

Aus der Abteilung Kardiologie und Pneumologie
(Prof. Dr. med. G. Hasenfuß)
im Zentrum Innere Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Das Kontraktionsverhalten isolierter humaner
Kardiomyozyten unter den Bedingungen der primären
Zellkultur und des virusvermittelten Gentransfers:
Einfluß von Frequenzänderung, β -adrenerger Stimulation und Änderung
der extrazellulären Calcium-Konzentration**

INAUGURAL – DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Elke Barbara Seehase (geb. Dieterich)

aus
Wedel/ Holstein
Göttingen 2007

Dekan: Prof. Dr. med. C. Frömmel

I. Berichterstatter: Prof. Dr. med. B. Pieske

II. Berichterstatter/in: Prof. Dr. med. T. Paul

III. Berichterstatter/in: Prof. Dr. med. M. Oppermann

Tag der mündlichen Prüfung: 16.01.2012

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung	1
I.1 Zelluläre Grundlagen von Kontraktion und Relaxation.....	1
I.2 Herzinsuffizienz.....	2
I.3 Regulation der myokardialen Kontraktion.....	5
I.4 Zellkultur von Herzmuskelzellen.....	10
I.5 Viral vermittelter Gentransfer	12
II. Fragestellung	14
III. Material und Methoden	15
III.1 Untersuchtes Gewebe.....	15
III.2 Tyrodelösungen.....	16
III.3 Entnahme des Herzens und Myokardtransport.....	17
III.4 Myozytenisolation.....	17
III.5 Zellkultur.....	19
III.6 Adenoviral vermittelter Gentransfer	19
III.7 Kontraktilitätsmessung.....	20
III.8 Auswertung.....	22
IV. Ergebnisse	25
IV.1 Patientendaten.....	25
IV.2 Morphologie und funktionelle Intaktheit der Myozyten.....	25
IV.3 Basale Funktionsparameter.....	26
IV.4 Einfluß der Zellkultur auf die Verkürzungs-Frequenz-Beziehung.....	29
IV.5 Einfluß der Zellkultur auf die Isoprenalin-KWK.....	40
IV.6 Einfluß der Zellkultur auf die Calcium-KWK.....	48
IV.7 Funktionelle Versuche bei Zellen nach Adenovirus-gekoppeltem Gentransfer und 48 Stunden Zellkultur.....	57
V. Diskussion	65
V.1 Humanes Myokard.....	65
V.2 Methoden.....	68
V.3 Funktionsmessungen.....	71
VI. Zusammenfassung	78
VII. Anhang: Patientendaten	79
VIII. Literaturverzeichnis	81

Abbildungsverzeichnis

Abb. I.1.....	2
Abb. III.1.....	18
Abb. III.2.....	20
Abb. IV.1.....	25
Abb. IV.2.....	26
Abb. IV.3.....	26
Abb. IV.4.....	28
Abb. IV.5.....	29
Abb. IV.6.....	30
Abb. IV.7.....	32
Abb. IV.8.....	34
Abb. IV.9.....	36
Abb. IV.10.....	39
Abb. IV.11.....	41
Abb. IV.12.....	43
Abb. IV.13.....	45
Abb. IV.14.....	47
Abb. IV.15.....	50
Abb. IV.16.....	52
Abb. IV.17.....	54
Abb. IV.18.....	56
Abb. IV.19.....	58
Abb. IV.20.....	60
Abb. IV.21.....	62
Abb. IV.22.....	64

Tabellenverzeichnis

Tabelle III.1.....	16
Tabelle IV.1.....	28
Tabelle IV.2.....	33
Tabelle IV.3.....	35
Tabelle IV.4.....	37
TabelleIV.5.....	42
Tabelle IV.6.....	44
Tabelle IV.7.....	46
Tabelle IV.8.....	51
Tabelle IV.9.....	53
Tabelle IV.10.....	55
Tabelle IV.11.....	59
Tabelle IV.12.....	63
Tabelle VII.1	79

I. Einleitung

I.1 Zelluläre Grundlagen von Kontraktion und Relaxation

Die Pumpfunktion des Herzmuskels wird hauptsächlich durch die koordinierte Kontraktion und Relaxation der Myozyten bestimmt. Das Kontraktionsverhalten der Myozyten wird wesentlich von Vorgängen der elektromechanischen Kopplung bestimmt, die eine Umsetzung der elektrischen Erregung der Zelle in die mechanische Kontraktion bewirken:

Während der Depolarisation der Zellmembran strömt „Trigger“- Ca^{2+} über spannungsabhängige sarkolemmale Ca^{2+} -Kanäle (L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle oder Dihydropyridin-Rezeptoren) ins Zellinnere und führt dort zur Freisetzung einer größeren Menge an „Speicher“- Ca^{2+} aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (Ca^{2+} -induzierte Ca^{2+} -Freisetzung nach Fabiato, 1983). Das geschieht über Ca^{2+} - Freisetzungskanäle, auch Ryanodinrezeptoren genannt, die in enger räumlicher Beziehung zu den L-Typ- Ca^{2+} -Kanälen stehen. Das freigesetzte Ca^{2+} bindet an Troponin C und bewirkt somit eine Konformationsänderung des Troponin- Tropomyosin-Komplexes mit Querbrückenaktivierung zwischen Aktin und Myosin. Das führt zur Kontraktion des Myozyten (Abb. I.1).

Die Relaxation wird eingeleitet durch Dissoziation des Ca^{2+} vom Troponin C und Ca^{2+} - Elimination aus dem Zytosol. Das kann auf vier Wegen geschehen:

1. Wiederaufnahme durch ATP-abhängige Pumpen in das sarkoplasmatische Retikulum (SERCA);
2. Elimination über den sarkolemmalen $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher (NCX);
3. Elimination über sarkolemmale ATP-abhängige Pumpen;
4. Aufnahme in die Mitochondrien über einen Ca^{2+} -Uniporter.

(Vergleiche auch Abb. I.1). Während der erste Weg im menschlichen Myokard einen Anteil von etwa 70% und der zweite von etwa 30% hat, machen die letzten beiden zusammen einen ca. 1%igen Anteil aus und haben somit bezüglich der elektromechanischen Kopplung keine wesentliche Bedeutung (Bers 2002). Während der Diastole ist der allergrößte Teil des intrazellulären Ca^{2+} gebunden oder in intrazellulären Organellen gespeichert. Der wichtigste Speicher ist das sarkoplasmatische Retikulum (SR). Eine Phosphorylierung des Phospholambans, des inhibitorischen Proteins der SR- Ca^{2+} - Pumpen, die cAMP- oder Ca^{2+} /Calmodulin-abhängig erfolgen kann, führt zur Steigerung der Pumpaktivität der SR- Ca^{2+} -ATPase (SERCA) und auf diesem Wege zu vermehrter zytosolischer Ca^{2+} -Elimination und gesteigerter Ca^{2+} -Beladung des SR.

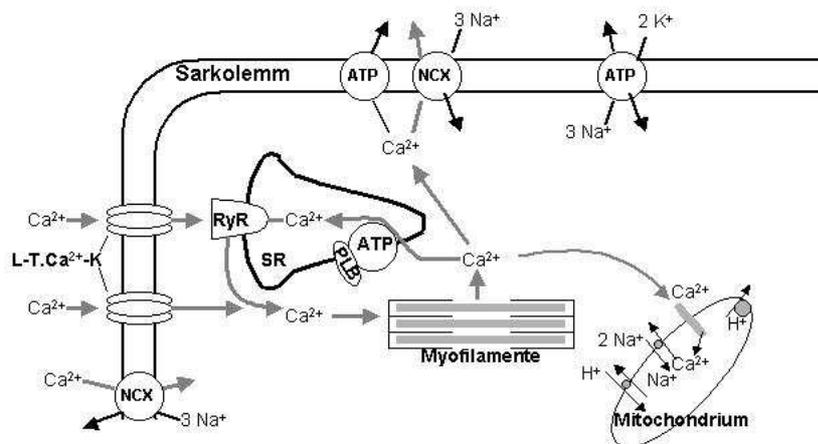


Abb. I.1: Schemazeichnung des Ca²⁺-Transportes in einem ventrikulären Myozyten. ATP: ATPase. L-T.Ca²⁺-K: L-Typ-Ca²⁺-Kanal. NCX: Na⁺/Ca²⁺-Austauscher. PLB: Phospholamban. RyR: Ryanodinrezeptor. SR: Sarkoplasmatisches Retikulum.

Veränderungen der zellulären Ca²⁺-Homöostase können zu Störungen der Kontraktion und Relaxation des Herzens führen. Klinisch resultiert daraus am Ende eine Herzinsuffizienz.

I.2 Herzinsuffizienz

Die Herzinsuffizienz ist eine verbreitete internistische Erkrankung. Jenseits des 65. Lebensjahres stellt sie den häufigsten Grund für Krankenhauseinweisungen dar (Sackner-Bernstein und Mancini, 1995). Weltweit wurde 1995 die Anzahl der Patienten mit Herzinsuffizienz auf ca. 15 Millionen geschätzt (Eriksson, 1995). Allein in den USA beträgt die Prävalenz in der Gesamtbevölkerung 5,2 Millionen, über 550 000 Neuerkrankungen sind pro Jahr zu verzeichnen. Aus der Herzinsuffizienz resultierten im Jahr 2004 1 099 000 Krankenhausaufenthalte, und 268 700 Menschen starben daran. Für das Jahr 2007 wird für die USA mit Behandlungskosten von 33,2 Mrd. US-\$ gerechnet (Rosamond et al., 2007). Prävalenz und Inzidenz sind deutlich altersabhängig. Im Alter zwischen 50 und 59 Jahren litten nach der Framingham-Studie 0,8% der untersuchten Personen an Herzinsuffizienz, bei 30 Jahre älteren Menschen waren schon 6,6% der Männer und 7,9% der Frauen betroffen (Ho et al., 1993a). Das Lebenszeitrisko eines 40jährigen Menschen für Herzinsuffizienz wurde nach der Framingham-Studie mit 21% (Männer) bzw. 20,3% (Frauen) angegeben (Lloyd-Jones et al., 2002).

Für Deutschland gibt es zur Epidemiologie der Herzinsuffizienz keine großen Studien. In einer Studie zur Prävalenz der linksventrikulären Dysfunktion der Allgemeinbevölkerung in

Deutschland hatten 2,8 % der Untersuchten im Alter zwischen 25 und 75 Jahren eine Ejektionsfraktion unter 48% (Mittelwert minus zweifache Standardabweichung). Eine Aussage über Symptome der Herzinsuffizienz findet sich dort allerdings nicht (Fischer et al., 2003). Für die europäische Bevölkerung existieren verschiedene Studien zur Epidemiologie der Herzinsuffizienz: In einer randomisierten englischen Studie wurde bei 3,1% der Untersuchten (Kollektiv über 45 Jahre) eine „manifeste oder wahrscheinliche“ Herzinsuffizienz diagnostiziert (Davies M et al., 2001). Die Rotterdam-Studie wies bei 3,9% der Untersuchten im Alter von $65,7 \pm 7,4$ Jahren echokardiografisch eine Herzinsuffizienz nach.

