb von 24 Stunden zu einer etwa 20 %-igen Zunahme der Myokardmasse führt (Pöncke et al.,

2001). Herzmuskelzellen, die eine konstitutiv aktivierte Form der Akt myokardial exprimieren, zeigen ebenfalls eine deutliche Myokardhypertrophie aber eine verbesserte Zellfunktion (Shioi et al., 2002). Dies hat zu dem Konzept geführt, die primäre Antwort der Herzmuskelzellen auf eine chronische Druckbelastung, nämlich die Myokardhypertrophie durch Stimulation der α -adrenergen Rezeptoren, als eine adaptive Form der Myokardhypertrophie anzusehen. Allerdings gibt es keine selektiven α -adrenergen Agonisten *in vivo*. Noradrenalin, als primärer Neurotransmitter des sympathischen Nervensystems, das von den transmuralen Nervenendigungen freigesetzt wird, stimuliert immer gleichzeitig die α - und β -adrenergen Rezeptoren.

In einer vorhergehenden Arbeit hat sich gezeigt, dass beide Signaltransduktionswege, nämlich die durch Stimulation der α - oder β -adrenergen Rezeptoren initiierten Signaltransduktionsschritte miteinander interferieren (Schäfer et al., 2001). Außerdem können durch Stimulation der β -adrenergen Rezeptoren auch direkt Auswirkungen auf die Herzmuskelzelle auftreten, die unabhängig von der Zunahme der Proteinsynthese sind. Eine selektive Stimulation der β -adrenergen Rezeptoren führt nämlich nicht zu einer Zunahme der Proteinsynthese (Schlüter et al., 1992).

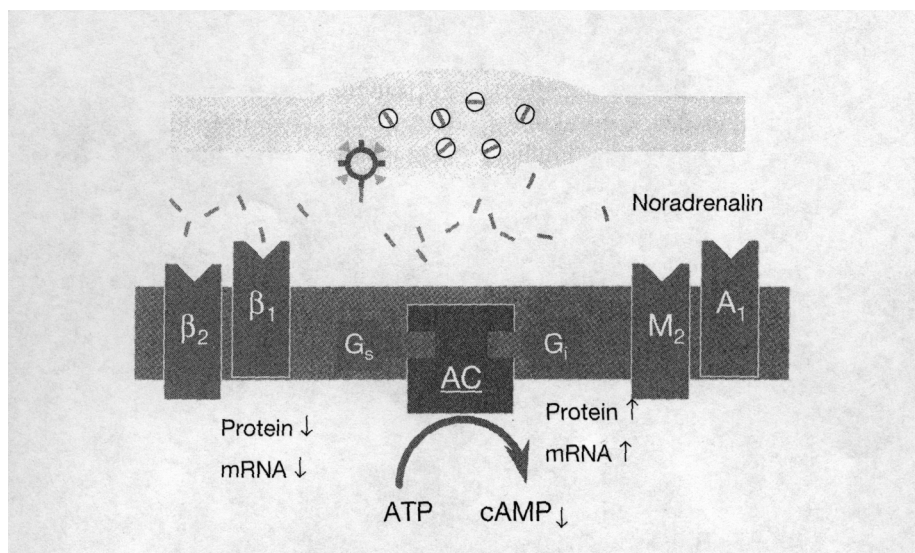


Abb.2: Schematische Darstellung der Veränderungen des β -adrenergen Systems im insuffizienten Myokard. Eine vermehrte Freisetzung von Katecholaminen führt zu einer Herabregulation der β -Adrenorezeptordichte (β_1) und einer vermehrten Expression von inhibitorischen G-Proteinen (G_i) und konsekutiv zu einer verminderten cAMP Bildung.

Aufgrund der ungeklärten Zusammenhänge zwischen Katecholamin-induzierter Hypertrophie und Zellfunktion wurde in der folgenden Arbeit im ersten Abschnitt untersucht, inwieweit eine chronische Exposition der Herzmuskelzellen mit Noradrenalin das Kontraktionsverhalten der Zelle verändert. Dabei wurde die basale Zellfunktion als lastfreie Verkürzung bestimmt, die maximale Ansprechbarkeit auf β -adrenerge Stimulierbarkeit und schließlich das Vermögen, sich gegen eine externe Last zu verkürzen, quantifiziert. Zum Anlegen einer externen Last an isolierten Herzmuskelzellen wurde das Zellkulturmedium durch Zugabe von Methylcellulose hoch viskös gemacht.

1.3. Angiotensin, TGF- β , Myokardhypertrophie und Herzinsuffizienz

Neben der Rekrutierung von Katecholaminen aus den transmuralen Nervenendigungen kommt es zusätzlich zu einer Aktivierung des Renin-Angiotensin-Systems (RAS). Dabei handelt es sich um ein humorales System, bei dem durch Freisetzung von Renin aus den Zellen des juxtaglomerulären Apparates Angiotensin-I aus zirkulierendem Angiotensinogen gebildet wird, welches anschließend durch ACE (Angiotensin-Converting-Enzyme) in Angiotensin-II gespalten wird. Angiotensin-II stellt die aktive Komponente dar. Klinisch betrachtet ist die Hemmung des RAS durch Angiotensin Rezeptorenblocker und durch Hemmung des ACE die wichtigste therapeutische Intervention einer druckinduzierten Myokardhypertrophie (Carr et al., 1996). Überraschenderweise finden sich aber experimentell nur wenig Evidenzen, die für eine direkte Interaktion von Angiotensin-II mit den Herzmuskelzellen im Sinne eines hypertrophen Stimulus sprechen. Erstens zeigen Angiotensinrezeptor-„knock out“-Mäuse unverändert eine Myokardhypertrophie auf eine akute Druckbelastung (Hamawaki et al., 1998) und zweitens führt *in vitro* eine Stimulation der Angiotensinrezeptoren nur zu einer schwachen Steigerung der Proteinsynthese (Ruf et al., 2002). Allerdings kommt es durch Angiotensin-II zu einer markanten Veränderung der Expression von Zytokinen in Herzmuskelzellen, wobei der Steigerung der Expression von TGF- β eine besondere Bedeutung zukommen könnte (Kim et al., 1995). Das Zytokin TGF- β wird in spontan hypertensiven Ratten

mittelfristig als Reaktion auf eine chronische Druckbelastung gebildet, wenn die kompensatorische Form der Myokardhypertrophie in eine dekompensatorische Form übergeht (Boluyt et al., 1994). Diese *in vivo* Befunde zeigen, dass eine Hemmung der Angiotensinrezeptoren die Expressionssteigerung von TGF- β in Herzmuskelzellen verhindert (Kim et al., 1995) und dass eine Hemmung von ACE die Lebensdauer der spontan hypertensiven Ratten deutlich verbessert (Zimmermann et al., 1999). Weiterhin lassen diese Befunde den Schluss zu, dass entweder das Angiotensin-II oder das Zytokin TGF- β für die Entwicklung eines Funktionsverlustes der hypertrophierten Herzmuskelzellen wichtig sind. Deshalb wurde im zweiten Teil der Arbeit der Einfluss einer chronischen Exposition der Herzmuskelzellen für 24 Stunden mit Angiotensin-II oder TGF- β auf das Kontraktionsverhalten der Zellen untersucht.

1.4. Hyperglykämie und Herzinsuffizienz

Zu den häufigsten Komplikationen eines Diabetes mellitus gehören kardiovaskuläre Komplikationen. Vorhergehende Untersuchungen haben gezeigt, dass eine chronische Exposition hoher Glukosekonzentrationen, wie sie als Spitzenwerte im Plasma eines Diabetikers gemessen werden können (30 mmol/l), zu einer Verschlechterung der Relaxation der Herzmuskelzellen führt (Ren et al., 1997). Da sich Diabetes entwickelt, muss in Betracht gezogen werden, dass die Herzmuskelzellen im Anfangsstadium zwar erhöhten, aber moderat erhöhten Konzentrationen an Glukose ausgesetzt sind. Über den Einfluss einer chronischen moderaten Erhöhung der Glukosekonzentration auf das Kontraktionsverhalten von Herzmuskelzellen ist nichts bekannt. Da der Diabetiker häufig aufgrund einer generalisierten Gefäßerkrankung zusätzlich auch einer hypertensiven Belastung ausgesetzt ist, war es von Interesse zu untersuchen, inwieweit sich ein entwickelnder Funktionsverlust unter Hyperglykämie auf zellulärer Ebene darstellen lässt und mit den Charakteristika eines druckinduzierten Funktionsverlustes verglichen werden kann.

Aus diesem Grunde wurde im dritten Abschnitt der experimentellen Arbeit untersucht, welcher Einfluss eine chronisch moderate Hyperglykämie auf die basale Zellfunktion hat, sowie auf die maximale Stimulierbarkeit durch β -adrenerge Rezeptorstimulation und auf eine Erhöhung der Last, gegen die eine Zelle sich kontrahieren muss.

1.5. Methodische Voraussetzungen

In der vorgelegten Arbeit wurde das Kontraktionsverhalten adulter Herzmuskelzellen der Ratte untersucht. Die Zellen wurden dazu über Nacht mit den jeweiligen Agenzien vorinkubiert. Vorausgehende Arbeiten an diesem Modell haben bereits gezeigt, dass es dabei zu keinen signifikanten Veränderungen hinsichtlich der basalen Proteinsyntheserate kommt, dass aber der Zeitraum ausreichend ist, eine maximale Myokardhypertrophie zu induzieren, die sich quantitativ und qualitativ nicht von komplexeren Systemen unterscheidet. Die einzige messbare Veränderung hinsichtlich der basalen Funktion ist eine Beeinträchtigung der Frequenz-Kontraktionsbeziehung, das bedeutet, dass die Zellen im nicht behandelten Zustand eine Abnahme der basalen Zellverkürzung bei Zunahme der Frequenz zeigen. Formell ist dies mit der negativen Frequenz-Kraft-Beziehung des insuffizienten menschlichen Herzens vergleichbar. Allerdings sind die Zellen der Ratte insofern nicht direkt mit humanen Systemen vergleichbar, als dass diese auch basal eine negative Frequenz-Verkürzungsbeziehung im Bereich von 0,5 bis 1 Hz zeigen.

Grundsätzlich gelten also für die hier vorgestellten Untersuchungen speziesbedingte Vorbehalte hinsichtlich einer direkten Übertragbarkeit auf das humane System. Auf der anderen Seite ist das Rattenzellsystem der Herzmuskelzellen das am besten untersuchte Modell und zeigt hinsichtlich der Signaltransduktion und Entwicklung einer Myokardhypertrophie viele Parallelen zu den humanen Systemen, während dies für Mauszellen weit weniger gilt.

Die Untersuchungen an isolierten Herzmuskelzellen erlauben eine Detailanalyse der maximalen Zellkontraktion und der Verkürzungsdynamik. Dies wird durch eine hohe Aufnahmerate von 500 Hz erreicht, so dass die Dynamik der Zellkontraktion sehr

exakt erfasst werden kann. In der vorliegenden Arbeit sind zur Vermeidung individueller Unterschiede in der Präparation, Zellen aus jeweils 2 Herzen gemeinsam isoliert worden. Die Ergebnisse aus mindestens vier verschiedenen Präparationen wurden zusammengefasst, so dass auch hier die zufallsbedingte Variabilität durch die Präparation weitgehend ausgeglichen werden konnte.

1.6. Zielsetzung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, auf zellfunktioneller Ebene den Einfluss von Katecholaminen, Angiotensin-II als aktive Komponente des Renin-Angiotensin-Systems, das lokal gebildete und durch Angiotensin-II induzierten Zytokin TGF- β und eine moderate Hyperglykämie zu untersuchen. Die Untersuchungen sollen Aufschluss darüber geben, in welchem Maße die genannten Mediatorsysteme direkt einen Einfluss auf die Zellfunktion und damit auf die Entstehung einer Herzinsuffizienz haben.

2. Kapitel: Material

2.1. Chemikalien

Angiotensin-II	Sigma, Taufkirchen
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
Carbogen	Messer Griesheim, Krefeld
Cytosin- β -Arabinofuranosid	Sigma, Taufkirchen
Essigsäure	Merck, Darmstadt
FCS	PAA Laboratories, Cölbe
Glukose	Sigma, Taufkirchen
Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt
HEPES	Roche Applied Science, Mannheim
Isoprenalin	Sigma, Taufkirchen
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumhydrogenphosphat	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Kaliumzyanat	Sigma, Taufkirchen
Kollagenase Typ CLSII (332 U/mg)	Biochrom, Berlin
Karnitin	Sigma, Taufkirchen
Kreatin	Sigma, Taufkirchen
Magnesiumsulfat	Merck, Darmstadt
Medium 199 / Earl's Salts	Invitrogen, Eggenstein
Methylcellulose M _D 40.000	Sigma, Taufkirchen
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt
Noradrenalin	Sigma, Taufkirchen

Penicillin-Streptomycin-Lösung	Invitrogen, Eggenstein
Phenolrot	Sigma, Taufkirchen
SB 202190	Calbiochem, Bad Soden
TGF- β_1	Calbiochem, Bad Soden

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

2.2. Medien

Calciumchlorid-Stammlösung:

CaCl ₂	100 mMol/l
-------------------	------------

CCT-Kulturmedium:

M 199-HEPES gepuffert	x ml
Kreatin	5 mMol/l
Karnitin	2 mMol/l
Taurin	5 mMol/l
Streptomycin	100 µg/ml
Penicillin	100 IU/ml
Cytosin- β -Arabinofuranosid	100 µMol/l

M 199-HEPES gepuffert:

Medium 199 / Earl's Salts	9,8 g/l
HEPES	15 mMol/l
pH	7,4

Powell-Medium:

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

Vorinkubationsmedium:

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

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

2.3. Puffer*Kollagenasepuffer:*

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

PBS-Puffer:

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

Rezirkulationspuffer:

Powell-Medium	40 ml
Kollagenase	30 mg

TBS-Puffer:

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

Zellkontraktionspuffer-Stammlösung:

NaCl	125 mMol/l
KH ₂ PO ₄	1,2 mMol/l
KCl	2,6 mMol/l
MgSO ₄	1,2 mMol/l
CaCl ₂	1,0 mMol/l
Glukose	10 mMol/l
HEPES	10 mMol/l
pH	7,4

Zellkontraktionspuffer-Gebrauchslösung:

Zellkontraktions-Stammlösung	100 ml
Adenosin-Desaminase	20 µl

2.4. Geräte und Laborbedarf

2.4.1. Zellpräparation und Zellkultur:

Präparationsbesteck	Aeskulap, Heidelberg
Langendorff-Apparatur	Eigenbau des Physiologischen Institutes
Gewebehacker	Harvard Scientific, Holliston, MA, USA
Nylonnetz	NeoLab, Heidelberg
Sterilbank	Kendro, Hanau

Brutschrank	Kendro, Hanau
Mikroskop	TMS-F von Nikon, Japan

2.4.2. System zur Erkennung von Zellgrenzen während der Kontraktion:

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

2.4.3. Sonstige Geräte:

Glasgeräte	Schott, Mainz
Heizrührer	Jahnke & Kunkel, Staufen
pH-Meter	WTW, Weilheim
Pipetten	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
Wasserbad	Julabo, Seelbach
Wasserdemineralisierungsanlage	Millipore, Eschborn

2.4.4. Verbrauchsmaterialien:

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

2.4.5. Software:

Excel	Microsoft
MUCEL	Scientific Instruments GmbH, Heidelberg
SPSS	SAS Software-Version 6.11

3. Kapitel: Methoden

3.1. Präparation isolierter Herzmuskelzellen und deren Inkubation

Zu Beginn der Präparation von Ca^{++} -toleranten Herzmuskelzellen wurde eine Langendorff-Apparatur zunächst mit Krebs-Ringer-Bikarbonatpuffer (KRB-Puffer) gespült und danach mit dem gleichen Puffer luftblasenfrei gefüllt. Während der gesamten Herzzellisolierung wurde die Perfusionslösung weiter mit Carbogen begast.