Mit einer mittleren Überlebenszeit von 1,7 Jahren für Männer und 3,2 Jahren für Frauen ist die chronische Herzinsuffizienz eine Erkrankung mit hoher Letalität (Ho et al., 1993b), vergleichbar mit einer malignen Erkrankung. In einer schottischen Studie stieg über einen Zeitraum von 19 Jahren das mediane Überleben von 1,23 auf 1,64 Jahre aller mit der Diagnose „Herzinsuffizienz“ hospitalisierten Personen. Die Autoren schreiben das einer verbesserten medikamentösen Therapie zu (MacIntyre et al., 2000). Das kann jedoch nicht darüber hinwegtäuschen, daß die Prognose der Patienten mit Herzinsuffizienz nach wie vor schlecht ist. Für Patienten mit terminaler Herzinsuffizienz liegt oftmals die letzte Überlebenschance in einer Herztransplantation. Diese Option ist allerdings begrenzt, heute in erster Linie durch das geringe Spenderorganaufkommen.

I.2.1 Definition, Symptome und Ätiologie

Beim Gesunden ist die myokardiale Pumpleistung sehr anpassungsfähig. Innerhalb kürzester Zeit reagiert das Herz auf die unterschiedlichen Anforderungen des Kreislaufs bei wechselnder Belastung. Voraussetzung der optimalen Anpassung ist ein geordnetes Zusammenspiel aller Teilfunktionen wie Erregungsablauf, Kontraktilität, Klappenspiel, Durchblutung usw.

Die Herzinsuffizienz ist demgegenüber gekennzeichnet durch das Unvermögen des Herzens, trotz ausreichenden venösen Blutangebotes den Organismus seinen Bedürfnissen entsprechend mit Blut zu versorgen. Klinisch liegt dann eine Herzinsuffizienz vor, wenn typische Symptome (Dyspnoe, Müdigkeit, Flüssigkeitsretention) bestehen, denen ursächlich eine kardiale Funktionsstörung zugrunde liegt (AHA-guidelines, Hunt et al., 2005).

Als Folge der primär myokardialen Erkrankung betrifft die Herzinsuffizienz schließlich den gesamten Organismus. Die initiale Schädigung kann durch vermehrte Druck- oder Volumenbelastung, segmentalen (z.B. Myokardinfarkt) oder diffusen (z.B. Myokarditis)

Untergang von Herzmuskelzellen bedingt sein oder im Rahmen primärer Herzmuskelerkrankungen (dilatative Kardiomyopathie) entstehen. Im frühen Stadium der Erkrankung besteht oft eine ventrikuläre Dysfunktion, aber noch kein klinisches Zeichen der Herzinsuffizienz.

Im Verlauf kommt es frühzeitig zur Aktivierung neuroendokriner Gegenregulationsmechanismen auf lokaler, später auf systemischer Ebene (Dzau et al., 1981; Francis et al., 1990). Dazu gehören die Stimulation des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (Dzau et al., 1981), die Aktivierung des sympathischen Nervensystems (Cohn, 1989) und vasoaktiver Peptide wie Endothelin (Wei et al., 1994) oder Adrenomedullin (Jougasaki et al., 1995) und die gesteigerte Freisetzung von Vasopressin. Diese haben kurzfristig die Steigerung des Herzminutenvolumens und somit die Sicherung der Organversorgung zum Ziel, tragen aber durch Erhöhung des peripheren Widerstandes langfristig zur Progredienz der Herzinsuffizienz bei (Packer 1988). Zusätzlich beeinflussen weitere Faktoren, wie die Aktivierung proinflammatorischer Zytokine, schädigend das Myokard (Levine et al., 1990; Übersicht bei Pieske, 1998). In der Folge entwickelt sich schließlich das Vollbild der chronischen Herzinsuffizienz. Daneben tragen weitere Umbauprozesse wie Apoptose und interstitielle Veränderungen zur progredienten Herzmuskelschwäche bei (Narula et al., 1996; Übersicht bei Pieske, 1998).

In der Herzinsuffizienz zeigen sich charakteristische hämodynamische Veränderungen mit erhöhten Füllungsdrücken, vermindertem Herzminutenvolumen und erhöhten systemischen und pulmonalen Gefäßwiderständen.

Die Ursachen der Herzinsuffizienz sind vielseitig und verändern sich in ihren Anteilen. In der Framingham-Studie, die von 1948 bis 1987 im gleichnamigen Ort im US-Bundesstaat Massachusetts durchgeführt wurde, stieg der Anteil der ischämischen Herzerkrankungen als Grund für Herzinsuffizienz von 22% in den 1950er Jahren auf 67% in den 1980ern. Im gleichen Zeitraum sank der Anteil der Herzklappenfehler von 16 auf 10%. 74% der Erkrankten wiesen eine Hypertonie auf (Ho et al., 1993b).

I.2.2 Veränderung des myokardialen Kontraktionsverhaltens bei Herzinsuffizienz

Veränderungen auf der Ebene des Myokards betreffen die Herzmuskelzelle selbst sowie das Interstitium und können in Abhängigkeit von der Ätiologie auftreten (myozytäre Hypertrophie und diastolische Dysfunktion bei arterieller Hypertonie oder Aortenstenose; Narbengewebe bei Myokardinfarkt; diffuser Untergang von Myozyten bei Myokarditis; mitochondriale Dysfunktion beim seltenen Kearns-Sayres-Syndrom) oder unabhängig von der auslösenden Ursache als Ausdruck der Myokardschädigung beobachtet werden.

Obwohl die Ursachen sehr unterschiedlich sein können, sind die funktionellen Charakteristika des insuffizienten Myokards relativ einheitlich: Die Ca^{2+} -Homöostase ist gestört. Eine Verlangsamung der Kontraktion und Relaxation und eine Verlängerung des Aktionspotentials werden als erste Veränderungen festgestellt. Später folgen dann die reduzierte Kraftentwicklung der Muskelstreifen bzw. Verkürzung der Myozyten (Übersicht bei Houser et al., 2000).

Eine wichtige Beobachtung in vitro ist, daß nicht-insuffizientes und insuffizientes Myokard sich unter bestimmten Bedingungen (langsame Schlagfrequenz unter 0,5 Hz, niedrige extrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration, fehlende Katecholaminstimulation) in ihrem Kontraktionsverhalten nicht wesentlich voneinander unterscheiden. Insbesondere die maximale Verkürzung bzw. Kraft unterscheidet sich erst bei physiologischen Schlagfrequenzen (Harding et al., 1992; Davies CH et al., 1995; Übersicht bei Houser et al., 2000). Bei höheren Frequenzen steigt in insuffizientem Myokard die Auswurfleistung des Herzens nicht an, sondern bleibt unverändert oder fällt gar ab (Mulieri et al., 1992; Hasenfuss et al., 1994a; Pieske et al., 1995; Pieske et al., 1997; siehe auch Abschnitt I.3.2). Die positiv inotrope Antwort auf Katecholamine ist im insuffizienten Myokard vermindert. Als Ursache dieser Veränderungen wurde eine Herunterregulierung der β -Adrenozeptoren gefunden, die möglicherweise auf die erhöhte Katecholaminstimulation bei Herzinsuffizienz zurückzuführen ist (Bristow et al., 1982; Pieske et al., 1997; siehe auch Abschnitt I.3.4).

Die fundamentalen zellulären Veränderungen zeigen also eine Erhaltung der Kontraktilität bei sehr niedriger Belastung und eine stark verminderte kontraktile Reserve (Übersicht bei Houser et al., 2000). Beuckelmann et al. (1992) fanden an insuffizienten Myozyten, daß deren zytosolischer Ca^{2+} -Gehalt in Ruhe höher, während der Kontraktion aber niedriger war als derjenige nicht insuffizienter Zellen. Außerdem war die Zeit, die zur Absenkung des zytoplasmatischen Ca^{2+} benötigt wurde, bei den insuffizienten Zellen erhöht. Daraus resultierte eine Verlangsamung der Relaxation. Auf die Unterschiede zwischen insuffizienten und nicht insuffizienten Herzen in der Anpassung an Belastungen wird in Abschnitt I.3 genauer eingegangen.

I.3 Regulation der myokardialen Kontraktion

Nach einem Vorschlag von Blinks und Endoh (1986) können alle positiv inotropen Interventionen in drei Gruppen aufgeteilt werden, die sich auf die zentrale Rolle des Troponin C in der elektromechanischen Kopplung beziehen:

- „upstream“ bedeutet, daß sich Amplitude oder Verlauf des Ca^{2+} -Transienten ändern,

- „central“ werden sie genannt, wenn sich die Affinität des Troponin C für Ca^{2+} ändert, und als
- „downstream“- Mechanismen bezeichnet man schließlich solche, die die Ansprechbarkeit der Myofilamente für eine gegebene Ca^{2+} -Bindung am Troponin C verändern.

Mit Hilfe intrazellulärer Ca^{2+} -Indikatoren können „upstream“-Mechanismen von den anderen beiden unterschieden werden. Diese sind am intakten Myokard jedoch schwer zu differenzieren, weshalb sie häufig unter dem Terminus der erhöhten Ca^{2+} -Ansprechbarkeit der kontraktilen Proteine zusammengefaßt werden.

Im Folgenden sollen einige Regulationsmechanismen der myokardialen Kontraktilität näher betrachtet werden:

I.3.1 Sensitivität der Myofilamente

Frank (1895) und Starling (1918) beschrieben erstmals das Phänomen, daß ein zunehmender diastolischer Füllungsdruck (Vorlast) eine erhöhte systolische Kontraktionskraft zur Folge hat.

Zum Frank-Starling-Effekt bei menschlicher Herzinsuffizienz liegen widersprüchliche Daten vor: Während Schwinger et al. (1994b) den Verlust des Frank-Starling-Mechanismus bei terminaler Herzinsuffizienz postulierten, wiesen Vahl et al. (1997), Holubarsch et al. (1996) und Pieske et al. (1997) diesen auch bei schwerer Herzinsuffizienz weiterhin nach. Die dehnungsabhängige Kraftzunahme in den Präparaten ging dabei mit einer nur minimalen Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} einher. Daraus wurde gefolgert, daß der Haupteffekt auf eine Sensitivitätszunahme der Myofilamente zurückzuführen sei (Pieske et al., 1997). In Experimenten mit „skinned-fibers“-Präparaten, von denen nur der kontraktile Apparat erhalten war, konnte ebenfalls eine Sensitivitätszunahme desselben für Ca^{2+} mit zunehmender Dehnung gezeigt werden (Vahl et al., 1997, Holubarsch et al., 1996).

Die Ca^{2+} -Sensitivität der Myofilamente wird herabgesetzt durch Azidose, hohe Phosphat- und Mg^{+} -Spiegel, wie sie bei Ischämien auftreten. Außerdem reduziert β -adrenerge Stimulation die Ca^{2+} -Sensitivität der Myofilamente (siehe I.3.4), während Koffein, Imidazol- Derivate wie Carnosin und n-acetyl-Histidin (Harrison SA et al., 1986; Lamont und Miller, 1992) und neuere Substanzen wie z.B. Levosimendan (Hasenfuss et al., 1998) sie steigern. Auch milde Hypothermie (31 bis 35°C) erhöht die Ca^{2+} -Sensitivität der Myofilamente (Weisser et al., 2001).

I.3.2 Frequenzinotropie

Die Steigerung der Kontraktionskraft des Herzens durch höhere Frequenzen ist ein wichtiger Regulationsmechanismus des gesunden Herzens. Dieser Effekt wurde 1871 erstmals experimentell durch Bowditch am Froschherzen beschrieben und seither an verschiedenen Tierspezies und am Menschen bestätigt (Buckley et al., 1972; Mulieri et al., 1992; Hasenfuss et al., 1994a; Pieske et al., 1995). Vielfach wird in diesem Zusammenhang von Kraft-Frequenz-Beziehung (KFB) gesprochen, obwohl je nach experimentellem Ansatz entweder entwickelte Kraft (Muskelstreifen), Zellverkürzung (Einzelzellen) oder Druckentwicklung (Ganzherzmodell) gemessen werden.

Die positive Inotropie beruht auf einer Zunahme des intrazellulären Ca^{2+} -Transienten (Pieske et al., 1995). Die Zunahme der Kontraktionskraft erfolgt in zwei Phasen: Für die erste werden nur wenige Schläge benötigt. Sie beruht auf einer vermehrten Beladung des Sarkoplasmatischen Retikulums (SR) mit Ca^{2+} -Ionen. Das dafür nötige Ca^{2+} kann in die Zelle gelangen, weil die Offenwahrscheinlichkeit der sarkolemmalen Ca^{2+} -Kanäle mit steigender Stimulationsfrequenz ansteigt und die Öffnungsdauer der Ca^{2+} -Kanäle pro Zeiteinheit bei hohen Frequenzen zunimmt (Piot et al., 1996). Die zweite Phase, die im Minutenbereich wirkt und zu einem langsameren Anstieg der Kontraktionskraft führt, ist auf einen Anstieg des intrazellulären Na^+ zurückzuführen (Harrison SM et al., 1992). Sekundär führt dies infolge einer verminderten Elimination des Ca^{2+} durch den Natrium-Calcium-Austauscher (NCX) des Sarkolemm wiederum zu einem Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} .

Am insuffizienten Herzen ist der Bowditch-Effekt aufgehoben oder sogar umgekehrt. Das konnte sowohl in vitro (Feldman et al., 1988; Mulieri et al., 1992; Pieske et al., 1992) als auch in vivo (Feldman et al., 1988; Hasenfuss et al., 1994a) nachgewiesen werden. Parallel zur inversen Kraftentwicklung konnten Pieske et al. 1995 auch abnehmende Ca^{2+} -Transienten bei zunehmenden Frequenzen zeigen.

Dieser Befund spricht für einen Defekt des intrazellulären Ca^{2+} -Haushaltes als Grund für die negative Kraft-Frequenz-Beziehung. Verschiedene Autoren fanden in der Herzinsuffizienz herunterregulierte SERCA auf mRNA- und Proteinebene, jedoch nicht alle. Über eine mögliche Aktivitätsminderung besteht ebenfalls Uneinigkeit (Übersicht bei Houser et al., 2000; Hasenfuss et al., 1998a). Allerdings konnten Hasenfuss et al. (1994c) einen direkten Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der kontraktilen Dysfunktion und der verminderten Pumpenexpression zeigen. Neben der vermutlichen Abnahme der SERCA-Expression kann zudem die Funktion seines Regulators Phospholamban eine Rolle spielen: Phospholamban ist

in seiner mRNA-Expression in der Herzinsuffizienz herunterreguliert, aber in geringerem Maße als SERCA (Meyer et al., 1999). Phospholamban im dephosphorylierten Zustand hemmt die SERCA, im phosphorylierten Zustand steigert es die SERCA-Aktivität. Im Rahmen der gestörten β -adrenergen Signaltransduktion bei Herzinsuffizienz könnte ein reduzierter cAMP-Gehalt der Zelle demnach zu einer verminderten Phosphorylierung des Phospholambans führen und daraus eine verstärkte Inhibition der SERCA resultieren (Böhm et al., 1994).

Neben der verminderten Aktivität der SERCA stellt die vermehrte Expression und Aktivität des sarkolemmalen $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers (NCX) am insuffizienten Myokard einen weiteren wesentlichen pathophysiologischen Befund dar (Flesch et al., 1996). Es wurde angenommen, daß eine vermehrte Aktivität des NCX einer zytosolischen Ca^{2+} -Überladung - und somit einer diastolischen Dysfunktion - entgegenwirkt (Hasenfuss et al., 1999). Da SERCA und NCX um zytosolisches Ca^{2+} konkurrieren, könnte die gesteigerte NCX-Aktivität auch zu einer weiteren Ca^{2+} -Verarmung des sarkoplasmatischen Retikulums beitragen. Andererseits konnte gezeigt werden, daß im terminal insuffizienten Myokard eine reduzierte SERCA- und gesteigerte NCX-Aktivität zum Ca^{2+} -Einstrom während des verlängerten Aktionspotentials und somit zum langsameren Abfall des Ca^{2+} -Transienten beitragen (Weisser-Thomas et al., 2003; Piacentino et al., 2003).

I.3.3 Ca^{2+} - Erhöhung und Kontraktilität

Trotz hoher extrazellulärer Ca^{2+} -Konzentrationen von 10^{-3} mol/l liegt die diastolische Ca^{2+} -Konzentration in der Muskelzelle bei 10^{-7} bis 10^{-8} mol/l und steigt systolisch bis auf 10^{-5} mol/l an. Es besteht also ein transsarkolemmaler Ca^{2+} -Gradient von $[\text{Ca}^{2+}_o]/[\text{Ca}^{2+}_i]$ von >1000 . Das verdeutlicht die Bedeutung funktionierender sarkolemmaler und intrazellulärer Ca^{2+} -Stoffwechselprozesse.

Calcium spielt eine zentrale Rolle für die myokardiale Kontraktion. Maßgeblich für die Kontraktionskraft ist vor allem die kurzfristige Erhöhung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration unmittelbar nach der Depolarisation (Morgan und Morgan, 1984). Für eine halbmaximale Kontraktion werden etwa 600 nmol/l freies intrazelluläres Ca^{2+} benötigt (Bers 2002).

Durch eine Erhöhung der extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration läßt sich der transsarkolemmale Ca^{2+} -Einstrom und sekundär die Beladung des SR mit Ca^{2+} derart erhöhen, daß der maximal erreichbare positiv inotrope Effekt („kontraktile Reserve“) ausgeschöpft wird. Dieser kann als Bezugspunkt für die Charakterisierung der inotropen Wirkung anderer Interventionen am Herzen dienen.

I.3.4 β -Adrenozeptor-Stimulation

Die wichtigste Aufgabe des kardialen adrenergen Systems besteht darin, die myokardiale Funktion innerhalb kürzester Zeiträume zu modifizieren. Es bewirkt so eine schnelle Anpassung an kurzfristig erhöhten Sauerstoffbedarf des Organismus.

β -Adrenozeptor-Stimulation stimuliert ihrerseits ein GTP-bindendes Protein, G_s , das wiederum die Adenylatzyklase (AC) anregt, cAMP zu bilden. Dies aktiviert dann die Proteinkinase A (PKA). Diese Kinase phosphoryliert u.a. verschiedene Proteine, die in die elektromechanische Kopplung involviert sind, darunter Phospholamban, L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle, Ryanodinrezeptoren und Troponin I (Greengard 1978; Levitzki 1988; Robishaw und Foster, 1989; Fleming et al., 1992; Übersicht bei Bers 2002). Außerdem beeinflusst das G_s -Protein direkt sarkolemmale Ca^{2+} -Kanäle (Yatani und Brown, 1989).

Über eine Phosphorylierung des Phospholamban wird die Aktivität der SERCA erhöht und daher das Ca^{2+} schneller ins SR zurückgepumpt. Dieses und zu einem geringeren Teil die Desensitivierung des Troponin I für Ca^{2+} sind für den positiv lusitropen Effekt der β -Adrenozeptor-Stimulation verantwortlich (Li et al., 2000). Die schnellere Ca^{2+} -Aufnahme ins SR trägt zu einem höheren SR- Ca^{2+} -Gehalt bei. Darauf, und auf einem erhöhten Ca^{2+} -Einstrom über die phosphorylierten L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle, beruht hauptsächlich der positiv inotrope Effekt der β -Adrenozeptoragonisten (Bers, 2002). Über diese Kombination erhöht sich der Ca^{2+} -Transient beträchtlich und übertrifft in seinem positiv inotropen Effekt den negativ inotropen Effekt durch die Desensitivierung der Myofilamente, der auf der Phosphorylierung des Troponin I beruht (Kentish et al., 2001).

Am kontraktilem Apparat steigert β -Adrenozeptor-Stimulation die Anzahl der aktivierten Querbrücken pro Zeiteinheit und senkt das Kraft-Zeit-Integral des einzelnen Querbrückenzyklus. Die Steigerung des Energieverbrauchs übersteigt die der positiven Inotropie (Hasenfuss et al., 1994b).

Am gesunden menschlichen Herzen werden β_1 - und β_2 -Adrenozeptoren in einem Verhältnis von etwa 75:25% exprimiert. In der terminalen Herzinsuffizienz verschiebt sich das Verhältnis zu etwa 50:50%. Außerdem sind die verbleibenden Rezeptoren beider Unterklassen signifikant desensitiviert. Das wird v.a. einer erhöhten β -Adrenozeptor-Phosphorylierung und einer Hochregulation des inhibitorischen Vermittlerproteins G_i zugeschrieben (Port und Bristow, 2001).

Die Desensitivierung der β -Adrenozeptoren bei Herzinsuffizienz ist bedingt durch anhaltend erhöhte Katecholaminspiegel im Rahmen der sympathoadrenergen Gegenregulation gegenüber der verminderten Herzauswurfleistung. An dieser Stelle setzten Therapien mit β -

Adrenozeptor-Inhibitoren an, die die Mortalität bei herzinsuffizienten Patienten drastisch zu reduzieren vermochten (Bristow 2000).

Kubo et al. (2001) konnten an explantiertem menschlichen Myokard nachweisen, daß bei schwer herzinsuffizienten Patienten mit β -Adrenozeptor-Antagonisten-Therapie eine Normalisierung des SERCA-Proteingehaltes und des Ca^{2+} -Transienten gegenüber einer Gruppe ohne Vorbehandlung mit diesen Medikamenten eintrat. Das wird als ein möglicher Erklärungsansatz zur Wirkungsweise der β -Adrenozeptor-Antagonisten gesehen. Trotzdem hatten die Patienten weiterhin eine derartig niedrige Ejektionsfraktion, daß eine Transplantation unumgänglich blieb.

Das in den Versuchen der vorliegenden Arbeit verwendete Katecholamin Isoprenalin ist ein reiner β -Adrenozeptor-Agonist.