Zur Isolierung von ventrikulären Myokardzellen wurden ca. 12 Wochen alte, 300-350g schwere, männliche Wistar-Ratten aus dem Tierstall des Physiologischen Instituts, Justus-Liebig-Universität Giessen, mit Diethylether narkotisiert und thorakotomiert. Die Herzen wurden mit eiskalter 0,15 M NaCl-Lösung stillgestellt und oberhalb des Aortenbogens abgetrennt, danach die Lungenflügel entfernt und die Aorta freipräpariert. Bei langsam laufender Perfusion mit dem KRB-Puffer (ca. 30 Tropfen/min) wurden die Herzen mit der freipräparierten Aorta an die Langendorff-Apparatur angehängt und mit 40 ml pro Herz blutfrei perfundiert. Anschließend wurde für 30 min mit Kollagenasepuffer (2-3 ml/min) rezirkulierend perfundiert. Nach Beendigung der Perfusion wurden die Vorhöfe entfernt, und das Ventrikelgewebe mit einem Gewebehacker (Tissue Chopper 1086, Bachofer, Reutlingen) bei einer Schnittbreite von 0,7 mm mechanisch zerkleinert. Im Kollagenasepuffer mit 1% Albumin wurde das Gewebe während eines 15-20-minütigen wiederholten Ansaugens mit einer 10 ml-Pipette weiter aufgetrennt.

Die so gewonnene Zellsuspension wurde bei Raumtemperatur durch ein Nylonnetz mit 200 μm Porengröße filtriert, um Bindegewebsstücke abzutrennen. Das Filtrat wurde für 3 min bei 400 Upm zentrifugiert (Digifuge GL, Heraeus-Christ, Osterode/Harz), um Zelltrümmer und kleinere Zellen, wie z. B. Endothelzellen, von intakten Myozyten zu trennen. Das Sediment wurde im KRB-Puffer + 0,2 mM CaCl_2 resuspendiert und erneut bei 400 Upm für 3 min zentrifugiert. Intakte Ca^{++} -tolerante Myozyten wurden durch Sedimentation durch ein Medium hoher Dichte aufkonzentriert. Hierfür wurden vier hohe Reagenzgläser bis zur Hälfte mit dem KRB-Puffer + 4% Albumin + 1 mM CaCl_2 gefüllt und die Zellsuspension mit einer

gebogenen Pasteurpipette vorsichtig überschichtet. Zur beschleunigten Sedimentation wurden diese Reagenzgläser bei 300 Upm für 30 Sekunden zentrifugiert (Sigma 4K-1; Sigma, Taufkirchen). Dabei wanderten Aggregate aus vorwiegend intakten Zellen auf den Boden der Reagenzgläser und bildeten dort ein lockeres Sediment. Das zu ca. 80% aus intakten stabförmigen Zellen bestehende Sediment wurde für die Kurzzeitkultur in modifiziertem Kulturmedium 199 (CCT-Medium) resuspendiert.

35 mm-Gewebekulturschalen (Falcon Nr. 3004) wurden am Vorabend mit 1,0-1,5 ml modifiziertem Kulturmedium 199 [CCT plus 4 % (v/v) FCS] beschichtet und über Nacht bei 37°C im Brutschrank (Cytoperm, Heraeus, Osterode/Harz) vorinkubiert. Diese 15 bis 20-stündige Vorinkubation der Kulturschalen war für eine effektive Anheftung der Zellen nach der Präparation notwendig. Unmittelbar vor dem Ausplattieren der im Kulturmedium resuspendierten isolierten Zellen, wurde das alte Inkubationsmedium von den Kulturschalen abgesaugt. Pro 35 mm-Schale wurden dann jeweils 1 ml der Zellsuspension ausplattiert und für 2 Stunden im Brutschrank inkubiert. Diese Kurzzeitkultur im CCT-Medium bewirkte eine energetische Erholung der Zellen nach der Präparation. Während der 2-stündigen Kurzzeitkultur werden die intakten Myozyten zusätzlich aufgereinigt. Im Gegensatz zu den geschädigten und lysierten Zellen sedimentieren die stäbchenförmigen, intakten Myozyten und heften sich am Boden der vorinkubierten Plastik-Kulturschale an. Die runden und isolierten Zellen flotierten im überstehenden Medium und konnten somit zu Versuchsbeginn abgesaugt werden. Nach dem Waschen der Zellen wurden diese über Nacht mit unterschiedlichen Reagenzien inkubiert (siehe Versuchsprotokolle im Ergebnisteil).

3.2. Messung von Myokardzell-Kontraktionen im elektrischen Feld

3.2.1. Probenvorbereitung

Bei der Messung von Myokardzell-Kontraktionen wurde mit Übernachtskulturen von isolierten Kardiomyozyten gearbeitet. Nach einer Inkubationszeit von 20 Stunden (mit unterschiedlichen Reagenzien, siehe unter Kapitel 4) wurden bei den Myozyten die Kontraktionsparameter entweder ohne weitere Zugabe von Reagenzien oder unter

Zugabe von Isoprenalin zur Stimulation der β -adrenergen Rezeptoren oder unter Anlegen einer äußeren Last durch Kontraktion in hoch viskösem Medium gemessen.

3.2.2. Elektrische Stimulation und Steuerung der Myokardzell-Kontraktion

Die Kulturschale wurde auf den Objektisch eines Mikroskops gestellt und mit einem speziellen Deckel verschlossen. In diesen Deckel waren vier Löcher gebohrt worden, die so angeordnet waren, dass sie annähernd die Eckpunkte des Quadrats bildeten, welches den Kreis des Deckels maximal ausfüllt. Der Draht, der später an die Kathode des Elektrostimulators angeschlossen wurde, war durch eines dieser Löcher in das Innere des Deckels geführt worden, so dass er in das Medium in der Kulturschale eintauchen konnte. Durch ein benachbartes Loch wurde dieser wieder nach außen geführt. Dabei war er so gebogen, dass er annähernd senkrecht in das Medium eintauchte, dann abknickte und horizontal durch das Medium verlief, darauf wieder abknickte und senkrecht das Medium verließ. Mit dem Draht, der später an die Anode angeschlossen wurde, verfuhr man auf die gleiche Weise. In der mit diesem Deckel geschlossenen Kulturschale lagen sich also zwei horizontal verlaufende Drähte gegenüber, die beide in den Puffer eintauchen. Die beiden Drähte stellten Kathode und Anode in der Schale dar. Wurden sie an den Stimulator angeschlossen, baute sich zwischen ihnen ein elektrisches Feld auf, das aufgrund der Form des Drahtes einem homogenen Feld angenähert war und so zu einem relativ gleichmäßigen Stromfluss durch die Zellen zwischen den beiden Drähten führte.

Die Zellen wurden mit biphasischen Stromstößen, die von zwei 60 Volt starken entgegengesetzten Rechteckspannungen ausgelöst wurden und jeweils 0,5 Millisekunden dauerten, zur Kontraktion stimuliert. Zeitweise auftretende Spontankontraktionen in unregelmäßiger Frequenz wurden durch die Stimulation vereinheitlicht, indem der Stimulator ihnen seine Stromstossfrequenz als Kontraktionsfrequenz aufzwang. Zellen, welche die vorgegebene Frequenz nicht annahmen, wurden in den Experimenten nicht berücksichtigt. Man konnte nun den Myokardzellen verschiedene Frequenzen vorgeben, indem man die Stimulationsfrequenz änderte.

3.2.3. Messung der Kontraktionsparameter

Die Kontraktionsparameter wurden mit einer Geräteanordnung der Firma Scientific Instruments GmbH aus Heidelberg erfasst. Während der Stimulation der Zellen befand sich die Kulturschale auf dem Objektisch eines Mikroskops. Durch das Mikroskop war es möglich, die Zellen bei ihren Kontraktionen zu beobachten.

An das Mikroskop waren zwei Kameras angeschlossen. Die eine Kamera war eine Videokamera zur Beobachtung des Okularbildes auf einem Monitor. Bei der anderen handelte es sich um eine Zeilenkamera, die in der Lage war, Zellgrenzen zu erkennen, da sie verschiedene Helligkeiten wahrnehmen konnte, so auch den Hell-Dunkel-bzw. Dunkel-Hell-Übergang an der Grenze zwischen Zelle und Hintergrund. Um nun eine Kontraktion mit der Zeilenkamera beobachten zu können, musste man die Zeilenkamera so positionieren, dass beide Zellenden im Bild der eindimensionalen Zeile lagen. Dazu bewegte man die Kulturschale so, dass sich die zu untersuchende Zelle genau in der Mitte des Okularbildes befand, und drehte dann die Zeilenkamera, bis man am Videobild sehen konnte, dass sich beide Zellenden im Erfassungsbereich der Zeilenkamera befanden.

Das in elektrische Signale umgewandelte Bild der Zeilenkamera wurde nicht auf einem Monitor, sondern über das Interface auf einem Oszillographen dargestellt. Die Ablenkzeit war auf dem Horizontalverstärker fest auf 0,1 ms/cm eingestellt, der Vertikalverstärker war auf 5V/div geregelt. Für die Bilddarstellung wurde er intern getriggert, so dass man ein stehendes Bild erhielt. Wenn nun die Zeilenkamera verschiedene Helligkeiten wahrnahm, wurden diese auf dem Oszillographen als verschieden starke y-Auslenkungen dargestellt. Diejenigen Amplituden, welche die Zellgrenzen darstellten, konnten an ihrer horizontalen Bewegung identifiziert werden. Es war also möglich, die Zellkontraktion auf dem Oszillographen zu beobachten.

Der Oszillograph wurde als Zwei-Kanaloszillograph betrieben. Am zweiten Kanal lag eine feste Spannung des Interface an. Wurde sie abgelesen, stellte sie sich als eine weitere horizontale Linie einer bestimmten Höhe auf dem Bildschirm des Oszillographen dar. Wurde sie nicht abgelesen, zeigte der Oszillograph eine horizontale Linie in der Höhe Null.

Diese zweite Spannung wurde extern über das Interface getriggert, und zwar auf folgende Weise: Man setzte einen Triggermarker des Interface, der ebenfalls vom Interface auf dem Oszillograph durch eine Amplitude sichtbar gemacht wurde, vor eine Amplitude des Zellbildes. Erreichte nun die ansteigende Spannung des Zellbildes (sichtbar gemacht durch den Anstieg der Amplitude des Zellbildes) den Wert, der durch den Triggermarker vorgegeben wurde (sichtbar gemacht durch die Amplitude des Triggermarkers), so begann der Oszillograph, die Interface-Spannung am zweiten Kanal aufzuzeichnen. Am Bildschirm des Oszillographen sah man an dieser Stelle im Bild des zweiten Kanals einen Sprung der Horizontalen aus der Null-Position in die Höhe. Veränderte nun die Amplitude des Zellbildes im Zuge der Kontraktion ihre Position, so veränderte sich auch die Position, an welcher der Trigger-Wert erreicht wurde. Damit veränderte sich ebenso die Stelle, an der die Horizontale nach oben sprang. Im bewegten Bild sah man, wie sich die obere Horizontale an ihrer Kante vor und zurück bewegte. Man konnte also die Zelllänge und die Zellkontraktion an dieser Zellkante anhand der Horizontalen beobachten. An der anderen Zellkante verfuhr man analog.

Die Information Interface Spannung an bzw. Interface-Spannung aus wurde vom Oszillograph an das Interface weitergegeben, welches sie wiederum an einen Computer weiterleitete.

Auf diesem PC lief das Programm Mucell der Firma Scientific Instruments GmbH. Dieses Programm registrierte aus der Information - Spannung an bzw. Spannung aus - die Länge der Zelle zu einem bestimmten Zeitpunkt. Anhand der Zelllängen zu verschiedenen Zeitpunkten erstellte das Programm einen Graphen, der die Zelllänge in Abhängigkeit der Zeit darstellte, also eine Kurve welche die Kontraktion der Zelle darstellte. Der Computer erkannte an der jeweils einsetzenden Längenverkürzung den Beginn einer Kontraktion. Er nahm 5 Kontraktionen auf und ermittelte folgende Werte als Mittelwerte aus den jeweiligen 5 Einzelmessungen:

1. Die maximale Zelllänge (diastolische Zelllänge) in Mikrometern
2. Die minimale Zelllänge (systolische Zelllänge) in Mikrometern
3. Die Zeit vom Beginn der Kontraktion bis zur maximalen Kontraktion („Time-to-Peak“) in Millisekunden
4. Die maximale Kontraktionsgeschwindigkeit in Mikrometern pro Sekunde (bestimmt aus der ersten Ableitung der Kontraktionskurve)

5. Die maximale Relaxationsgeschwindigkeit in Mikrometern pro Sekunde
6. Die Zeit von der 10%-igen Zellkontraktion bis zur vollständigen Zellkontraktion in Millisekunden („T10-to-Peak“)
7. Die Zeit von der maximalen Kontraktion bis zur Relaxation um 90% der Zellverkürzungsstrecke („R90-Wert“)

Aus diesen Parametern wurden noch drei weitere Parameter errechnet:

1. Der Quotient $\frac{\Delta L}{L}$: Man bildete die Differenz aus diastolischer und systolischer Zelllänge (ΔL). In Prozent ausgedrückt zeigt die $\Delta L/L$ an, um wieviel Prozent ihrer diastolischen Länge sich die Zelle während der Kontraktion verkürzt.
2. Die Con_{max} als Ratenkonstante für maximale Kontraktionsgeschwindigkeit: Die maximale Kontraktionsgeschwindigkeit wird als erste zeitliche Ableitung der Zellverkürzung bestimmt und in $\mu m/s$ angegeben.
3. Die Rel_{max} als Ratenkonstante für die maximale Relaxationsgeschwindigkeit wird als erste zeitliche Ableitung der Relaxation bestimmt und in $\mu m/s$ angegeben.