I.3.5 Isotonische und isometrische Kontraktion

Der Ablauf der Herzkontraktion besteht aus den Komponenten der isometrischen Kraftentwicklung, durch die im Ventrikel Druck aufgebaut wird, und einer isotonischen Verkürzung, durch die das Blut ausgeworfen wird. Im Experiment wird häufig nur eine der beiden Komponenten berücksichtigt. Beide Komponenten kommen im experimentellen Ganzherzmodell zum Zuge; bei Experimenten mit Muskelstreifen wird i.d.R. die isometrische, bei Experimenten mit Myozyten i.d.R. die isotonische Komponente der Kontraktion gemessen. Bei den in dieser Arbeit aufgeführten Experimenten ist nur die isotonische Verkürzung gemessen worden. Zu den Vor- und Nachteilen der Methode siehe Kap. V.1.1.

I.4 Zellkultur von Herzmuskelzellen

Frisch isolierte Kardiomyozyten verschiedener Spezies werden heute in der Erforschung der Herzinsuffizienz vielfach genutzt. Inzwischen werden damit auch zunehmend Studien durchgeführt, in denen Gentransfer eingesetzt wird, um veränderte Expressionsmuster der verschiedenen Proteine zu studieren. Das setzt voraus, daß die Zellen 24 bis 48 Stunden in Zellkultur gehalten werden müssen, damit die Proteinexpression des Transgens stattfinden kann.

Oftmals sind inzwischen Kardiomyozyten in Zellkultur gehalten worden, insbesondere neonatale und adulte Zellen kleiner Arten. Etliches ist über funktionelle, metabolische und elektrophysiologische Veränderungen im Verlauf der Zellkultur bekannt (Mitcheson et al., 1998; Pollack et al., 1991, Volz et al., 1991). Erstmals gelang es 1999 del Monte et al., isolierte humane Kardiomyozyten mit dem SERCA2a-Gen zu transfizieren. Vielfach konnten

Funktionsänderungen gesunden und insuffizienten Myokards durch Gentransfer erreicht werden (z.B. Akhter et al., 1997; Hajjar et al., 1998; Maurice et al., 1999). Durch Manipulation der Regulation einzelner Proteine eröffnen sich Möglichkeiten, sich deren Anteil am Krankheitsgeschehen des komplexen Phänomens Herzinsuffizienz anzunähern. Die Einflüsse von Zellkultur und adenoviraler Infektion per se wurden aber an isolierten menschlichen Myozyten nicht untersucht. Zur Beurteilung weiterer Studien wären Untersuchungen über diese Auswirkungen auf die Funktion der Zellen wünschenswert.

I.4.1 Primäre Zellkultur

Primäre Zellkultur mit embryonalen Herzzellen ist seit 1955 möglich (Cavanough, 1955). 1977 gelang es Jacobson erstmals, isolierte adulte Kardiomyozyten von Ratten in Kultur zu halten. Adultes Gewebe hat trotz schwierigerer Kultivierbarkeit Vorteile gegenüber neonatalen oder embryonalen Zellen, weil Änderungen im Expressionsmuster der Proteine im Laufe der Entwicklung die Übertragbarkeit der Ergebnisse von neonatalen auf adulte Organe problematisch erscheinen lassen (Mitcheson et al., 1998).

Nach Jacobson und Piper (1986) gibt es grundsätzlich zwei Ansätze, Myozyten zu kultivieren:

- 1) Das sogenannte „rapid-attachment“-Modell, in dem sich die Myozyten innerhalb weniger Stunden an eine beschichtete Kulturfläche anheften (bei adulten Myozyten werden i.d.R. Laminin oder Kollagen Typ IV verwendet [Borg und Terracio, 1990]). Sie benötigen keine Serumzugaben zum Medium und behalten lange ihre Struktur, leben aber nur bis 14 Tage.
- 2) Das „redifferenzierte“ Modell, bei dem dem Zellkulturmedium Serum beigemischt werden muß, und in dem keine Anheftungssubstanzen verwendet werden. Die Zellen werden abgerundet und verlieren ihre Querstreifung. Nach 2 bis 4 Tagen heften sie sich an der Zellkulturschale an. Sie bekommen Ausläufer und ändern ihre Ultrastruktur. Schließlich tendieren sie zu spontanen Kontraktionen (Mitcheson et al., 1998).

In dieser Studie wurden adulte Zellen gemäß der rapid-attachment-Methode kultiviert. Da menschliche Herzmuskelzellen schwierig zu kultivieren sind, wurde eine spezielle Modifikation der üblichen Zellkulturverfahren angewandt (siehe Methoden).

Was sind die Eigenschaften kultivierter Myozyten im Vergleich zu frisch isolierten Zellen? Bei frisch isolierten Zellen kommt es möglicherweise durch die Isolation selbst zu Membranschäden. Es konnte gezeigt werden, daß die Zellen gewisse Reparaturvorgänge nach der Isolation durchführen (Borg und Terracio 1990). Kultivierte Zellen sind über den Zeitrahmen für frisch isolierte Zellen (8 bis 12 Stunden) hinaus für länger dauernde Studien

brauchbar, was Experimente mit Manipulation des Umfeldes (z.B. Aufschlüsselung humoraler Einflüsse) einschließt oder Gentransfer zuläßt (Mitcheson et al., 1998). Zur meßbaren Veränderung der Proteinexpression benötigt eine Zelle mehrere Stunden. Die Nachteile der Zellkultur bestehen darin, daß die Zellen sich den Kulturbedingungen anpassen und das Ausmaß einer De-Differenzierung im Sinne einer Reversion zum fetalen Phänotyp unklar ist. So wurde z.B. die Expression von β -MHC (die nur in fetalem Myokard vorkommen) in verschiedenen Zellkulturen bestimmt. Sie waren teils erhöht (Bénaudeau et al., 1997, Medium enthielt Serum), teils nicht (Ellingsen et al., 1993, serumfreies Medium).

I.5 Viral vermittelter Gentransfer

In den letzten Jahren wurden die technischen Möglichkeiten geschaffen, die an der elektromechanischen Funktion des Herzens beteiligten Proteine in ihrem Muster durch virusgekoppelten Gentransfer zu verändern.

Drei Applikationsmöglichkeiten der Viren ins Myokard sind an Tieren beschrieben:

- die direkte intramyokardiale oder intraventrikuläre Injektion (Hajjar et al., 1998; v. Harsdorf et al., 1993)
- intrakoronare Perfusion im Ganzherz (Donahue et al., 1997)
- Infektion isolierter Myozyten (Hajjar et al., 1997).

Der in vivo Virus-gekoppelte Gentransfer ist ein experimentelles Verfahren, das für den Einsatz am Menschen noch nicht reif ist. Unter anderem stellen Immunabwehr sowie die Notwendigkeit riesiger Virusmengen eine Schwelle dar. Außerdem besteht die Gefahr, daß auch andere Zellen außer den gewünschten Kardiomyozyten infiziert werden. Experimentelle in vitro Ganzherz-Virusperfusion ist wegen der enormen benötigten Virusmengen am humanen Herzen ebenfalls nicht praktikabel - daher ist zur Zeit die Methode der Wahl, anhand des virusgekoppelten Gentransfers in Einzelmyozyten funktionelle Konsequenzen veränderter Proteinmuster zu erforschen.

I.5.1 Verwendete Vektoren

Der ideale Vektor für eine genetische Beeinflussung des Myokards würde eine hohe Rate an Zellen stabil über lange Zeit infizieren, Platz für große Genprodukte bieten und keine immunologischen oder toxischen Reaktionen hervorrufen. Es sollte möglich sein, ihn wahlweise intrakoronar oder intramyokardial zu applizieren.

Momentan ist ein solcher Vektor nicht in Sicht.

Zu den gebräuchlichen Vektoren für experimentellen Gentransfer zählen die rekombinanten Adenoviren (im Folgenden: Ad), die nicht replikationsfähig sind. Rekombinante Adenoviren

sind häufig genutzte Vektoren in der Grundlagenforschung: sie sind relativ leicht zu produzieren und lassen sich mit Transgenen bis zu einer Größe von 7,5 kb (Kilobasen) beladen. Sie werden sowohl für die Infektion von Zellkulturen (Donahue et al., 1997; del Monte et al., 1999), von ex-vivo-Multizellularpräparaten (Lehnart et al., 2000) als auch für in-vivo-Versuche genutzt (Maurice et al., 1999). Hier ist allerdings die Dauer des nachzuweisenden Transgens begrenzt auf 2-3 Wochen (ebd.).

Alternativen bestehen z.B. in rekombinanten Adeno-assoziierten Virus-Vektoren (AAV). Diese DNA-Einzelstrangviren ermöglichen im Mausmodell in vivo sowohl nach intramyokardialer als auch nach intrakoronarer Applikation stabil über 2-8 Wochen anhaltend den Nachweis des Transgens; dieser betrug jedoch maximal 25% der Effizienz der adenoviralen Kontrollgruppe (Svensson et al., 1999). Außerdem liegt die Kapazität dieses Vektors für Transgene bei maximal 4,5 kb Länge. Zudem scheinen AAV einer raschen molekularen Evolution zu unterliegen, die man sonst nur von RNA-Viren kennt (Gao et al., 2003). Dies steht einer raschen in-vivo-Anwendung - zumindest beim Menschen - entgegen.

I.5.2 AdLacZ

Bei dem in den Versuchen der vorliegenden Arbeit verwendeten Virus handelt es sich um ein rekombinantes Adenovirus, das durch Deletion der Region E1 seine Replikationsfähigkeit verloren hat.

Das die E. coli- β -Galaktosidase kodierende Gen LacZ wird unter einem humanen CMV-Promotor ebenfalls weitverbreitet in der Grundlagenforschung eingesetzt, in der Regel als Negativkontrolle neben Funktionsgenen (z.B. Maurice et al., 1999). Vorteilhaft ist der einfache Nachweis mittels Färbung; nachteilig ist zu bewerten, daß sich erst im Anschluß an das funktionelle Experiment an der toten Zelle durch Färbung nachweisen läßt, daß die Zelle transfiziert war. Andere Proteine, z.B. das green fluorescent protein GFP, können hingegen im vitalen Zustand auf erfolgte Infektion und Expression des Transgens hin untersucht werden.

II. Fragestellung

Zunächst sollte der Einfluß von primärer Zellkultur (über 24 und 48 h) auf das Kontraktionsverhalten isolierter adulter Herzmuskelzellen von Menschen untersucht werden. Dann sollte das Inotropieverhalten dieser Zellen anhand des Einflusses von Frequenzerhöhung (0,25 bis 2,5 Hz), β -Adrenozeptorstimulation (Isoprenalin) und Erhöhung des extrazellulären Calciums (1,0 bis 15 mM) geprüft werden. Im dritten Schritt sollte ein Adenovirus-gekoppelter Gentransfer des Vektors LacZ durchgeführt werden und das Kontraktionsverhalten der so genetisch veränderten Myozyten dem Kontraktionsverhalten ohne virusvermittelten Gentransfer gegenübergestellt werden.

Die zugrundeliegende Hypothese dieser Arbeit war es, daß sowohl die primäre Zellkultur per se als auch der virusvermittelte Transfer eines Reportergens Einfluß haben auf das Kontraktionsverhalten der humanen Kardiomyozyten. Diese Veränderungen sollten für den Transfer eines funktionellen Gens und dessen Auswirkungen auf die Kontraktion berücksichtigt werden.