3.2.4. Messprotokoll

Jede Zelle wurde auf die oben beschriebene Weise bei einer Frequenz von 1 Hz viermal ausgemessen, wobei zwischen zwei Messungen jeweils 15 Sekunden verstrichen. Die so erhaltenen vier Mittelwerte der Kontraktionsparameter wurden in das Programm Excel übertragen und weiter verarbeitet: Aus diesen jeweiligen ersten vier Mittelwerten wurden Mittelwert, Standardabweichungen und Median bestimmt. Danach änderte man die Frequenz und maß die Zelle noch einmal bei 0,5 Hz und bei 2 Hz aus.

3.3. Statistik

Die Einzelzellkontraktionen wurden jeweils aus verschiedenen Präparationen zusammengefasst und der Mittelwert aus diesen bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler. Bei Vergleichen zwischen zwei Gruppen wurde ein konventioneller T-Test herangezogen. Wurden mehr als zwei Gruppen in einem Experiment verglichen, wurde zunächst eine Varianzanalyse durchgeführt (ANOVA) und anschließend ein Student-Neumann-Keuls-Test als post hoc Test verwendet. Daten mit $p < 0,05$ wurden als voneinander statistisch signifikant bezeichnet.

4. Kapitel: Ergebnisse

4.1. Lastfreie Kontraktion isolierter Herzmuskelzellen nach anhaltender Noradrenalin- Exposition

Um den Einfluss einer chronischen Stimulation adrenerger Rezeptoren auf deren Kontraktionsverhalten zu untersuchen, wurden adulte ventrikuläre Herzmuskelzellen der Ratte für 20 Stunden in Gegenwart von Noradrenalin ($1 \mu\text{mol/l}$) inkubiert. Danach wurde die Kontraktion der Herzmuskelzellen unter elektrischer Stimulation in unmodifiziertem Zellkulturmedium untersucht. Dies entspricht einer nominell weitgehend lastfreien Verkürzung. Als Grad für die Kontraktion der Zelle wurden deren prozentuale Verkürzung relativ zur diastolischen Zelllänge, die maximale Kontraktionsgeschwindigkeit und die maximale Relaxationsgeschwindigkeit berechnet. Die Zellen wurden mit unterschiedlichen Frequenzen im Bereich von 0,5 bis 2,0 Hz stimuliert, wobei eine Frequenz von 0,5 Hz für die Ratte unphysiologisch niedrig ist, aber der Zelle eine starke Verkürzung erlaubt. Im Bereich von 1,0 bis 2,0 Hz findet sich an frisch isolierten Herzmuskelzellen eine positive Verkürzungs-Frequenz-Beziehung, wie sie als Frequenzinotropie beschrieben wird. Die Herzmuskelzellen wiesen nach Inkubation über Nacht keine positive Frequenz-Verkürzungs-Beziehung mehr auf (Abb. 3A). Allerdings behielten Herzmuskelzellen, die mit Noradrenalin inkubiert worden waren, eine positive Frequenz-Verkürzungsbeziehung im Bereich von 1-2 Hz (Abb. 3A). Dabei relaxierten diese Zellen im gesamten Frequenzbereich deutlich schneller (Abb. 3B) und zeigten bei höheren Frequenzen auch eine signifikant schnellere Verkürzung (Abb. 3C).

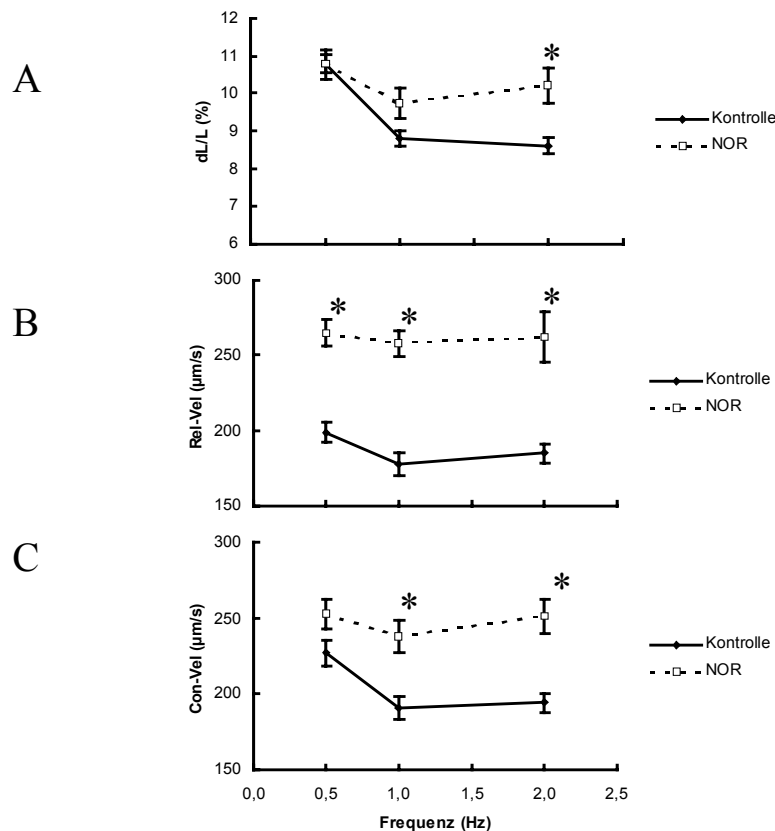


Abb. 3: Einfluss von Noradrenalin-Inkubation über Nacht auf das Kontraktionsverhalten adulter ventrikulärer Herzmuskelzellen der Ratte. Isolierte Herzmuskelzellen wurden über Nacht in Kulturmedium (Kontrolle, n=78) oder in Kulturmedium mit Noradrenalin (NOR, 1 µmol/l, n=40) inkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler für die relative Zellverkürzung (A), die Relaxationsgeschwindigkeit (B) und die Verkürzungsgeschwindigkeit (C). *, p<0,05 vs. Kontrolle.

4.2. Einfluss anhaltender Noradrenalin-Inkubation auf die β -adrenerg vermittelte maximale Zellverkürzung

Um die maximale β -adrenerge Stimulierbarkeit der Herzmuskelzellen nach anhaltender Exposition mit Noradrenalin zu bestimmen, wurden die Zellen, wie unter 4.1. beschrieben, mit Noradrenalin inkubiert und am darauffolgenden Tag unter lastfreien Bedingungen erneut elektrisch stimuliert. Im Unterschied zu der unter 4.1. beschriebenen Versuchsserie erfolgte die Stimulationen jetzt in Gegenwart von 100 nmol/l Isoprenalin. Isoprenalin war an Kontrollzellen in der Lage, im gesamten Frequenzbereich die relative Zellverkürzung (Abb. 4A), die Relaxationsgeschwindigkeit (Abb. 4B) und die Kontraktionsgeschwindigkeit (Abb. 4C) zu steigern. Im Unterschied dazu ließen sich die genannten Parameter in keinem Fall steigern, wenn die Zellen vor Versuchsbeginn 20 Stunden mit Noradrenalin inkubiert worden waren (Abb. 4A-C).

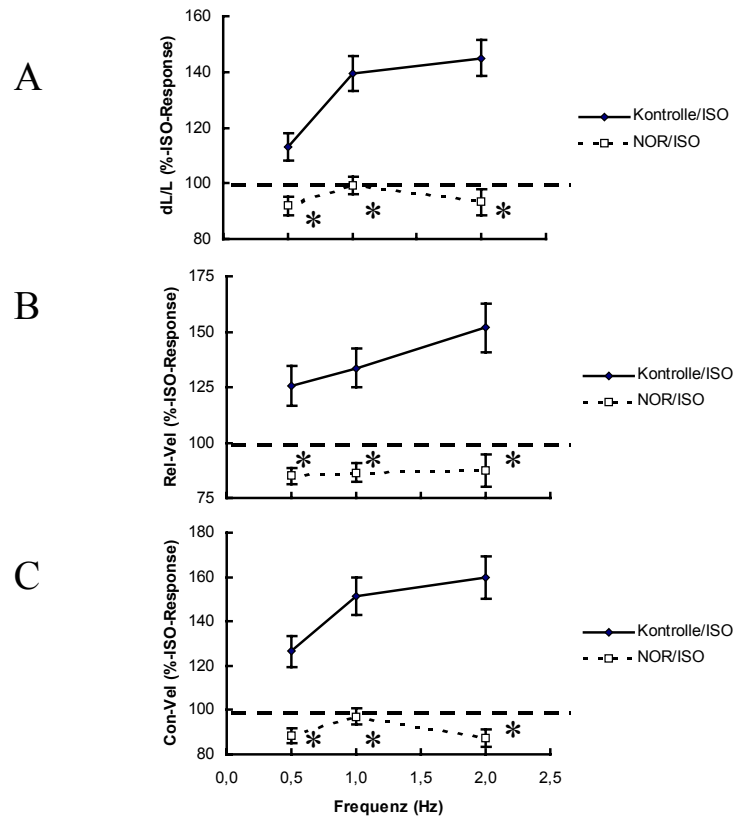


Abb. 4: Einfluss von Noradrenalin-Inkubation über Nacht auf die Isoprenalin-induzierbare Kontraktionssteigerung adulter ventrikulärer Herzmuskelzellen der Ratte. Isolierte Herzmuskelzellen wurden über Nacht in Kulturmedium (Kontrolle, n=55) oder in Kulturmedium mit Noradrenalin (NOR, 1 μ mol/l, n=36) inkubiert. Die elektrische Stimulation erfolgte in Gegenwart von Isoprenalin (ISO, 100 nmol/l). Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler für die relative Zellverkürzung (A), die Relaxationsgeschwindigkeit (B) und die Verkürzungsgeschwindigkeit (C). *, $p < 0,05$ vs. Kontrolle.

4.3. Einfluss von Last auf isolierte Herzmuskelzellen nach anhaltender Noradrenalin-Exposition

Um den Einfluß einer externen Last auf die Kontraktion der Herzmuskelzellen nach anhaltender Exposition mit Noradrenalin zu beurteilen, wurden die Zellen, wie unter 4.1. beschrieben, mit Noradrenalin inkubiert und am darauffolgenden Tag in viskösem Medium (nominell 400 cP durch Zugabe von Methylcellulose) erneut elektrisch stimuliert. Dies imitiert eine externe Lasterhöhung, wie sie im Gesamtorgan sich als erhöhte Nachlast äußert. Dabei zeigten Kontrollzellen im gesamten Frequenzbereich eine stärkere Zellverkürzung als Herzmuskelzellen, die mit Noradrenalin inkubiert wurden (Abb. 5A). Es zeigten sich keine Unterschiede in der Relaxationsgeschwindigkeit (Abb. 5B), jedoch wiesen die mit Noradrenalin

behandelten Zellen bei einer Frequenz von 1 Hz eine signifikant geringere Kontraktionsgeschwindigkeit auf (Abb. 5C).

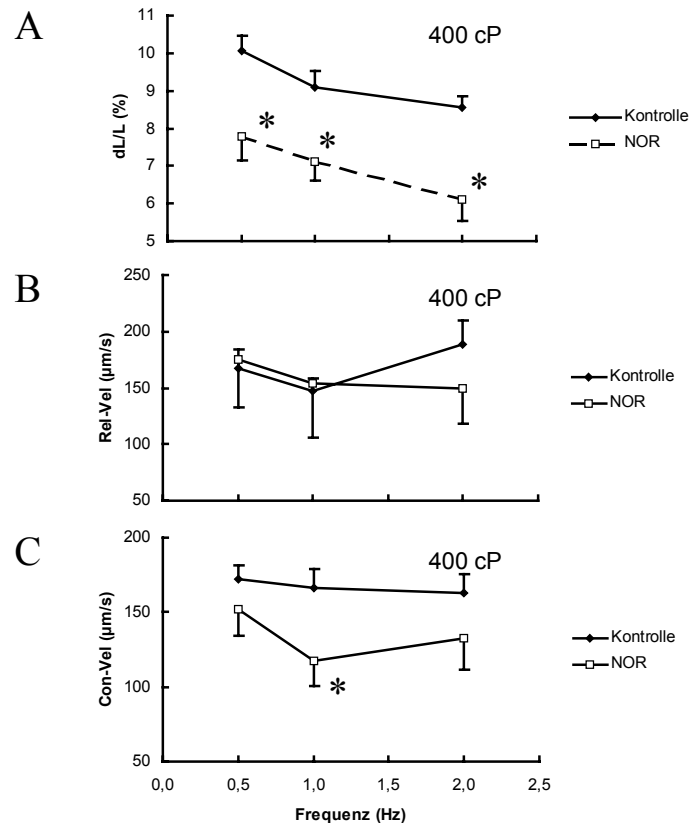


Abb. 5: Einfluss von Noradrenalin-Inkubation über Nacht auf das Kontraktionsverhalten adulter ventrikulärer Herzmuskelzellen der Ratte in viskösem Medium (400 cP). Isolierte Herzmuskelzellen wurden über Nacht in Kulturmedium (Kontrolle, n=33) oder in Kulturmedium plus Noradrenalin (NOR, 1 $\mu\text{mol/l}$, n=10) inkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler für die relative Zellverkürzung (A), die Relaxationsgeschwindigkeit (B) und die Verkürzungsgeschwindigkeit (C). *, $p < 0,05$ vs. Kontrolle.

4.4. Lastfreie Kontraktion isolierter Herzmuskelzellen nach anhaltender Isoprenalin- Exposition

Um den Einfluss einer alleinigen chronischen Stimulation β -adrenerger Rezeptoren auf deren Kontraktionsverhalten zu untersuchen, wurden adulte ventrikuläre Herzmuskelzellen der Ratte für 20 Stunden in Gegenwart von Isoprenalin (1 $\mu\text{mol/l}$) inkubiert. Danach wurde die Kontraktion der Herzmuskellen unter elektrischer Stimulation in unmodifiziertem Zellkulturmedium untersucht, also wieder zunächst als nominell weitgehend lastfreie Verkürzung. Als Grad für die Kontraktion der Zelle

wurde wieder deren prozentuale Verkürzung relativ zur diastolischen Zelllänge, die Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit berechnet. Die Herzmuskelzellen zeigten nach Inkubation mit Isoprenalin erneut eine stärkere Verkürzung bei 1 und 2 Hz als die Kontrollzellen (Abb. 6A). Dabei zeigten diese Zellen im gesamten Frequenzbereich eine deutlich schnellere Relaxation (Abb. 6B) und bei höheren Frequenzen auch eine signifikant schnellere Verkürzung (Abb. 6C).

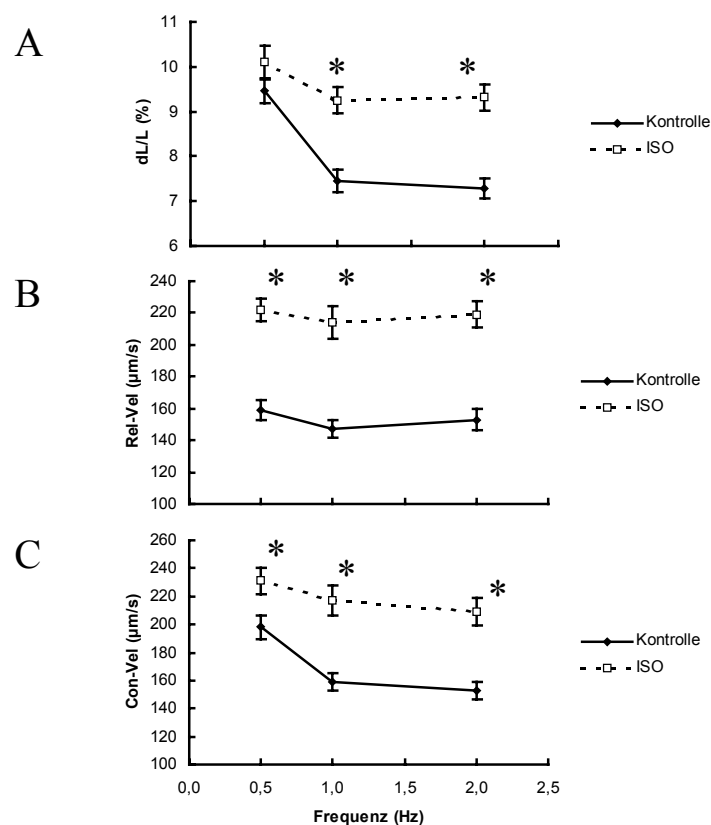


Abb. 6: Einfluss von Isoprenalin-Inkubation über Nacht auf das Kontraktionsverhalten adulter ventrikulärer Herzmuskelzellen der Ratte. Isolierte Herzmuskelzellen wurden über Nacht in Kulturmedium (Kontrolle, n=78) oder in Kulturmedium mit Isoprenalin (ISO, 1 µmol/l, n=40) inkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler für die relative Zellverkürzung (A), die Relaxationsgeschwindigkeit (B) und die Verkürzungsgeschwindigkeit (C). *, p < 0,05 vs. Kontrolle.

4.5. Einfluss anhaltender Isoprenalin-Inkubation auf die β -adrenerg vermittelte maximale Zellverkürzung

Um die maximale β -adrenerge Stimulierbarkeit der Herzmuskelzellen nach anhaltender Exposition mit Isoprenalin zu bestimmen, wurden die Zellen, wie unter 4.1. beschrieben, mit Isoprenalin inkubiert und am darauffolgenden Tag unter

lastfreien Bedingungen erneut elektrisch stimuliert. Im Unterschied zu der unter 4.1. beschriebenen Versuchsserie wurden die Stimulationen jetzt in Gegenwart von 100 nmol/l Isoprenalin durchgeführt. Isoprenalin war an Kontrollzellen in der Lage, im gesamten Frequenzbereich die relative Zellverkürzung (Abb. 7A), die Relaxationsgeschwindigkeit (Abb. 7B) und die Kontraktionsgeschwindigkeit (Abb. 7C) zu steigern. Im Unterschied dazu ließen sich die genannten Parameter in keinem Fall steigern, wenn die Zellen vor Versuchsbeginn 20 Stunden mit Isoprenalin inkubiert worden waren (Abb. 7A-C).

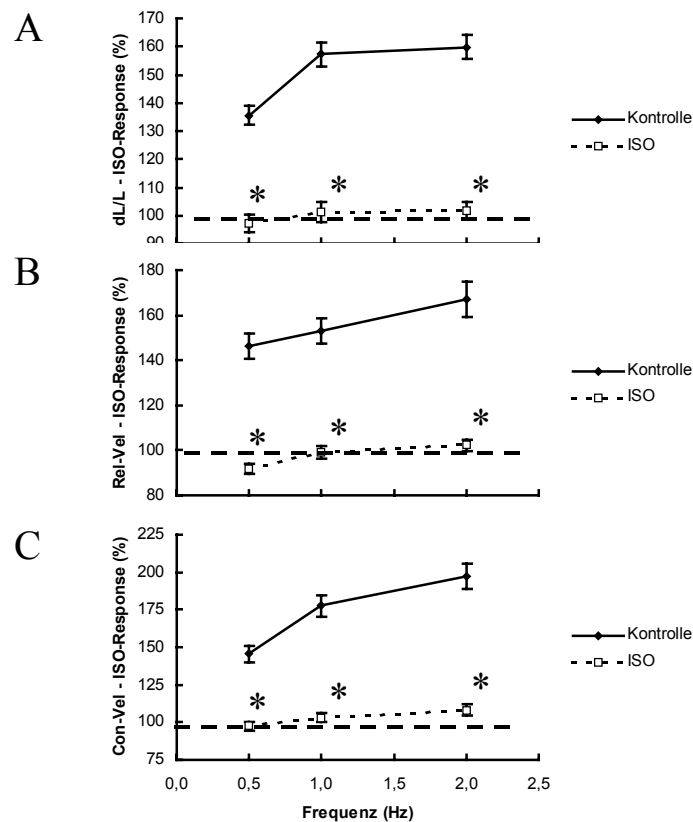


Abb. 7: Einfluss von Isoprenalin-Inkubation über Nacht auf die Isoprenalin-induzierbare Kontraktionssteigerung adulter ventrikulärer Herzmuskelzellen der Ratte. Isolierte Herzmuskelzellen wurden über Nacht in Kulturmedium (Kontrolle, n=55) oder in Kulturmedium plus Isoprenalin (ISO, 1 μ mol/l, n=36) inkubiert. Die elektrische Stimulation erfolgte in Gegenwart von Isoprenalin (100 nmol/l). Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler für die relative Zellverkürzung (A), die Relaxationsgeschwindigkeit (B) und die Verkürzungsgeschwindigkeit (C). *, $p < 0,05$ vs. Kontrolle.

4.6. Einfluss von Last auf isolierte Herzmuskelzellen nach anhaltender Isoprenalin-Exposition

Um den Einfluß einer externen Last auf die Kontraktion der Herzmuskelzellen nach anhaltender Exposition mit Isoprenalin zu beurteilen, wurden die Zellen, wie unter 4.1. beschrieben, mit Isoprenalin inkubiert und am darauf folgenden Tag wieder in viskösem Medium mit 400 cP elektrisch stimuliert. Dabei zeigten Kontrollzellen im gesamten Frequenzbereich eine bessere Zellverkürzung als die mit Isoprenalin inkubierten Zellen (Abb. 8A). Allerdings wiesen Herzmuskelzellen, die mit Isoprenalin inkubiert wurden, kaum Unterschiede in der Relaxationsgeschwindigkeit (Abb. 8B), aber eine signifikant langsamere maximale Kontraktionsgeschwindigkeit im gesamten Frequenzbereich auf (Abb. 8C).

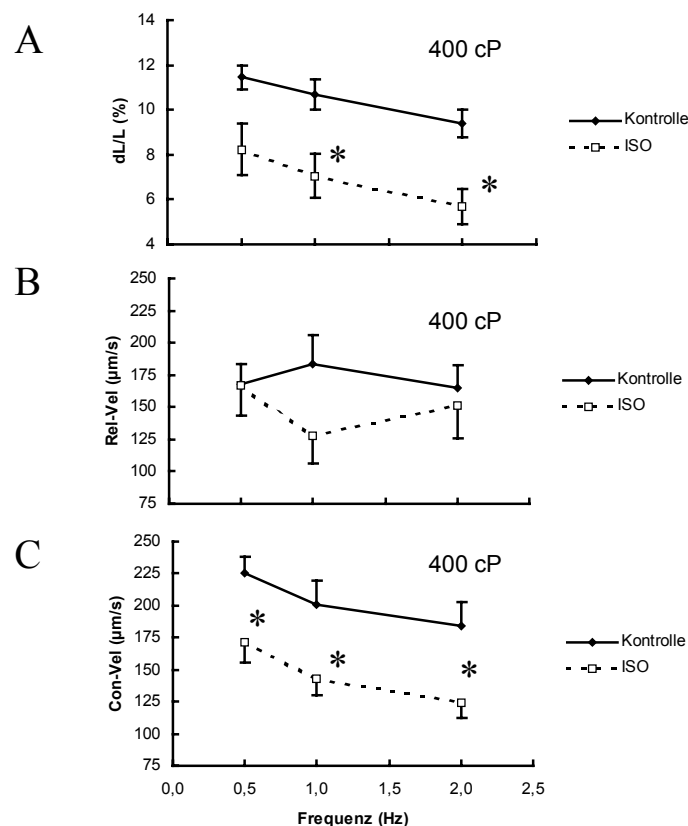


Abb.8: Einfluss von Isoprenalin-Inkubation über Nacht auf das Kontraktionsverhalten adulter ventrikulärer Herzmuskelzellen der Ratte in viskösem Medium (400 cP). Isolierte Herzmuskelzellen wurden über Nacht in Kulturmedium (Kontrolle, n=17) oder in Kulturmedium plus Isoprenalin (ISO, 1 µmol/l, n=6) inkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler für die relative Zellverkürzung (A), die Relaxationsgeschwindigkeit (B) und die Verkürzungsgeschwindigkeit (C). *, p< 0,05 vs. Kontrolle.

4.7. Lastfreie Kontraktion isolierter Herzmuskelzellen nach anhaltender Angiotensin-II -Exposition

Um den Einfluss einer chronischen Stimulation der Angiotensin-II-Rezeptoren auf deren Kontraktionsverhalten zu untersuchen, wurden adulte ventrikuläre Herzmuskelzellen der Ratte für 20 Stunden in Gegenwart von Angiotensin-II ($1\text{ }\mu\text{mol/l}$) inkubiert. Danach wurde die Kontraktion der Herzmuskeln unter elektrischer Stimulation in unmodifiziertem Zellkulturmedium untersucht. Dies entspricht wieder einer nominell weitgehend lastfreien Verkürzung. Als Grad für die Kontraktion der Zelle wurde deren prozentuale Verkürzung relativ zur diastolischen Zelllänge, die Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit berechnet. Die Zellen wurden im Frequenzbereich von 0,5 bis 2,0 Hz stimuliert. Im Bereich von 1,0 bis 2,0 Hz findet sich sowohl an isolierten Herzmuskelzellen als auch an den mit Angiotensin-II behandelten Zellen keine positive Verkürzungs-Frequenz-Beziehung (Abb. 9A). Es zeigte sich kein Unterschied zwischen Kontrollzellen und Angiotensin-II stimulierten Zellen und sie wiesen auch keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Verkürzungsgeschwindigkeit auf (Abb. 9C). Jedoch zeigten die Angiotensin-II inkubierten Zellen im Frequenzbereich von 1 bis 2 Hz eine signifikant schnellere Relaxation (Abb. 9B).

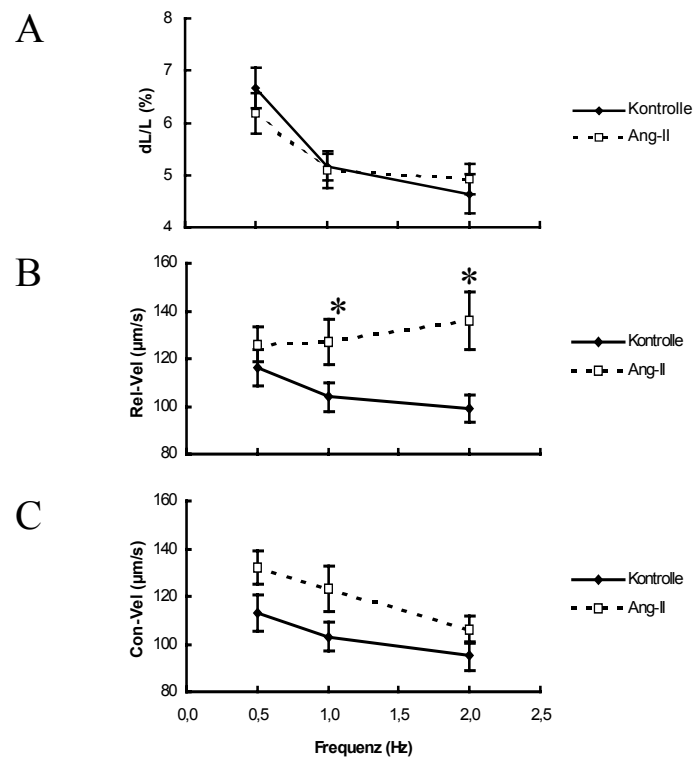


Abb. 9: Einfluss von Angiotensin-II-Inkubation über Nacht auf das Kontraktionsverhalten adulter ventrikulärer Herzmuskelzellen der Ratte. Isolierte Herzmuskelzellen wurden über Nacht in Kulturmedium (Kontrolle, n=66) oder in Kulturmedium mit Angiotensin-II (Ang-II, 1 $\mu\text{mol/l}$, n=57) inkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler für die relative Zellverkürzung (A), die Relaxationsgeschwindigkeit (B) und die Verkürzungsgeschwindigkeit (C). *, $p < 0,05$ vs. Kontrolle.