III. Methoden

III.1 Untersuchtes Gewebe

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 156 Kardiomyozyten aus 38 Herzen (14 ICM, 23 DCM, 1 HNOCM) untersucht.

Das verwendete humane Ventrikelmyokard stammte von Patienten, die sich aufgrund einer terminalen Herzinsuffizienz (NYHA Stadium IV) einer orthotopen Herztransplantation unterziehen mußten. Wir bezogen es aus dem Herzzentrum Nordrhein-Westfalen in Bad Oeynhausen sowie von den Unikliniken Göttingen, Heidelberg und Freiburg.

Die Patienten konnten klinisch und durch Voruntersuchungen (Herzkatheteruntersuchung, Echokardiographie) und die daraus ermittelten klinischen Parameter (Ejektionsfraktion, Herzindex, pulmonalkapillärer Verschußdruck) dem Stadium NYHA IV zugeordnet werden. Von den 38 herztransplantierten Patienten, deren Herzen untersucht wurden, waren 8 weiblich und 30 männlich. Der Altersdurchschnitt betrug $56,1 \pm 9,7$ Jahre. Die durchschnittliche Ejektionsfraktion der untersuchten Herzen lag bei $26 \pm 7,8\%$, wobei diese bei 9 Patienten nicht zu ermitteln war. Zum Zeitpunkt der Transplantation hatten die Patienten folgende

Vormedikation erhalten:

- 29 Patienten bekamen Diuretika,
- 25 Digitalis,
- 22 ACE-Inhibitoren,
- 7 AT-II-Rezeptorblocker,
- 15 β -Adrenozeptorblocker,
- 5 Calciumantagonisten,
- 6 Phosphodiesterasehemmer,
- 6 Vasodilanzien,
- 9 Antiarrhythmika (außer β -Blocker),
- 24 waren mit Antikoagulanzen vorbehandelt und
- 6 Patienten erhielten präoperativ Katecholamine.

Bei 4 Patienten war die Medikation nicht zu eruieren. 3 Patienten waren mit einem linksventrikulären assist-device-System ausgestattet. Eine Tabelle der Patientendaten ist im Anhang zu finden.

Die Untersuchungen waren durch die Ethikkommission der Universität Göttingen geprüft und genehmigt.

III. 2 Tyrodelösungen

Es wurden vier unterschiedliche Lösungen benötigt:

- für Transport und Aufbewahrung des Myokards: HTK- Lösung nach Bretschneider und eine modifizierte Krebs- Henseleit- Lösung (KHL 1)
- für die Isolierung der Zellen: modifizierte Krebs- Henseleit- Lösung (KHL 2) mit wechselnden Zusätzen
- im Versuch: modifizierte Medium- 199- Lösung (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München; Nr. M-7528), im folgenden M 199 genannt. Der Gehalt der Lösung an ionisiertem Calcium betrug 1,5 mmol/l.

Die Zusammensetzung der Lösungen ist in Tabelle III.1 aufgeführt:

Inhaltsstoffe (mmol/l)	Lösung n. Bretschneider	KHL-1	KHL-2	Zusätze zu M 199
NaCl	15	127	130	
KCl	9	2,3	5,4	
MgSO ₄		0,6	1,2	
MgCl ₂ x 6H ₂ O	4			
Histidin-HClx 1H ₂ O	18			
Histidin	180			
Tryptophan	2			
Mannitol	30			
CaCl ₂	0,015	0,2		
KOH-2-Oxopentandioat	1			
NaHCO ₃		25		
KH ₂ PO ₄		1,3		
Pyruvat			2,0	
Glucose		11,2	12,5	
HEPES			5,0	
Phenolrot			0,05	
Lactat (flüssig)			1,0	
2-,3-Butandionmonoxim		30	20	
Taurin			10	5
D,L-Carnitin				2
Kreatin				5
L-Glutamin				2
Penicillin				100 I.E./ml
Streptomycin				0,1 mg/ml
Altinsulin		5 I.E./l		

Tabelle III.1: Zusammensetzung der verwendeten Lösungen in mmol/l. Für M199 sind nur die Zusätze aufgeführt.

KHL 1 und M 199 wurden mit Carbogen (95% O₂, 5% CO₂) über Glasfritten begast, KHL 2 mit O₂. Bei KHL 2 mußte außerdem der pH-Wert auf 7,4 eingestellt werden.

III.2.1. 2-,3-Butandionmonoxim (BDM)

Während Transport und Isolation wurde den Lösungen die Phosphatase BDM zur Myokardprotektion beigelegt. Aus früheren Untersuchungen ist bekannt, daß sie durch Blockierung der Ca^{2+} - Bindungsstellen am Troponin C und der Ca^{2+} - Kanäle die elektromechanische Kopplung und daraus resultierende Kontraktionen bzw. Kontrakturen konzentrationsabhängig vermindert bzw. verhindert und so den Sauerstoffbedarf senkt. Dadurch wird das Myokard während der Transportzeit geschützt. Verletzungen von Zellen während scharfer Präparation führen ebenfalls weniger zum Absterben benachbarter Zellen. Die BDM-Wirkung ist zudem durch Auswaschen reversibel (Mulieri et al., 1989; Schwinger et al., 1994a).

III.3. Entnahme des Herzens und Myokardtransport

Nach der Explantation des terminal insuffizienten Herzens im Rahmen der Herztransplantation wurde das Myokard unverzüglich in 4°C kalte kardioplegische Lösung nach Bretschneider gegeben und restliches Blut ausgewaschen. Das war erforderlich, weil die warme Ischämiezeit nach Explantation zur Myokardprotektion so kurz wie möglich gehalten werden mußte. Ein Kontakt mit den BDM enthaltenden Lösungen sollte erst nach der dann folgenden Entnahme von Proben für molekularbiologische Untersuchungen der Arbeitsgruppe erfolgen.

Zur weiteren Aufbewahrung und zum Transport ins Labor wurde das Gewebe nach 5- 20 Minuten in 4- 10° C kalte, BDM-haltige KHL 1 gegeben, welche zur pH-Wert-Einstellung und Oxygenierung mit Carbogen (95% O_2 , 5% CO_2) durchperlt wurde.

III.4. Myozytenisolation

Ein linksventrikuläres Myokardareal mit versorgendem Koronarast (mögl. RD1 oder RM1) wurde exzidiert. Der Koronarast wurde mit einer Venenverweilkanüle (Vasofix, Braun, Melsungen) der Größe 16- 20 G, je nach Gefäßkaliber, kanüliert und diese mit chirurgischem Nahtmaterial (Mersilene 4 metric SH, Ethicon) am Myokard fixiert. In einem stützenden Kunststofftrichter wurde das Myokard nun in eine selbstgefertigte Perfusionsanlage eingehängt (siehe Abb. III.1). Gefäßäste und sickernde Areale wurden am Rand des Myokardstückes mit Ligaturclips (Titan, Größe: mittel; Pilling-Weck) verschlossen, bis das Myokard gut perfundiert war. Die Perfusion wurde bei 37° C mit einer Geschwindigkeit von 10 ml/min nach dem folgenden Regime durchgeführt:

- 300ml KHL 2 (20-30min), nominell Ca^{2+} -frei, nicht rezirkulierend

III. Material & Methoden

- 100ml KHL 2 mit 180 Units/ml Collagenase und 50 $\mu\text{mol/l}$ Ca^{2+} rezirkulierend für 30 min
- 150ml KHL 2 mit 200 $\mu\text{mol/l}$ Ca^{2+} (10 min), nicht rezirkulierend



Abb. III.1: Anlage zur Myozytenisolation.

1: Flüssigkeitsreservoir, 2:Luftfalle, 3:Behälter für das Myokard. 4:Rollenpumpe zum Transport der Isolationslösungen. 5:Wasserbad mit Umwälzpumpe, wärmt die Behälter 1-3 vor.

Das so behandelte Myokardstück wurde nun in KHL 2 mit 200mM Ca^{2+} und 2% Albumin (bovines Serumalbumin, Sigma) gegeben. Mit einer Schere wurde das Stück in der Mitte durchgeteilt, alle angedauten Teile vorsichtig herausgeschabt und mit einer weitlumigen Pipette dissoziiert. Der so gewonnene Zellbrei wurde nun wieder mit obiger KHL-Zubereitung aufgeschwemmt und durch einen Gazefilter mit einer Maschenweite von 0,4 mm gegeben. Die übrigen Teile wurden verworfen.

Die Myozytensuspension wurde in 50-ml-Röhrchen (Falcon) aufgefangen und sedimentiert. Nach 5- 15 min hatte sich am Boden der Röhrchen ein Pellet aus Myozyten gebildet. Der Überstand wurde abpipettiert und frische Lösung dazugegeben. Dieser Waschvorgang wurde 3-5mal wiederholt.

Der Anteil lebender Zellen in der Suspension betrug bis zu 60%, meist jedoch um 10%.

Die Zellen für die Akutversuche wurden bei Raumtemperatur in KHL 2 mit 200mM Ca^{2+} und 2% Albumin aufbewahrt und mit Sauerstoff begast.

III.5. Zellkultur

III.5.1 Beschichtung der Kulturplatten

Die Schälchen, in denen die Zellen kultiviert und später auch gemessen wurden, waren mit Laminin in einer Verdünnung von 50 µmol/l beschichtet. Dies geschah unter sterilen Bedingungen mit etwa 0,5 ml pro Schälchen (Durchmesser 35mm, Falcon). Nachdem die Flüssigkeit ganz getrocknet war, konnten die im Voraus beschichteten Platten bei -20°C aufbewahrt werden. Vor Gebrauch mußte das Laminin lediglich einmal mit Medium M199 angespült werden.

III.5.2 Kultivierung der Zellen

Die Zellen wurden schrittweise mit modifiziertem Medium M199 versetzt, um den Ca²⁺-Gehalt der Lösung nicht zu rasch anzuheben. Abhängig von der Zellausbeute in der Suspension wurden sie danach noch einige Male mit M199 gewaschen, um den Anteil toter Zellen zu senken. Danach wurde die Anzahl pro ml in einer Neubauer- Zählkammer bestimmt und etwa 6000 Zellen pro Schälchen ausplattiert. Nach ca. zwei Stunden wurde das M199 durch frisches ersetzt, wobei die nicht angehefteten Zellen und Zelltrümmer abgewaschen wurden. Die Platten wurden in einem Zellkulturschrank bei 37°C, 90% Luftfeuchtigkeit und einem CO₂- Gehalt von 5% aufbewahrt.

III.6. Adenoviral vermittelter Gentransfer

Eine Gruppe von Zellen wurde einem Adenovirus-vermittelten Gentransfer mit einem Nicht-Funktionsprotein (β-Galaktosidase, β-Gal) unterzogen. Damit sollten die Auswirkungen viraler Infektion und veränderter Proteinexpression der Zelle auf ihre kontraktile Eigenschaften geprüft werden. Es wurde ein rekombinantes Adenovirus Typ 5 verwendet, das das bakterielle LacZ-Gen unter einem CMV-Promotor exprimiert (Ad-CMV-LacZ). Die Viren wurden freundlicherweise bereitgestellt von Dr. J. Prestle, Arbeitsgruppe Prof. G. Hasenfuss, Göttingen. Sie waren nach Standardverfahren generiert und aufgereinigt worden (Graham und Prevec, 1991).