4.8. Einfluss anhaltender Angiotensin-II-Inkubation auf die β -adrenerg vermittelte maximale Zellverkürzung

Um die maximale β -adrenerge Stimulierbarkeit der Herzmuskelzellen nach anhaltender Exposition mit Angiotensin-II zu bestimmen, wurden die Zellen mit dem Peptidhormon (1 $\mu\text{mol/l}$) inkubiert und am darauffolgenden Tag unter lastfreien Bedingungen erneut elektrisch stimuliert. Die Bestimmung der Zellverkürzungsparameter erfolgte wieder in Gegenwart von Isoprenalin zur Stimulation der β -adrenergen Rezeptoren. Das Vermögen von Isoprenalin die Zellverkürzung zu steigern, war nach Präinkubation mit Angiotensin-II geringfügig im Bereich der höheren und damit physiologisch relevanteren Frequenzen eingeschränkt (Abb. 10A). Im Unterschied zu den Kontrollzellen ließen sich im gesamten Frequenzbereich eine signifikant herabgesetzte Relaxations-Geschwindigkeit und Kontraktionsgeschwindigkeit (Abb. 10B und 10C) feststellen, nachdem die Zellen vor Versuchsbeginn 20 Stunden mit Angiotensin-II inkubiert worden waren.

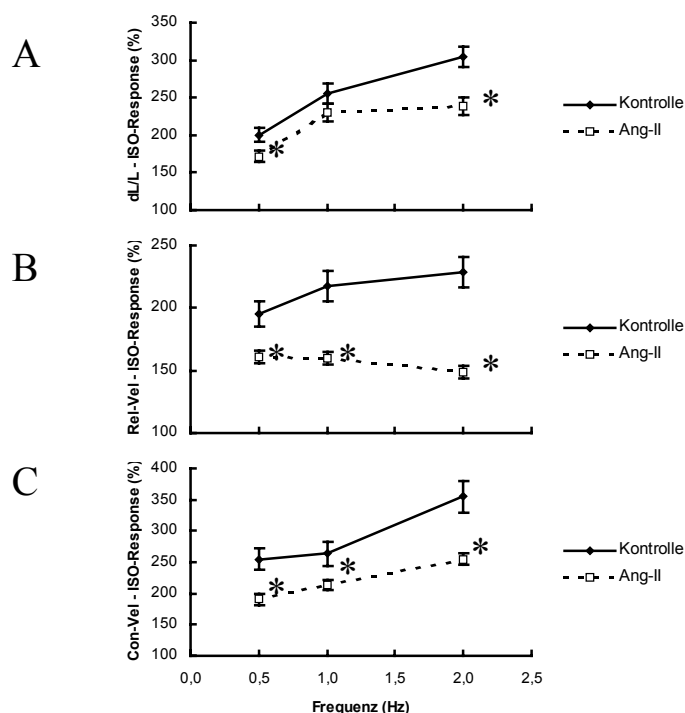


Abb. 10: Einfluss von Angiotensin-II-Inkubation über Nacht auf die Isoprenalin-induzierbare Kontraktionssteigerung adulter ventrikulärer Herzmuskelzellen der Ratte. Isolierte Herzmuskelzellen wurden über Nacht in Kulturmedium (Kontrolle, $n=66$) oder in Kulturmedium mit Angiotensin-II (Ang-II, 1 $\mu\text{mol/l}$, $n=58$) inkubiert. Die elektrische Stimulation erfolgte in Gegenwart von Isoprenalin (100 nmol/l). Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler für die relative Zellverkürzung (A), die Relaxationsgeschwindigkeit (B) und die Verkürzungsgeschwindigkeit (C). *, $p < 0,05$ vs. Kontrolle.

4.9. Einfluss von externer Last auf das Kontraktionsverhalten isolierte Herzmuskelzellen nach anhaltender Angiotensin-II-Exposition

Um den Einfluß von Angiotensin-II auf das Kontraktionsverhalten adulter Herzmuskelzellen unter erhöhter Last zu beurteilen, wurden die Zellen wie beschrieben mit Angiotensin-II inkubiert und am darauffolgenden Tag in hoch viskösem Medium (400 cP) elektrisch stimuliert. Dabei zeigten sich in der Frequenz-Verkürzungs-Beziehung kein Unterschied zwischen Kontrollzellen und den mit Angiotensin-II behandelten Zellen (Abb.11A) und auch kaum Unterschiede in der Relaxationsgeschwindigkeit (Abb.11B). Lediglich zeigten die mit Angiotensin-II inkubierten Zellen bei 0,5 Hz eine signifikante Verschlechterung der Kontraktionsgeschwindigkeit (Abb.11C).

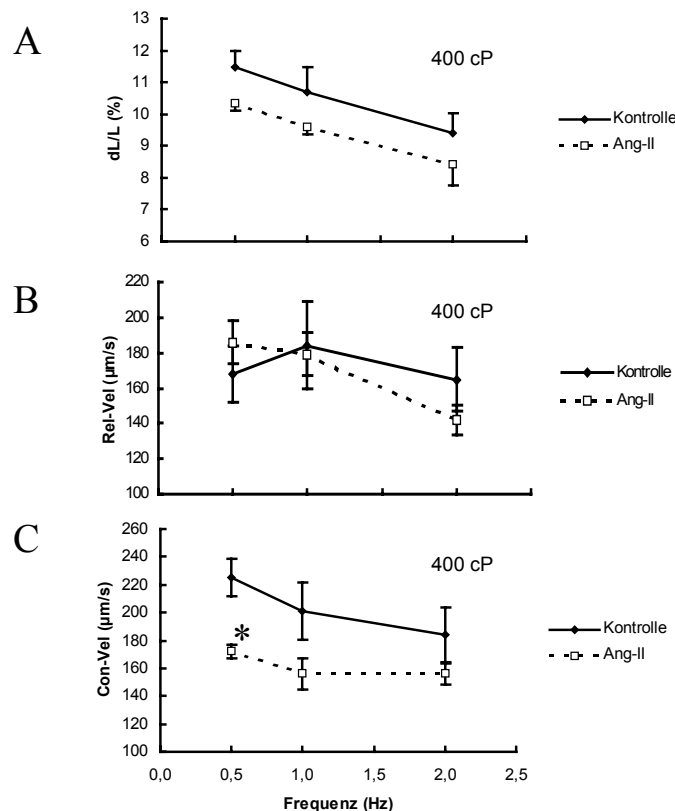


Abb.11: Einfluss von Angiotensin-II auf das Kontraktionsverhalten adulter ventrikulärer Herzmuskelzellen der Ratte in viskösem Medium (400 cP). Isolierte Herzmuskelzellen wurden über Nacht in Kulturmedium (Kontrolle, n=17) oder in Kulturmedium mit Angiotensin-II (Ang-II, 1µmol/l, n=8) inkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler für die relative Zellverkürzung (A), die Relaxationsgeschwindigkeit (B) und die Verkürzungsgeschwindigkeit (C). *, $p < 0,05$ vs. Kontrolle.

4.10. Lastfreie Kontraktion isolierter Herzmuskelzellen nach anhaltender TGF- β -Exposition

Um den Einfluss einer chronischen Stimulation mit TGF- β auf deren Kontraktionsverhalten zu untersuchen, wurden adulte ventrikuläre Herzmuskelzellen der Ratte für 20 Stunden in Gegenwart von TGF- β (10 nmol/l) inkubiert. Danach wurde die Kontraktion der Herzmuskelzellen unter elektrischer Stimulation in unmodifiziertem Zellkulturmedium untersucht. Dies entspricht einer nominell weitgehend lastfreien Verkürzung. Als Grad für die Kontraktion der Zelle wurde deren prozentuale Verkürzung relativ zur diastolischen Zelllänge, die Kontraktions- und die Relaxationsgeschwindigkeit berechnet. Die Zellen wurden im Frequenzbereich von 0,5 bis 2,0 Hz stimuliert.

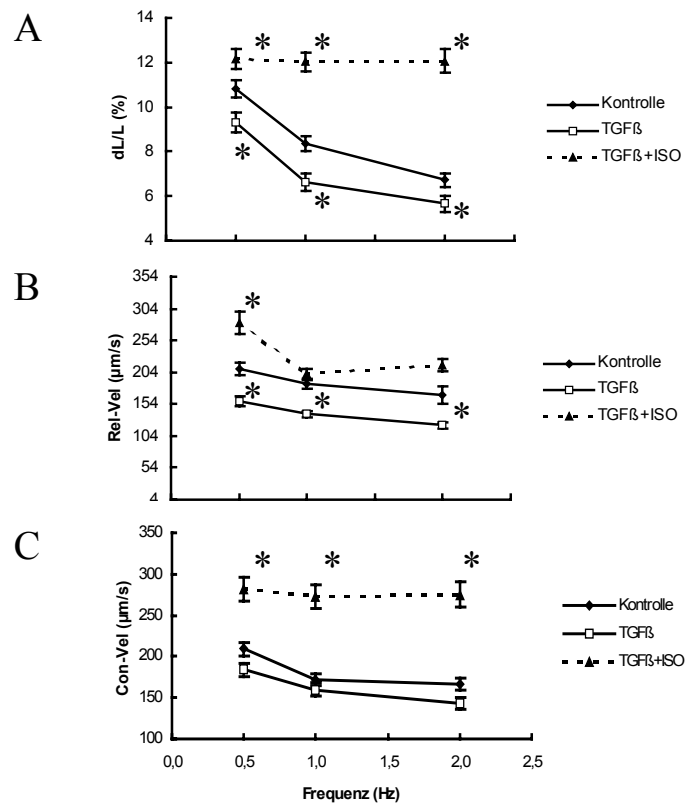


Abb. 12: Einfluss einer TGF- β -Inkubation über Nacht auf das Kontraktionsverhalten adulter ventrikulärer Herzmuskelzellen der Ratte. Isolierte Herzmuskelzellen wurden über Nacht in Kulturmedium (Kontrolle, n=26) oder in Kulturmedium mit TGF- β (10 nmol/l, n=31) inkubiert. Bei einem Teil der Zellen erfolgte die Stimulation zusätzlich in Gegenwart von Isoprenalin (ISO, 100 nmol/l, n=25). Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler für die relative Zellverkürzung (A), die Relaxationsgeschwindigkeit (B) und die Verkürzungsgeschwindigkeit (C). *, p<0,05 vs. Kontrolle

Ein Teil der Zellen bekam während der Kontraktionsanalyse Isoprenalin (100 nmol/l) um die maximale β -adrenerge Stimulierbarkeit zu ermitteln. TGF- β vorbehandelte Zellen zeigten im gesamten Frequenzbereich eine signifikant negative Frequenz-Verkürzungsbeziehung (Abb.12A). Die Kontroll- und TGF- β vorbehandelten Zellen kontrahierten in gesamten Frequenzbereich gleich schnell (Abb. 12C), während die Relaxation bei TGF- β behandelten Zellen wesentlich langsamer abläuft (Abb. 12B). Durch Stimulation der Zellen mit Isoprenalin waren diese Beeinträchtigungen im Kontraktionsverhalten vollständig reversibel.

4.11. Einfluss von externer Last auf das Kontraktionsverhalten isolierter Herzmuskelzellen nach anhaltender TGF- β -Exposition

Um den Einfluß einer externen Last auf die Kontraktion der Herzmuskelzellen nach anhaltender Exposition mit TGF- β zu beurteilen, wurden die Zellen, wie beschrieben, mit TGF- β inkubiert und am darauffolgenden Tag in hoch viskösem Medium (400 cP) elektrisch stimuliert.

Dabei zeigten die Kontrollzellen eine negative Frequenz-Verkürzungsbeziehung im Bereich von 0,5-2,0 Hz (Abb. 13A), aber keine Frequenzunterschiede in der Relaxations- oder Kontraktionsgeschwindigkeit (Abb. 13B, 13C). Im Gegensatz dazu wiesen TGF- β behandelte Zellen eine verminderte Zellverkürzung (Abb. 13A) und bei einer Frequenz von 2 Hz auch eine signifikant geringere Relaxationsgeschwindigkeit auf (Abb. 13B). Trotz einer Tendenz zu einer niedrigeren Kontraktionsgeschwindigkeit war dies nicht signifikant.

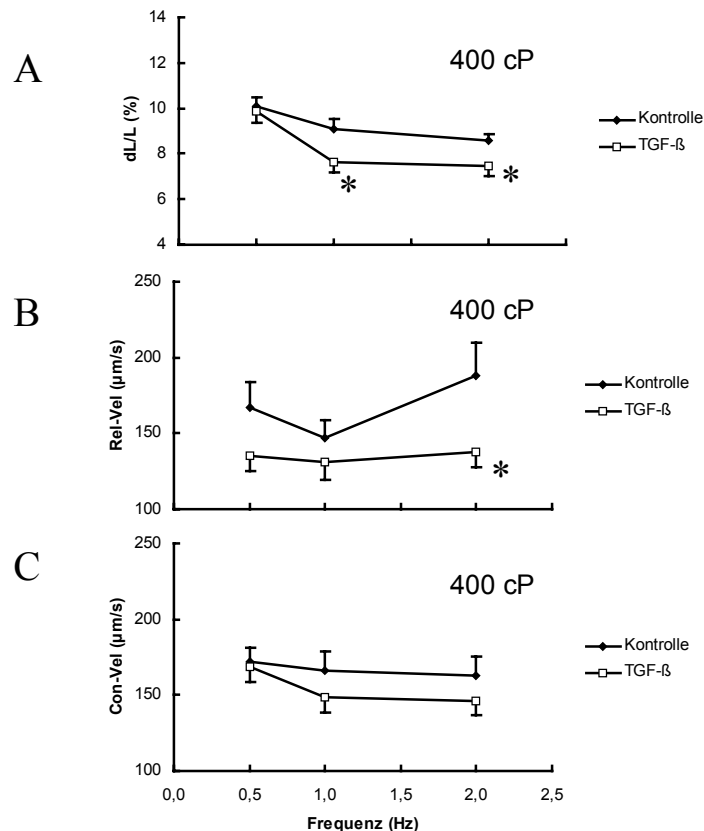


Abb. 13: Einfluss von TGF-β auf das Kontraktionsverhalten adulter ventrikulärer Herzmuskelzellen der Ratte in viskosem Medium (400 cP). Isolierte Herzmuskelzellen wurden über Nacht in Kulturmedium (Kontrolle, n=12) oder in Kulturmedium mit TGF-β (10 nmol/l, n=14) inkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler für die relative Zellverkürzung (A), die Relaxationsgeschwindigkeit (B) und die Verkürzungsgeschwindigkeit (C). *, p < 0,05 vs. Kontrolle.