Zwei Stunden nach Ausbringen der Zellen auf die laminierten Kulturschalen wurden diese mit den Adenoviren infiziert. Die multiplicity of infection (MOI, Menge der infektiösen Partikel pro Zelle) betrug 500 oder 1000 pfu/Zelle. Nach einer Einwirkzeit von zwei Stunden wurden die Zellen zweifach mit frischem Medium M 199 abgespült und für 48 Stunden kultiviert.

Die erfolgte β -Gal- Expression konnte histochemisch nachgewiesen werden mit einer Färbung mit 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galaktopyranosid (X-Gal) für eine Stunde bei 37°C (Baudet et al., 2001).

III.7. Kontraktilitätsmessung

III.7.1. Versuchsaufbau

III.7.1.1. Meßapparaturen

Die Messungen wurden unter einem Inversionsmikroskop (Diaphot 300, Nikon) bei 400-



Abb. III.2: Mikroskop mit Zellbad.

1 Mikroskop, 2 Zellbad, von dem nach rechts und links Schläuche zum beheizenden Wasserbad abgehen. Über einen seitlichen optischen Ausgang ist die Kamera (3) angeschlossen. Auf der Abbildung fehlen die Perfusionsschläuche und Elektroden im Zellbad.

facher Vergrößerung durchgeführt. Über eine Kamera (FTM 800, Philips) wurde die zu vermessende Zelle auf einem Monitor sichtbar gemacht und mit einem Video-edge-detection-System (Crescent Electronics, Utah) vermessen.

Ein parallelgeschalteter Videorecorder (HV-MX1 Aiwa) zeichnete den Versuch auf und machte eine ggf. erforderliche Nachauswertung möglich. Die Meßsignale wurden an den PC

(Pentium 166 MHz MMX- Prozessor, Pyramid, Freiburg) geleitet, wo sie mit einem speziell für dieses Labor geschriebenen Programm (Prof. Janssen) auf Basis einer Labview- Software (National Instruments, Texas) visualisiert und auswertbar gemacht wurden. Aus jeweils fünf aufeinanderfolgenden Verkürzungen wurde ein Mittelwert errechnet, der gespeichert werden konnte. Die Auswertung erfolgte mit einem auf Labview basierenden Programm, mit Excel 7.0 (Microsoft) und Sigma Plot, Version 2.0 (Jandell Scientific).

III.7.1.2. Zellbad

Das Zellbad (HCB 101, Crescent Electronics, East Sandy, Utah) hatte austauschbare Grundplatten (Glasplättchen, rund, Durchmesser 3,5 cm, Krannich, Göttingen), die mit Laminin (siehe auch III.5.1.) überzogen und mit wärmeleitendem Silikon im Bad befestigt waren. Das Zellbad wurde über ein Wasserbad auf 37° C geheizt. Der Zu- und Abfluß von Versuchslösungen wurde über eine Rollenpumpe (Ismatec) gesteuert. Die Vorratsbehälter (Schott), in denen die Lösungen auch begast wurden, wurden genau wie die zuführenden Schläuche über das Wasserbad beheizt. Die Temperatur im Zellbad wurde mit einem Meßfühler kontrolliert und betrug 36° bis 37° C.

III.7.1.3. Stimulation

Zur Messung wurden die Myozyten über eine bipolare Stimulationsanlage (RAP Montgomery, London) mit Titanelektroden stimuliert. Am Stimulator waren Spannung und Frequenz wählbar. Die Myozyten wurden mit einer Spannung von etwa 20 % über Erregbarkeitsschwelle stimuliert, in der Regel mit 10- 20 mV. Die Messungen mit Pharmakaintervention wurden bei 0,5 Hz durchgeführt, die Verkürzungs- Frequenz- Beziehungs- Versuche mit 0,25 bis 2,5 Hz.

III.7.2 Versuchsdurchführung

Etwa 0,5 ml Myozytensuspension wurde mit ca. 2 ml M 199 in das Zellbad gegeben. Nach ungefähr 5 min, wenn sich die Zellen abgesetzt und angeheftet hatten, wurde die Perfusion gestartet. Nach weiteren 5 min, in denen das BDM ausgewaschen worden war, konnten der Perfusionskreislauf und die Stimulation gestartet werden. In 40-facher Vergrößerung wurde nun eine Zelle ausgewählt, die morphologisch intakt war. Als Kriterien galten: erkennbare Querstreifung, klare, glatte Randstruktur, keine erkennbaren Membranvakoulen. Auf funktionelle Intaktheit wurde geschlossen, wenn die Zelle bei Stimulation konstant kontrahierte.

Bei einer nach obigen Kriterien ausgewählte Zelle wurde nun bei 400-facher Vergrößerung der Meßvorgang gestartet. Wenn die Zelle in ihrem Verkürzungsverhalten einen *steady state* erreicht hatte, konnte das Experiment beginnen.

Alle Versuche wurden bei 35,5° bis 37,5° C durchgeführt. Als Perfusionsmedium wurde M199 mit den in Tabelle III.1 genannten Zusätzen benutzt.

III.7.2.1. Messungen an frisch isolierten und an kultivierten Zellen

Mit den nachfolgenden Versuchen sollte das Verhalten von humanen Kardiomyozyten vor und nach Kultivierung über zwei Tage charakterisiert werden. Diese Versuche sollten Grundlage eventueller Langzeitexperimente mit endogenen Peptiden sein und eine Basis für die Interpretation von Gentransfer- Experimenten darstellen.

Die Messungen erfolgten direkt nach der Isolation („0 h“) sowie nach 24 und 48 Stunden.

III.7.2.1.1. Verkürzungs- Frequenz- Beziehung

Der Versuch begann mit einer Frequenz von 0,25 Hz und es wurden jeweils nach Erreichen des *steady state* Frequenzen von 0,5/ 1/ 1,5/ 2/ 2,5/0,5 Hz gewählt.

III.7.2.1.2. Calcium Konzentration- Wirkungs- Kurve

Ausgehend von der basalen Ca^{2+} -Konzentration von 1,5 mmol/l im M 199 wurde diese folgendermaßen gesteigert (in mmol/l): 1,85/ 2,5/ 3,2/ 5,6/ 7,2/ 9/ 12/ 15.

III.7.2.1.3. Isoprenalin

Es wurde teils als Konzentrations- Wirkungs- Kurve additiv, teils als Eindosisexperiment, Isoprenalin in Konzentrationen zwischen 1 nmol/l und 10 $\mu\text{mol/l}$ auf die Zellen gegeben. Nach einer Einwirkungszeit von 3-5 Minuten wurde die Veränderung der Kontraktion und Relaxation registriert.

III.8. Auswertung

III.8.1. Auswertung der Daten

Die Auswertung der Daten erfolgte ebenfalls mit einem speziell für dieses Labor von Prof. Janssen geschriebenen Programm, das auf einer Labview- Software (National Instruments, Texas) basierte. Jeweils drei Messwerte (die jeder aus fünf Einzelmessungen gemittelt waren) wurden in einer Excel- Datei zu einem Mittelwert verrechnet. Diese Werte wurden in eine Sigma- Plot Datei übertragen, in der die grafische Darstellung erfolgte.

Es wurden für jede Kontraktion über maximal 0,9 Sekunden die folgenden Parameter erfaßt:

- Absolute Zellverkürzung (μm)
- Verkürzungsfraction (in % der Zelllänge)
- Verkürzungs- und Relaxationsgeschwindigkeit ($\mu\text{m/s}$)
- Zeit bis zur maximalen Kontraktionsamplitude (time to peak shortening, TPS; ms)
- Zeit bis zur 50%igen Relaxation ($RT_{50\%}$; ms).

Um die Zellverkürzung bei unterschiedlich großen Zellen innerhalb der verschiedenen Versuchsreihen vergleichbar zu machen, wurde die Verkürzungsfraction als relativer Parameter (in % der Zelllänge) gewählt.

III.8.2. Statistische Auswertung

Bei der statistischen Auswertung half freundlicherweise Herr Sebastian Domhof vom Institut für Medizinische Statistik der Universität Göttingen (Direktor Prof. Brunner). Die Statistik wurde im Programm SAS nach folgendem Vorgehen berechnet:

III.8.2.1. Mittelwerte und Standardabweichung

Für alle Beobachtungen unter einer bestimmten Bedingung (Intervention mit gleich alten Zellen) und einer bestimmten Intervention wurde der Mittelwert X_k , $k=1, \dots, n$ berechnet. Dabei stand der Index k für die verschiedenen Herzen, und n war somit die Anzahl der Herzen, an denen Beobachtungen unter der betrachteten Bedingung und Intervention vorlagen. Der Erwartungswert $\mu=E(X_k)$ wurde geschätzt durch das ungewichtete Mittel

$$\hat{\mu} = \bar{X} = \frac{1}{n} \sum_{k=1}^n X_k .$$

Als Schätzer für die Standardabweichung von $\hat{\mu}$ wurde wie üblich verwendet

$$\frac{1}{n} \sqrt{\sum_{k=1}^n (X_k - \bar{X})^2} .$$

III.8.2.2. Paarvergleiche

Paarvergleiche wurden für Vergleiche nach unterschiedlich langer Zellkulturdauer benötigt. Diese Berechnung wurde dadurch komplizierter, daß Mittelwerte von Beobachtungen an Herzen in zwei „Stufen“ möglich waren: Für jedes Herz konnte ein Paar von Mittelwerten (X_{k1} , X_{k2}) (z.B. frisch isolierte Zellen vs. 24h kultivierte Zellen aus dem selben Herzen) oder nur einer der Mittelwerte X_{k1} oder X_{k2} vorliegen (aus diesem Herzen z.B. nur frisch isolierte

Zellen gemessen). Zur Kennzeichnung, welcher Fall vorlag, wurden die Variablen λ_{ks} , $k=1, \dots, n$, $s=1,2$, eingeführt, die durch

$$\lambda_{ks} = \begin{cases} 0 & : X_{ks} \text{ wurde nicht beobachtet,} \\ 1 & : X_{ks} \text{ wurde beobachtet,} \end{cases}$$

definiert waren. Zu testen war die Hypothese

$$H_0 : \mu_1 - \mu_2 = E(X_{k1}) - E(X_{k2}) = 0 .$$

Die Teststatistik beruhte daher auf dem Schätzer

$$\hat{\mu}_1 - \hat{\mu}_2 = \bar{X}_{\cdot 1} - \bar{X}_{\cdot 2} = \frac{1}{\lambda_{\cdot 1}} \sum_{\substack{k=1 \\ \lambda_{k1}=1}}^n X_{k1} - \frac{1}{\lambda_{\cdot 2}} \sum_{\substack{k=1 \\ \lambda_{k2}=1}}^n X_{k2}$$

für die Differenz $\mu_1 - \mu_2$. Dabei bezeichnete $\lambda_{\cdot s}$ für $s = 1,2$ die Anzahl der Herzen, an denen Beobachtungen in Stufe s vorlagen, das hieß

$$\lambda_{\cdot s} = \sum_{k=1}^s \lambda_{ks} .$$

Bei der Schätzung der Varianz $\sigma^2 = \text{Var}(\hat{\mu}_1 - \hat{\mu}_2)$ mußte die Abhängigkeitsstruktur der Beobachtungen berücksichtigt werden. Somit ergab sich

$$\begin{aligned} \hat{\sigma}^2 &= \frac{1}{\lambda_{\cdot 1}^2} \sum_{\substack{k=1 \\ \lambda_{k1}=1}}^n (X_{k1} - \bar{X}_{\cdot 1})^2 - \frac{2}{\lambda_{\cdot 1} \lambda_{\cdot 2}} \sum_{\substack{k=1 \\ \lambda_{k1}=\lambda_{k2}=1}}^n (X_{k1} - \bar{X}_{\cdot 1})(X_{k2} - \bar{X}_{\cdot 2}) \\ &+ \frac{1}{\lambda_{\cdot 2}^2} \sum_{\substack{k=1 \\ \lambda_{k2}=1}}^n (X_{k2} - \bar{X}_{\cdot 2})^2 . \end{aligned}$$

Der Test beruhte dann auf der asymptotischen Standardnormalverteilung der Teststatistik

$$T = \frac{\hat{\mu}_1 - \hat{\mu}_2}{\hat{\sigma}} ,$$

das hieß, daß sich als zweiseitiger p -Wert

$$2 \min\{\Phi(T), 1 - \Phi(T)\}$$

ergab, wobei Φ die Verteilungsfunktion der Standardnormalverteilung war.

Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes. Als signifikant angesehen wurden Unterschiede mit einem $p < 0,05$.

IV. Ergebnisse

IV.1 Patientendaten

Für diese Arbeit wurden insgesamt 156 Zellen aus 38 Herzen, 30 männlich und 8 weiblich, mit ischämischer (n=14) und mit dilatativer (n=23) sowie hypertropher nicht-obstruktiver (n=1) Kardiomyopathie untersucht. Der Altersdurchschnitt der Patienten betrug $56,1 \pm 9,7$ Jahre.

IV.2 Morphologie und funktionelle Intaktheit der Myozyten

IV.2.1 Frisch isolierte Zellen

Als Kriterien für die morphologische Intaktheit der Myozyten galten klar erhaltene Zellgrenzen, eine sichtbare Querstreifung und das Fehlen von Vakuolen und hyperkontrahierten Zellarealen. Abb. IV.1 zeigt eine repräsentative Zelle.

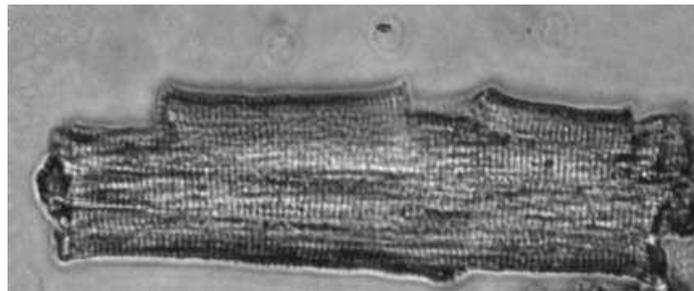


Abb. IV.1: Frisch isolierter humaner Kardiomyozyt; Originalgröße ca 100 μ m. Zellgrenzen und Querstreifung sind klar erkennbar, Membraneinstülpungen nicht vorhanden.

Die funktionelle Intaktheit der Zelle war durch gleichmäßige Kontraktionen unter elektrischer Feldstimulation und das Fehlen von Spontankontraktionen definiert. In die Auswertung gingen nur Zellen mit einer Verkürzungsfraction von mindestens 2 % der Ruhezelllänge ein, die außerdem über eine Einschlagphase von 5 Minuten konstante Kontraktionen zeigten. Die so ausgewählten Zellen wurden direkt für Experimente verwendet.

IV.2.2 Zellkultur

Es gelang, nach 24 und nach 48 Stunden in primärer Zellkultur morphologisch und funktionell intakte Zellen zu untersuchen. Nach 2 Tagen in Zellkultur waren noch 0,1-10 % der Zellen nach den o.g. Kriterien morphologisch und funktionell funktionstüchtig.

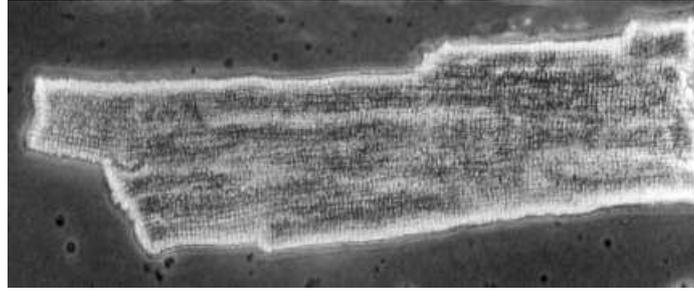


Abb. IV.2: Humaner Kardiomyozyt nach 48 Stunden in primärer Zellkultur; Länge ca 150 μm . Zellgrenzen und Querstreifung sind erkennbar, Membraneinstülpungen nicht vorhanden.

Die Querstreifung allerdings war teilweise etwas weniger klar zu sehen und die Zellgrenzen zeigten leicht ausfließende Ränder. Abb. IV.2 zeigt ein repräsentatives Bild einer Zelle nach 48 Stunden in primärer Zellkultur.

IV.2.3 Adenovirus-gekoppelter Gentransfer des β -Galaktosidase-Gens

Auch die primäre Zellkultur über zwei Tage mit zusätzlichem Adenovirus-gekoppelten Gentransfer mit dem AdLacZ-Virus lieferte morphologisch einwandfreie Zellen, wie Abb. IV.3 zeigt.

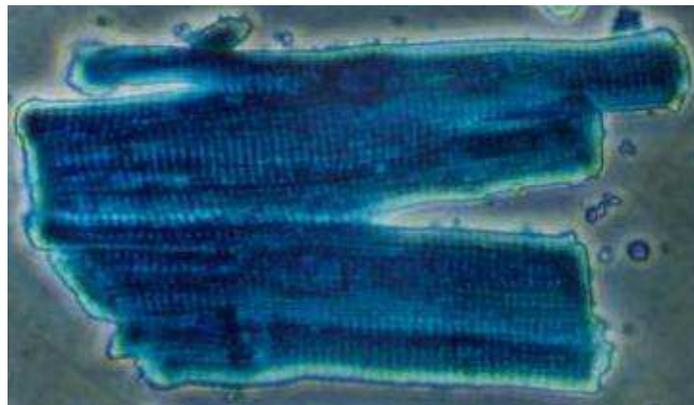


Abb. IV.3: Repräsentative morphologisch intakte Zelle nach Transfektion mit AdLacZ-Virus und 48h Zellkultur; Länge ca. 110 μm . Die Blaufärbung ist bedingt durch die X-Gal-Färbung zum Nachweis der erfolgreichen Transfektion. (Der Nachweis der erfolgreich durchgeführten Transfektion wurde mit einer Anfärbung der in eukaryoten Zellen normalerweise nicht exprimierten β -Galaktosidase erbracht (X-Gal-Färbung).)

IV.3 Basale Funktionsparameter

Die untersuchten Zellen wurden zunächst mit einer Frequenz von 0,5 Hz elektrisch stimuliert. Unter *steady-state*-Bedingungen wurde dann die basale Kontraktion (Zellverkürzung) untersucht.

Die frisch isolierten Zellen hatten in Relaxation eine mittlere Zelllänge von $126 \pm 4 \mu\text{m}$. Nach 24 und 48 Stunden in Zellkultur unterschieden sich die Zellen in ihrer mittleren Zelllänge davon nicht signifikant; allein diejenigen Zellen, die einem Adenovirus-vermittelten

Gentransfer unterzogen und 48 Stunden kultiviert worden waren, wiesen eine signifikant größere diastolische Zelllänge auf als die frisch isolierten. Die genauen Werte zeigt Tabelle IV.1.

Die mittlere Verkürzungsfraction der frisch isolierten Myozyten bei einer Frequenz von 0,5 Hz lag bei $4,7 \pm 0,2$ % der Ruhezelllänge, die Zeit vom Stimulationsimpuls bis zur maximalen Verkürzung (TPS) bei 251 ± 10 ms. Die halbmaximale Relaxation ($RT_{50\%}$) betrug im Durchschnitt 108 ± 9 ms.

Im Vergleich dazu betrug die Verkürzungsfraction nach einem Tag in Zellkultur durchschnittlich $3,7 \pm 0,3$ % ($p < 0,01$), die TPS stieg auf 327 ± 19 ms ($p < 0,01$) und die $RT_{50\%}$ auf 194 ± 22 ms ($p < 0,01$).

Nach 48-stündiger Zellkultur belief sich die Verkürzungsfraction auf $4,1 \pm 0,5$ % (n.s. gegenüber den frisch isolierten Zellen). Die TPS war auf 306 ± 18 ms ($p < 0,01$) und die $RT_{50\%}$ auf 173 ± 17 ms ($p < 0,01$) angestiegen. Obwohl also die Verkürzungsfraction nur relativ wenig abnahm, kam es zu signifikanten Verlängerungen sowohl der Kontraktions- als auch der Relaxationszeiten.

Bei den Zellen, die mit dem AdLacZ-Virus transfiziert worden waren, lag die basale Verkürzungsfraction bei $2,8 \pm 0,4$ % ($p < 0,01$ versus 48h-Zellkultur und frisch isolierten Zellen). Die Zeiten waren mit einer TPS von 333 ± 49 ms (n.s. gegenüber 48h-Zellkultur und $p < 0,01$ versus frisch isolierten Zellen) und einer $RT_{50\%}$ von 236 ± 29 ms (n.s. gegenüber 48h-Zellkultur und $p < 0,01$ versus frisch isolierten Zellen) tendentiell angestiegen. Es wird deutlich, daß auch die Infektion mit dem Adenovirus einen merklichen Einfluß vor allem auf die Kontraktionsamplitude der Myozyten hatte.

In Abb. IV.4 sind die Originalregistrierungen von jeweils einer Zelle aus jeder Gruppe dargestellt. Es sind repräsentative Registrierungen aus vier verschiedenen Herzen abgebildet.

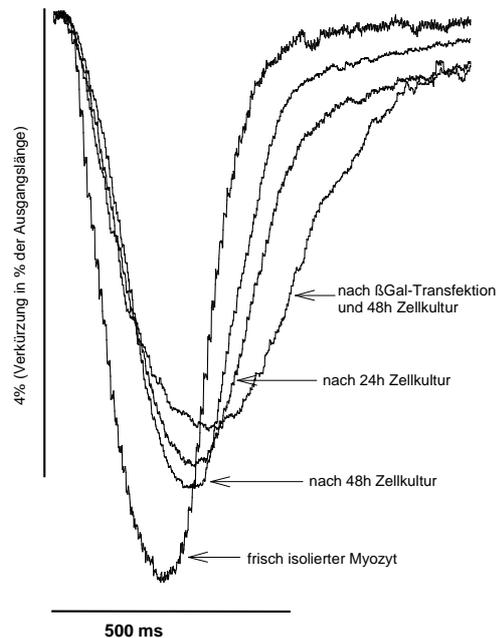


Abb. IV.4: Repräsentative Originalregistrierungen von vier Zellen aus verschiedenen Herzen nach unterschiedlich langer Zellkulturdauer bzw. β -Gal-Transfektion. Die x-Achse gibt die Zeit an, die y-Achse repräsentiert die Änderung der Zelllänge in % der Ruhezelllänge.