4.12. Einfluss chronischer Glukose-Inkubation auf das Kontraktionsverhalten adulter ventrikulärer Herzmuskelzellen unter lastfreien Bedingungen

Um den Einfluss einer chronischen Stimulation mit Glukose auf deren Kontraktionsverhalten zu untersuchen, wurden adulte ventrikuläre Herzmuskelzellen der Ratte über Nacht in Gegenwart von Glukose (15 mmol/l) inkubiert. Danach wurde die Kontraktion der Herzmuskelzellen unter elektrischer Stimulation in unmodifiziertem Zellkulturmedium untersucht. Dies entspricht einer nominell weitgehend lastfreien Verkürzung. Als Grad für die Kontraktion der Zellen wurde deren prozentuale Verkürzung relativ zur diastolischen Zelllänge, die Kontraktions- und die Relaxationsgeschwindigkeit berechnet. Unter elektrischer Stimulation zeigten die mit Glukose inkubierten Zellen bei 0,5 Hz eine signifikant bessere Zellverkürzung und eine schnellere Relaxationsgeschwindigkeit (Abb. 14A und 14B). Bei höheren

und damit auch physiologisch relevanten Frequenzen manifestierten sich diese Unterschiede nicht. Die Kontroll- und Glukose vorbehandelten Zellen kontrahierten in gesamten Frequenzbereich gleich schnell (Abb. 14C).

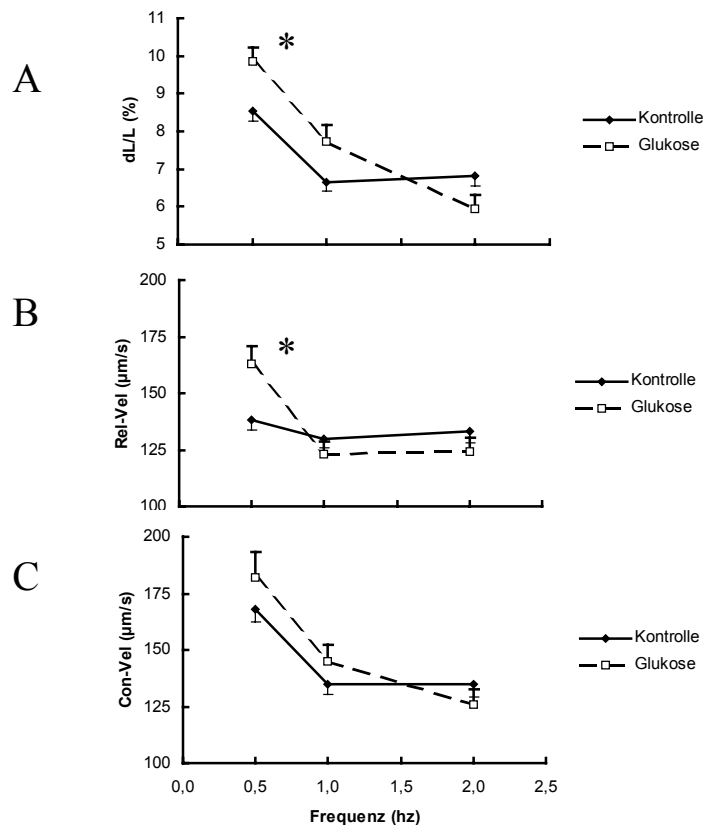


Abb. 14: Einfluss von Glukose (15 mmol/l) über Nacht auf das Kontraktionsverhalten adulter ventrikulärer Herzmuskelzellen. Isolierte Herzmuskelzellen wurden über Nacht in Kulturmedium (Kontrolle, n=23) oder in Kulturmedium mit Glukose (15 mmol/l, n=26) inkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler für die relative Zellverkürzung (A), die Relaxationsgeschwindigkeit (B) und die Verkürzungsgeschwindigkeit (C). *, $p < 0,05$ vs. Kontrolle

4.13. Einfluss chronischer Glukose-Inkubation auf die maximale β -adrenerge Rezeptorstimulierbarkeit

Um die maximale β -adrenerge Stimulierbarkeit der Herzmuskelzellen nach anhaltender Exposition mit Glukose zu bestimmen, wurden die Zellen, wie unter 4.1. beschrieben, mit Glukose inkubiert und am darauffolgenden Tag unter lastfreien Bedingungen erneut elektrisch stimuliert. Im Unterschied zu der unter 4.1. beschriebenen Versuchsserie wurde die Stimulationen jetzt in Gegenwart von 100 nmol/l Isoprenalin durchgeführt. Dabei zeigten sich im gesamten Frequenzbereich keine signifikanten Unterschiede bezüglich der relativen Zellverkürzung (Abb. 15A),

der Relaxationsgeschwindigkeit (Abb. 15B), und der Kontraktionsgeschwindigkeit (Abb. 15C).

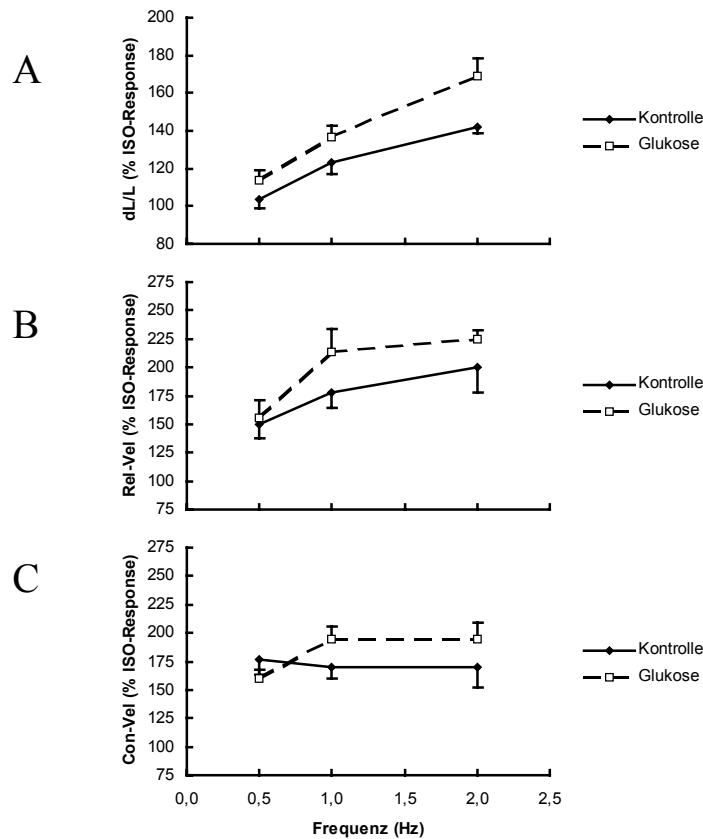


Abb. 15: Einfluss von Glukose auf die Isoprenalin-induzierbare Kontraktionssteigerung adulter ventrikulärer Herzmuskelzellen der Ratte. Isolierte Herzmuskelzellen wurden über Nacht in Kulturmedium (Kontrolle, n=25) oder in Kulturmedium mit Glukose (15 mmol/l, n=24) inkubiert. Die elektrische Stimulation erfolgte in Anwesenheit von Isoprenalin (100 nmol/l). Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler für die relative Zellverkürzung (A), die Relaxationsgeschwindigkeit (B) und die Verkürzungsgeschwindigkeit (C). *, $p < 0,05$ vs. Kontrolle.

4.14. Einfluss von externer Last auf das Kontraktionsverhalten isolierter Herzmuskelzellen nach anhaltender Glukose-Exposition

Um den Einfluss von Glukose auf das Kontraktionsverhalten adulter Herzmuskelzellen unter erhöhter Last zu beurteilen, wurden die Zellen, wie beschrieben, mit Glukose inkubiert und am darauffolgenden Tag in hoch viskösen Medium (400 cP) elektrisch stimuliert. Dabei wiesen Kontrollzellen in gesamten Frequenzbereich eine signifikant bessere Zellverkürzung auf (Abb. 16A). Die mit Glukose behandelten Zellen relaxierten bei 0,5 Hz signifikant schneller, nicht aber bei höheren Konzentrationen (Abb. 16B). Die mit Glukose inkubierten Zellen zeigten von 1-2 Hz eine signifikant langsamere Kontraktion (Abb. 16C).

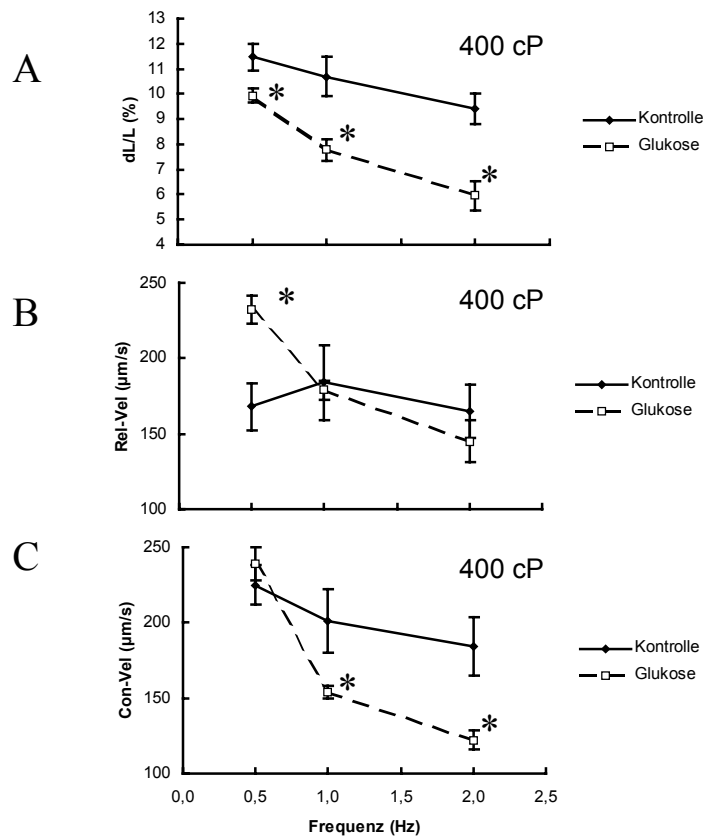


Abb.16: Einfluss von Glukose auf das Kontraktionsverhalten adulter ventrikulärer Herzmuskelzellen der Ratte in viskosem Medium (400 cP). Isolierte Herzmuskelzellen wurden über Nacht in Kulturmedium (Kontrolle, n=12) oder in Kulturmedium mit Glukose (15 mmol/l, n=12) inkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler für die relative Zellverkürzung (A), die Relaxationsgeschwindigkeit (B) und die Verkürzungsgeschwindigkeit (C). *, $p < 0,05$ vs. Kontrolle.

4.15. Einfluss von externer Last auf das Kontraktionsverhalten isolierter Herzmuskelzellen nach anhaltender Glukose-Exposition unter Hemmung der p38-MAP-Kinase

Da Hyperglykämie die stressaktivierte p38-MAP-Kinase aktiviert und gleichzeitig (siehe 4.14.) das Kontraktionsverhalten unter erhöhter Last beeinträchtigt, wurde der Einfluss von Glukose in Gegenwart des p38-MAP-Kinase Inhibitors SB202190 (1 µmol/l) auf das Kontraktionsverhalten adulter Herzmuskelzellen untersucht. Die Untersuchungen wurden auf die Werte für 2 Hz beschränkt, weil sich hier die größten Funktionsdefizite durch Glukose-Inkubation erzielen ließen. Die Zellen wurden wie beschrieben mit Glukose $\pm$ SB inkubiert und am darauffolgenden Tag in hoch viskosen Medium (400 cP) elektrisch stimuliert. Dabei zeigten die mit Glukose und SB inkubierten Zellen eine leicht bessere Zellfunktion im Gegensatz zu den nur mit Glukose behandelten Zellen (Abb. 17A). Allerdings wiesen die Zellen unter Glukose

plus SB weiterhin eine signifikant geringere Relaxations- und Kontraktions-Geschwindigkeit auf (Abb. 17B und 17C) im Vergleich zu Kontrollzellen.

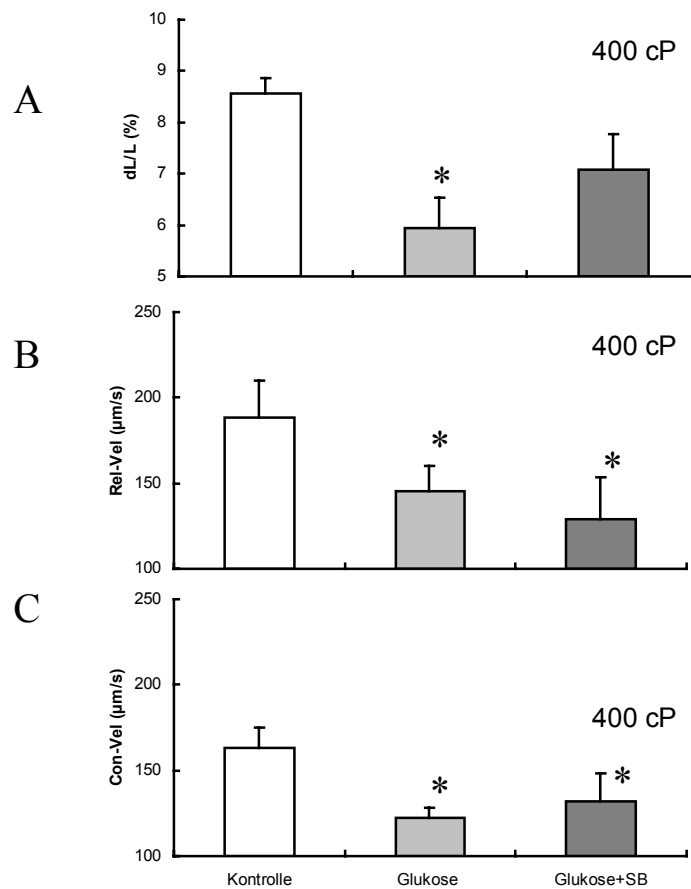


Abb.17: Einfluss von Glukose auf das Kontraktionsverhalten adulter ventrikulärer Herzmuskelzellen der Ratte in viskösem Medium (400 cP) unter Hemmung der p38-MAP-Kinase. Isolierte Herzmuskelzellen wurden über Nacht in Kulturmedium (Kontrolle, n=15) oder in Kulturmedium plus Glukose (15 mmol/l, n=13) mit und ohne SB202190 (SB, 1 µmol/l) inkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler für die relative Zellverkürzung (A), die Relaxationsgeschwindigkeit (B) und die Verkürzungsgeschwindigkeit (C). *, p < 0,05 vs. Kontrolle.

5. Kapitel: Diskussion

5.1. Hauptbefunde

Die vorliegende Arbeit verfolgte das Ziel, den Einfluss von Noradrenalin als wichtigsten Transmitter des sympathischen Nervensystems sowie von Angiotensin-II, der aktiven Komponente des Renin-Angiotensin-Systems und TGF- β , ein Angiotensin abhängiges induziertes lokales Mediatormolekül zu untersuchen. Der Arbeit liegt die Hypothese zugrunde, dass es im Laufe einer druckabhängig entwickelten Myokardhypertrophie initial zu einer Freisetzung von Katecholaminen kommt, sekundär eine Aktivierung des Renin-Angiotensin-Systems erfolgt, das lokal wesentlich durch die Induktion des Zytokins TGF- β wirkt. Die Ergebnisse der Studie zeigen, dass eine chronische Exposition von Herzmuskelzellen mit Noradrenalin zu einer Verbesserung der basalen Kontraktionseigenschaften führt. Dies geht einher mit einer Desensibilisierung der β -adrenergen Rezeptoren, also dem Verlust der positiv inotropen Wirkung einer Stimulation der β -adrenergen Rezeptoren. Außerdem zeigen die Zellen trotz basal besserer Kontraktion, eine wesentlich eingeschränkte Kontraktionsfähigkeit unter erhöhter Mediumviskosität, was im Gegensatz zur basalen und lastfreien Verkürzung bereits andeutet, dass die chronisch Noradrenalin-exponierten Herzmuskelzellen eine verminderte adäquate Zellantwort auf eine erhöhte Nachlast zeigen. Diese Veränderungen ließen sich durch selektive Stimulation der β -adrenergen Rezeptoren durch Isoprenalin imitieren. Im Gegensatz zur Wirkung von Noradrenalin oder Isoprenalin, zeigen die Zellen nach chronischer Exposition mit Angiotensin-II eine unveränderte basale Kontraktionsfähigkeit unter lastfreien Bedingungen, eine eingeschränkte, aber nicht aufgehobene Ansprechbarkeit auf die Stimulation der β -adrenergen Rezeptoren und eine tendenziell, aber nicht signifikant verringerte Kontraktionsfähigkeit unter erhöhter Viskosität im Medium. Das Zytokin TGF- β schließlich führt zu einer verminderten basalen Kontraktionsfähigkeit aufgrund einer Relaxationsstörung bei unveränderter Ansprechbarkeit auf die Stimulation der β -adrenergen Rezeptoren. Die Kontraktionsfähigkeit der Herzmuskelzellen in viskösem Medium ist deutlich verringert.

5.2. Die Rolle der Katecholamine für die Kontraktion der Herzmuskelzellen

Die Freisetzung von Katecholaminen im Zuge einer Druckbelastung des Herzens gilt heute als der wichtigste und initiale Schritt für die druckinduzierte Adaptation des Herzens, in der Regel des linken Ventrikels. Die Wirkung von Noradrenalin auf die Proteinsynthese der Herzmuskelzelle wurde in der Vergangenheit intensiv untersucht. Die selektive Stimulation der α -adrenergen Rezeptoren durch Substanzen wie Phenylephrin führt zu einer Verschiebung des Gleichgewichts zwischen Proteinbiosynthese und Proteindegradation in den Zellen, was zu einer Zunahme der Zellgröße durch hypertrophes Wachstum führt (Schlüter et al., 1999). Obwohl die Myokardhypertrophie als unabhängiger Prädiktor für die Entstehung einer Herzinsuffizienz gilt, ist die funktionelle Konsequenz der α -adrenerg vermittelten Myokardhypertrophie wenig charakterisiert. Vorangegangene Untersuchungen haben gezeigt, dass auf zellulärer Ebene eine selektive Stimulation der α -adrenergen Rezeptoren zu einer Verbesserung der Relaxationseigenschaften führt, was mit einer Heraufregulation des für die Rückspeicherung des Calciums in das sarkoplasmatische Retikulum verantwortlichen Proteins SERCA2A (Schreckenberg et al., 2003) einhergeht. Dies verbessert die Möglichkeiten der Herzmuskelzellen auf eine Nachlasterhöhung adäquat zu reagieren. In der Tat zeigen *in vivo* Versuche an transgenen Mäusen mit Defekten im Katecholaminsyntheseapparat bzw. der α -adrenergen Rezeptoren, dass eine α -adrenerge Myokardhypertrophie primär kompensatorisch und funktionsverbessernd ist (Cho et al., 1999; O'Connell et al., 2002).

Die Wirkung natürlicher Katecholamine unterscheidet sich aber wesentlich von der Wirkung einer selektiven Stimulation der α -adrenergen Rezeptoren. Dies ist einmal begründet in der Wechselwirkung der gleichzeitig stimulierten α - und β -adrenergen Rezeptoren. Es ist deshalb wesentlich, die Wirkung einer selektiven Stimulation der α -adrenergen Rezeptoren mit der einer eher physiologischen Wirkung des Katecholamins Noradrenalin zu vergleichen. Die Ergebnisse an lastfrei kontrahierenden Herzmuskelzellen bestätigen zunächst die unter selektiver Stimulation der α -adrenergen Rezeptoren gewonnenen Ergebnisse. Noradrenalin-inkubierte Herzmuskelzellen haben eine wesentlich bessere Relaxation und eine besonders im physiologischen Frequenzbereich signifikant bessere Zellkontraktion.

Durch die gleichzeitige Stimulation der β -adrenergen Rezeptoren kommt es aber zu einer vollständigen Desensibilisierung der β -adrenergen Rezeptoren, wohingegen eine selektive Stimulation der α -adrenergen Rezeptoren nur eine geringer ausgeprägte heterologe Rezeptordesensibilisierung erzeugt. Ein wesentlicher Unterschied zwischen einer selektiven Stimulation der α -adrenergen Rezeptoren und der gleichzeitigen Stimulation der α - und β -adrenergen Rezeptoren besteht in dem Kontraktionsverhalten unter erhöhter Last. Hier zeigt sich unter Noradrenalin ein Defizit in der Systole durch eine verringerte Kontraktionsgeschwindigkeit, so dass es trotz basal besserer Relaxation nicht zu einer Teilkompensation des Funktionsdefizits kommt. Diese beiden wichtigsten Unterschiede zwischen der Wirkung des natürlich vorkommenden Katecholamins Noradrenalin und der selektiven pharmakologischen Stimulation der α -adrenergen Rezeptoren durch Phenylephrin, also homologe Desensibilisierung der β -adrenergen Rezeptoren und eingeschränkte Kontraktionsfähigkeit in höher viskösem Medium, ließ sich durch selektive Stimulation der β -adrenergen Rezeptoren imitieren. Dies belegt die Bedeutung der chronischen Stimulation der β -adrenergen Rezeptoren für die Funktionsdefizite, die nach chronischer Exposition mit Noradrenalin auftreten.

5.3. Die Rolle des Angiotensin-II für die Kontraktion der Herzmuskelzellen

Anders als die chronische Exposition mit Katecholaminen gilt die chronische Exposition mit Angiotensin-II als Teil der Dekompensation der Herzmuskelfunktion im Laufe einer druckinduzierten Myokardhypertrophie. Dies wird deutlich durch die lebensverlängernde Wirkung von Angiotensinrezeptorblockern oder Inhibitoren des Angiotensin-Conversionsenzyms (ACE) an spontan hypertensiven Ratten (Kim et al., 1995; Zimmermann et al., 1999). Die Frage ist, ob es sich dabei um direkte Effekte des Angiotensin-II auf die Herzmuskelzellen handelt oder diese Effekte indirekt durch Induktion lokaler Zytokine vermittelt wird, wobei dem TGF- β eine besondere Rolle zuzukommen scheint. Für das Angiotensin-II konnte in der Vergangenheit gezeigt werden, dass es nur einen gering ausgeprägten Effekt auf die Proteinbiosynthese der Herzmuskelzellen hat (Ruf et al., 2002). Obwohl der Angiotensinrezeptor wie der α -adrenerge Rezeptor ein G-Protein gekoppelter Rezeptor ist, der ähnliche

Signaltransduktionsschritte in den Herzmuskelzellen aktiviert, gibt es wesentliche Unterschiede zwischen beiden Rezeptoren. Die Wirkung des Angiotensin-II ist beschränkt auf die Stimulation Calcium-unabhängiger Proteinkinase C-Isoformen, die mitogen aktivierten Kinasen werden durch α -adrenerge Rezeptorstimulation transient, durch Angiotensin-II anhaltend stimuliert (Ruf et al., 2002). Es stellt sich deshalb die Frage, ob die Gemeinsamkeiten in beiden Rezeptorsystemen einen ähnlichen Einfluss auf die Funktion der Herzmuskelzellen haben oder die Unterschiede ausreichen, um eine grundsätzlich andere Reaktion der Zellen auf Angiotensin-II zu induzieren. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen im Wesentlichen ein ähnliches Bild für Angiotensin-II, wie dies für die selektive Stimulation der α -adrenergen Rezeptorstimulation zu beobachten ist. Unter lastfreien Basalbedingungen zeigen die Herzmuskelzellen eine deutlich bessere Relaxation nach chronischer Exposition mit Angiotensin-II. Die Ansprechbarkeit auf eine β -adrenerge Rezeptorstimulation ist eingeschränkt, aber nicht aufgehoben, was einer vergleichbaren heterologen Desensibilisierung entspricht. Anders als die Stimulation der β -adrenergen Rezeptoren führt die Stimulation der Angiotensinrezeptoren nicht zu einer eingeschränkten Zellfunktion bei höher viskösem Medium. Einen eigenständigen funktionsmindernden Effekt des Angiotensin-II auf die Zellfunktion kann deshalb nicht postuliert werden.

5.4. Wirkung des Zytokins TGF- β auf das Kontraktionsverhalten der Herzmuskelzellen

Die Wirkung des Angiotensin-II liegt zum Teil begründet in seiner direkten Wirkung auf die Herzmuskelzellen. Diese ist aber hinsichtlich der Wachstumsantwort wenig ausgeprägt (Ruf et al., 2002) und hinsichtlich der Zellfunktion nicht deutlich funktionsmindernd (siehe diese Studie). Sie umfasst aber zusätzlich einen erheblichen Einfluss auf die Expression bestimmter Gene, von denen der Induktion des Zytokins TGF- β eine besondere Bedeutung zukommt. Frühzeitig wurde erkannt, dass es im Laufe einer druckinduzierten Myokardhypertrophie zu einer transient verstärkten lokalen Expression des Zytokins am Übergang einer noch kompensatorischen Myokardhypertrophie zur Herzinsuffizienz (Boluyt et al., 1994) kommt. Vorangegangene Studien belegten die enge Kausalbeziehung zwischen

Angiotensin-II und der Induktion des TGF- β (Wenzel et al., 2001). Hinsichtlich des funktionellen Einflusses des TGF- β auf die Herzmuskelzellen zeigt diese Arbeit erstmals einen kontraktionsmindernden Effekt des Zytokins auf die Zelle schon unter basalen, also lastfreien Verkürzungsbedingungen. Dieser Effekt beruht auf einer deutlich eingeschränkten Relaxation der Zellen, was auch in höher viskösem Medium zu einer signifikanten Funktionsminderung führt. Dagegen bleibt die Ansprechbarkeit der Zellen auf eine β -adrenerge Rezeptorstimulation uneingeschränkt. Eine schematische Darstellung der hier gefundenen Ergebnisse zeigt die Abbildung 18.

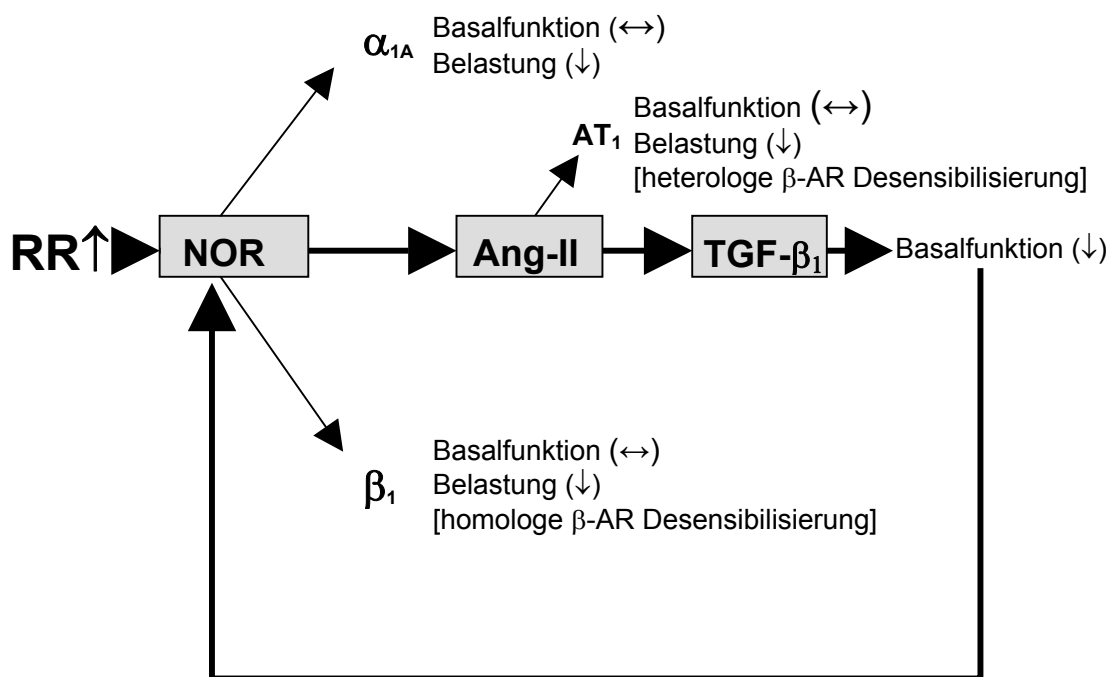


Abb. 18: Schematische Darstellung zur progredienten Entwicklung eines kardialen Funktionsverlustes durch chronische Hypertension auf der Grundlage der hier beschriebenen Wirkungen von Noradrenalin (NOR), Angiotensin-II (Ang-II) und TGF- β_1 .

5.5. Schlussfolgerungen aus den Experimenten zur Myokardhypertrophie und Zellfunktion

Der vorliegenden Arbeit liegt die Hypothese zugrunde, dass es im Laufe einer chronischen Druckbelastung zunächst zu einer Freisetzung von Katecholaminen kommt, die teilweise aber nicht vollständig zur Kompensation der angestiegenen

Nachlast führt. Unterstützt wird diese Freisetzung durch eine Mobilisierung des Renin-Angiotensin-Systems. Dies bewirkt eine chronische Exposition der Herzmuskelzellen mit Angiotensin-II, was zur Induktion von TGF- β führt, was wiederum die Dekompensationsphase der druckinduzierten Myokardhypertrophie auslöst. Die Ergebnisse dieser Studie liegen im Wesentlichen in Einklang mit dem hier geschilderten Szenario. Die grundsätzlich kompensatorische Wirkung einer α -adrenergen Rezeptorstimulation durch Noradrenalin wird deutlich eingeschränkt durch eine homologe Desensibilisierung der β -adrenergen Rezeptoren und der Induktion eines verminderten Kontraktionsvermögens durch Stimulation der β -adrenergen Rezeptoren. Angiotensin-II selbst scheint keine große eigenständige Wirkung zu besitzen, aber das von Angiotensin-II induzierte TGF- β führt zu einer deutlichen Funktionsstörung, charakterisiert durch eine verminderte Relaxation der Herzmuskelzellen, wie sie aufgrund der verminderten Expression von SERCA2A im insuffizienten Herzen auch zu finden ist. Damit lassen sich wesentliche Komponenten des dekompenzierten insuffizienten Myokards, also Desensibilisierung der β -adrenergen Rezeptoren und verminderte Relaxation *in vitro* nachvollziehen.

5.6. Einfluss moderater Hyperglykämie auf das Kontraktionsverhalten der Herzmuskelzellen

Neben der chronischen Druckbelastung stellt Diabetes einen zunehmend an Bedeutung gewinnenden Risikofaktor für die Herzinsuffizienz dar (Zarich et al., 1989). Obwohl einige Ergebnisse der Literatur bereits gezeigt haben, dass Hyperglykämie durch Glykosidierung von Proteinen eine Relaxationsstörung an Herzmuskelzellen ausüben kann, ist unklar, ob bereits moderat erhöhte Konzentrationen an Glukose während der Entstehung einer ausgeprägten Diabetes das Kontraktionsverhalten nachhaltig beeinflussen (Ren et al., 1997). Vorangegangene Untersuchungen haben gezeigt, dass moderat erhöhte Glukosekonzentrationen ausreichen, um stressaktivierte Kinasen, wie die p38-mitogen aktivierte Kinase zu aktivieren (Arbeitsgruppe Schlüter, unpublizierte Ergebnisse). Abschließendes Ziel der hier vorgelegten Arbeit war deshalb, die oben beschriebenen Funktionsveränderungen im Zuge einer druckinduzierten Myokardhypertrophie mit der Wirkung einer chronischen, aber moderaten Erhöhung

der extrazellulären Glukosekonzentration zu vergleichen. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen zunächst für die lastfreie Basalkontraktion eine moderate Zunahme der Kontraktion bei niedrigen Frequenzen, die aber im mehr physiologischen Bereich irrelevant ist. Die Stimulierbarkeit der β -adrenergen Rezeptoren ist unverändert. Die wesentlichste Erkenntnis ist die signifikant verminderte Kontraktionsfähigkeit der Zellen in höher viskösem Medium, also unter nicht lastfreien Bedingungen. Hier ist insbesondere die Kontraktionsgeschwindigkeit deutlich verringert, was für ein primär im Bereich der in der Systole liegendes Defizit spricht. Durch Hemmung der stressaktivierten p38-mitogen aktivierten Kinase konnte dieses Defizit nur unwesentlich verringert werden. Dies deutet darauf hin, dass andere Wirkungen der Hyperglykämie für die hier beobachteten Funktionsverluste verantwortlich sind.

5.7. Schlussfolgerungen

Die in dieser Arbeit erhobenen Befunde zeigen deutlich, dass die unter chronischer Druckbelastung zu erwartenden humoralen und nervalen Regulatorsubstanzen direkt die Kontraktionsfähigkeit von Herzmuskelzellen nachhaltig beeinflussen. Wie aus Analogiestudien an spontan hypertensiven Ratten erwartet worden war, ist hier das Zytokin TGF- β als kritischer Faktor zu werten, der zu einer signifikanten Funktionsminderung an Herzmuskelzellen beiträgt. In ähnlicher Weise lässt sich durch die hier dargestellten Versuche, insbesondere durch Verwendung eines hoch viskösen Mediums zur Vermeidung einer artifiziellen reinen lastfreien Kontraktion, Funktionsdefizite bereits nach eintägiger Inkubation in moderat erhöhten Glukosekonzentrationen nachweisen. Dies zeigt an, dass durch Hyperglykämie eigenständige Funktionsdefizite an Herzmuskelzellen erzeugt werden.

6.Kapitel: Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit verfolgte das Ziel, den Einfluss von Noradrenalin, Angiotensin-II, TGF- β und moderater Hyperglykämie auf das Kontraktionsverhalten isolierter Herzmuskelzellen zu untersuchen.

Die Ergebnisse der Studie zeigen:

1. Eine chronische Exposition von Herzmuskelzellen mit Noradrenalin führt zu einer Verbesserung der basalen Kontraktionseigenschaften, die aber mit einer Desensibilisierung der β -adrenergen Rezeptoren einhergeht. Die Zellen zeigen trotz basal besserer Kontraktion eine wesentlich eingeschränkte Kontraktionsfähigkeit unter erhöhter Mediumviskosität.
2. Im Gegensatz dazu zeigen die Zellen nach chronischer Exposition mit Angiotensin-II eine unveränderte basale Kontraktionsfähigkeit unter lastfreien Bedingungen, eine eingeschränkte, aber nicht aufgehobene Ansprechbarkeit auf die Stimulation der β -adrenergen Rezeptoren und eine tendenziell, aber nicht signifikant verringerte Kontraktionsfähigkeit unter erhöhter Viskosität im Medium.
3. Das Zytokin TGF- β schließlich führt zu einer verminderten basalen Kontraktionsfähigkeit aufgrund einer Relaxationsstörung bei unveränderter Ansprechbarkeit auf die Stimulation der β -adrenergen Rezeptoren. Die Kontraktionsfähigkeit der Herzmuskelzellen in viskösem Medium ist deutlich verringert.
4. Um die oben beschriebenen Funktionsveränderungen im Zuge einer druckinduzierten Myokardhypertrophie zu vergleichen, wurde die Wirkung einer chronischen, aber moderaten Erhöhung der extrazellulären Glukosekonzentration auf die Zellen untersucht. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen zunächst für die lastfreie Basalkontraktion, eine moderate Zunahme der Kontraktion bei niedrigen Frequenzen, die aber im mehr physiologischen Bereich irrelevant ist. Die Stimulierbarkeit der β -adrenergen Rezeptoren ist unverändert. Die wesentlichste

Erkenntnis ist die signifikant verminderte Kontraktionsfähigkeit der Zelle in höher viskösem Medium, also unter nicht lastfreien Bedingungen.

5. Durch Hemmung der stressaktivierten p38-mitogen aktivierten Kinase konnte die Verringerung der Kontraktionsgeschwindigkeit nur unwesentlich verringert werden.

Abschließend betrachtet, zeigen die in dieser Arbeit erhobenen Befunde deutlich, dass die unter chronischer Druckbelastung zu erwartenden humoralen und nervalen Regulatorsubstanzen direkt die Kontraktionsfähigkeit von Herzmuskelzellen nachhaltig beeinflussen, wobei hier das Zytokin TGF- β als kritischer Faktor zu werten ist. Die Glukoseversuche zeigen, dass durch Hyperglykämie eigenständige Funktionsdefizite an Herzmuskelzellen erzeugt werden.

Literaturverzeichnis

- Boluyt, M.O., O'Neil, L., Meredith, A.L., Bing, O.H.L., 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. *Circulation Res* 75:23-32
- Carr, A.A., Prisant, L.M.** (1996) Losartan: first of a new class of angiotensin antagonists for the management of hypertension. *J Clin Pharmacol* 36:3-12
- Cho, M-C., Rao, M., Koch, W.J., Thomas, S.A., Palmiter, R.D., Rockman, H.A.** (1999) Enhanced contractility and decreased β -adrenergic receptor kinase-1 in mice lacking endogenous norepinephrine and epinephrine. *Circulation* 99:2702-2707
- Erdmann, E.** (2003) Herzinsuffizienz - Ursachen, Pathophysiologie und Therapie. *Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart* 3. Auflage.
- Hamawaki, M., Coffman, T.M., Lashus, A., Koide, M., Zile, M.R., Oliverio, M.I., Defreyte, G., Cooper IV, G., Carabello, B.A.** (1998) Pressure-overload hypertrophy is unabated in mice devoid of AT1A receptors. *Am. J. Physiol* 274:H868-H783
- Kim, S., Ohta, K., Hamaguchi, A., Omura, T., Yukimura, T., Mirua, K., Inada, Y., Ishimura, Y., Chatani, F., Iwao, H.** (1995) Angiotensin-II type I receptor antagonist inhibits the gene expression of TGF- β 1 and extracellular matrix in cardiac and vascular tissues of hypertensive rats. *J Pharmacol Exp Therap* 273:509-515
- Levy, D., Garrison, R.J., Savage, D.D., Kannel, W.B., Castelli, W.P.** (1990) Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study. *N. Eng. J. Med* 322:1561-1566

- Mann, D. L., Kent, R. L., Parsons, B., Cooper, G.** (1992) Adrenergic effects on the biology of the adult mammalian cardiocyte. *Circulation* 85: 790-804.
- Morgan, H.E, Baker K.M.**(1991) Cardiac hypertrophy mechanical, neural and endocrine dependence. *Circulation* 83:13-25
- O'Connell, T.D., Stigwart P.M., Simpson G.L. et al.** (2002) β_1 -adrenergic receptors are required for stress response in the heart. *Circulation* 106(Suppl.):11-58(Abstract)
- Pönicke, K., Schlüter, K.-D., Heinroth-Hoffmann, I., Seyfarth, T., Goldberg, M., Osten, B., Piper, H.M., Brodde, O.-E.** (2001) Noradrenaline-induced increase in protein synthesis in adult rat cardiomyocytes. Involvement of only α_{1A} -adrenoceptors. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol* 364:444-453
- Ren, J., Gintant, G.A., Miller, R.E., Davidoff, A.J.** (1997) High extracellular glucose impairs cardiac E.C coupling in a glycosylation-dependent manner. *Am. J. Physiol* 273:H2876-H2883
- Ruf, S., Piper, H.M., Schlüter, K.-D.** (2002) Specific role for the extracellular signal-regulated kinase pathway in angiotensin-II but not phenylephrine-induced cardiac hypertrophy in vivo. *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol* 443:483-490
- Schäfer, M., Pönicke, K., Heinroth-Hoffmann, I., Brodde, O.-E., Piper, H.M., Schlüter, K.-D.** (2001) β -adrenoceptor stimulation attenuates the hypertrophic effect of α -adrenoceptor stimulation in adult rat ventricular cardiomyocytes. *J. Am. Cell Cardiol* 37:300-307
- Schlüter, K.-D., Piper, H.M.** (1992) Trophic effects of catecholamines and Parathyroid hormone on adult ventricular cardiomyocytes, *Am. J. Physiol* 263:H1739-H1746

Schlüter, K.-D., Piper, H.M. (1999) Regulation of growth in the adult cardiomyocytes. *The FASEB J.* 13(Suppl.):S17-S22

Schreckenberg, R., Wenzel, S., Korkusuz, H., Schäfer, C., Schlüter, K.-D (2003) α -Adrenerg vermittelte Steigerung der SERCA2A Expression in adulten ventrikulären Herzmuskelzellen: Signaltransduktion und funktionelle Konsequenz. *Ztsch. F. Kardiologie* 92(Suppl.):216

Shioi, T., McMullen, J.R., Kang, P.M., Douglas, P.S., Obata, T., Franke, T.F., Cantley, L.C., Izumo, S. (2002) Akt/Protein kinase B promotes organ growth in transgenic mice. *Mol. Cell. Biol.* 22:2799-2809

Wenzel, S., Taimor, G., Piper, H.M., Schlüter, K.-D. (2001) Redox sensitive intermediates mediate angiotensin-II-induced p38-MAP kinase activation, AP-1 binding activity and TGF- β expression in adult ventricular cardiomyocytes. *FASEB J.* 15:2291-2293

Zarich, S.W., Nesto, R.W. (1989) Diabetic cardiomyopathy. *Curriculum Cardiol* 118:1000-1012

Zimmermann, R., Kastens, J., Linz, W., Wiemer, G., Schölkens, 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

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. K.-D. Schlüter für die Überlassung des interessanten Themas und sein stetes Interesse am Fortgang der Experimente, sowie für seine Unterstützung und seine Diskussionsbereitschaft.

Mein Dank gilt weiterhin meinen Kollegen, besonders Frau Dr. Jacqueline Heger für die gute Zusammenarbeit, Hilfsbereitschaft und die freundliche Atmosphäre.

Für ihre tatkräftige Unterstützung und die guten Arbeitsbedingungen im Labor danke ich Frau Dagmar Felde.

Frau Daniela Schreiber und Herrn Sergej Kechter danke ich für die Präparation der Herzmuskelzellen.

Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig, 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.

Golozar Soltanpour

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
édition scientifique

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
GLEIBERGER WEG 4
D-35435 WETTENBERG

Tel: +49-(0)6406-4413 Fax: -72757
Email: vvb-ips@t-online.de
www.doktorverlag.de

ISBN 3-89687-494-2