Die Mittelwerte der beschriebenen Parameter sind in Tabelle IV.1 noch einmal zusammengefaßt. Hier zeigt sich weiterhin, daß mit abnehmender Verkürzungsfraction und zunehmenden Verkürzungs- und Relaxationszeiten die Maximalgeschwindigkeit von Kontraktion und Relaxation abnahm.

Gruppe	Frisch isoliert	24 h Zellkultur	48 h Zellkultur	β -Gal-transfiziert & 48h Zellkultur
Anzahl Herzen	37	20	11	2
FS	4,7 \pm 0,2	3,7 \pm 0,3 **	4,1 \pm 0,5	2,8 \pm 0,4 ** \$\$
TPS	251 \pm 10	327 \pm 19 **	306 \pm 18 **	333 \pm 49
RT _{50%}	118 \pm 9	194 \pm 22 **	173 \pm 17 **	236 \pm 29 **
-dL/dt	-137 \pm 13	-97 \pm 13 *	-99 \pm 13 *	-99 \pm 7 **
+dL/dt	144 \pm 14	94 \pm 15 **	99 \pm 17 * §	70 \pm 1 **
mittl. Zelllänge	126 \pm 4	128 \pm 5	139 \pm 6§	149 \pm 0,4**

Tab. IV.1: Mittelwerte \pm SEM der basalen Kontraktilitätsparameter.

*= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$ jeweils versus Ausgangswert; §= $p < 0,05$ versus 24h Zellkultur; \$\$= $p < 0,01$ versus 48h Zellkultur. FS= Verkürzung in % der Ruhezelllänge; FS%= Verkürzung in % des Ausgangswertes; TPS= Zeit bis zur maximalen Kontraktion (ms); RT_{50%}=Dauer der Relaxation auf 50% (ms); -dL/dt= Verkürzungsgeschwindigkeit (μ m/s); +dL/dt= Relaxationsgeschwindigkeit (μ m/s); mittl. Zelllänge =mittlere Zelllänge in Relaxation (μ m)

IV. Ergebnisse

Abb. IV.5 zeigt zur besseren Visualisierung die basalen Funktionsparameter als Balkendiagramme.

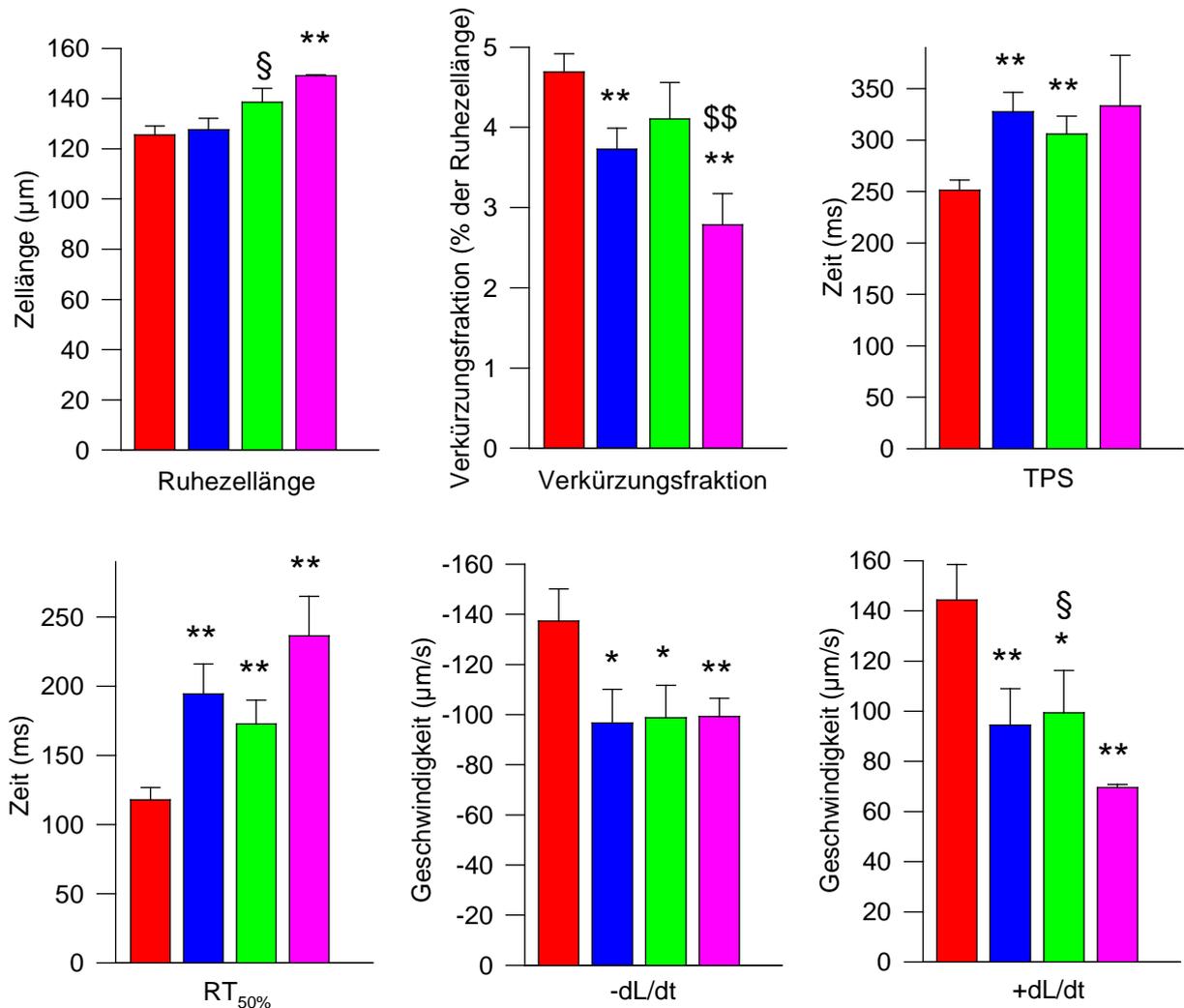


Abb. IV.5: Balkendiagramm zur besseren Visualisierung der oben genannten Kontraktionsparameter von Zellen nach unterschiedlich langer Zellkulturdauer. Rot: direkt nach Isolation; blau: nach 24h Zellkultur; grün: nach 48h Zellkultur; pink: nach Adenovirus-vermitteltem Gentransfer und 48h Zellkultur.

*= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$ jeweils versus Ausgangswert; \$= $p < 0,05$ versus 24h Zellkultur; \$\$= $p < 0,01$ versus 48h Zellkultur. FS= Verkürzung in % der Ruhezelllänge; TPS= Zeit bis zur maximalen Kontraktion (ms); RT_{50%}=Dauer der Relaxation auf 50% (ms); -dL/dt= Verkürzungsgeschwindigkeit (µm/s); +dL/dt= Relaxationsgeschwindigkeit (µm/s)

IV.4 Einfluß der Zellkultur auf die Verkürzungs-Frequenz-Beziehung

Zur funktionellen Charakterisierung der kultivierten Myozyten wurden schrittweise Erhöhungen der Stimulationsfrequenz von 0,25 Hz auf 2,5 Hz vorgenommen. Damit sollte die

Frequenzinotropie der Myozyten untersucht werden, die bei Herzinsuffizienz in der Regel negativ ist (siehe Kapitel I.3.2).

IV.4.1 Verkürzungs-Frequenz-Beziehung in menschlichen insuffizienten Myozyten

Es wurden 34 frisch isolierte Zellen aus 28 Herzen untersucht („Frischexperiment“). Abb. IV.6 zeigt die Verkürzungs-Frequenz-Beziehung eines frisch isolierten Myozyten aus einem terminal insuffizienten menschlichen Herzen als repräsentatives Beispiel. Die Verkürzungsfraction nahm bis 0,5 Hz zu, dann mit weiter zunehmender Frequenz ab (negative oder inverse Verkürzungs-Frequenz-Beziehung).

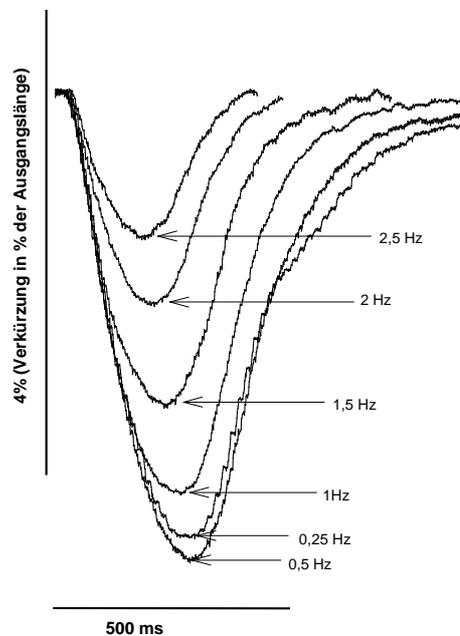


Abb. IV.6: Repräsentative Originalregistrierung einer Verkürzungs-Frequenz-Beziehung an einem frisch isolierten Myozyten aus insuffizientem humanen Myokard.

In Abb. IV.7 sind die Mittelwerte für die Experimente an frisch isolierten Myozyten aufgeführt. Bei den gemessenen Zellen kam es mit Erhöhung der Stimulationsfrequenz nach einem initialen Anstieg bei 0,5 Hz zu einer kontinuierlichen und signifikanten Abnahme der Verkürzungsfraction von $4,9 \pm 0,3$ % bei 0,25 Hz auf $2,5 \pm 0,3$ % bei 2,5 Hz ($p < 0,01$). Ab 1,0 Hz war die Abnahme signifikant verschieden vom Ausgangswert (Abb. IV.7a). Bei einer Normalisierung der Verkürzungswerte relativ zum Ausgangswert war ebenfalls der

IV. Ergebnisse

anfängliche Anstieg der Verkürzungsfraction auf $106 \pm 3 \%$ zu sehen (Abb. IV.7 b). Er ging mit einer Abnahme der $RT_{50\%}$ von 116 ± 10 ms auf 108 ± 7 ms einher ($p < 0,05$) (Abb. IV.7.c). Mit der weiteren Abnahme der Verkürzung bis zu $46 \pm 5 \%$ traten auch signifikant kürzere Zeitparameter auf. Dennoch sanken Verkürzungs- und Relaxationsgeschwindigkeit signifikant ab; die kürzeren TPS und $RT_{50\%}$ resultierten also nicht nur aus der geringeren Verkürzungsfraction, sondern sind auch ein Indiz für den gestörten Calcium-Metabolismus, der bei höheren Frequenzen verstärkt zu Tage tritt.

IV. Ergebnisse

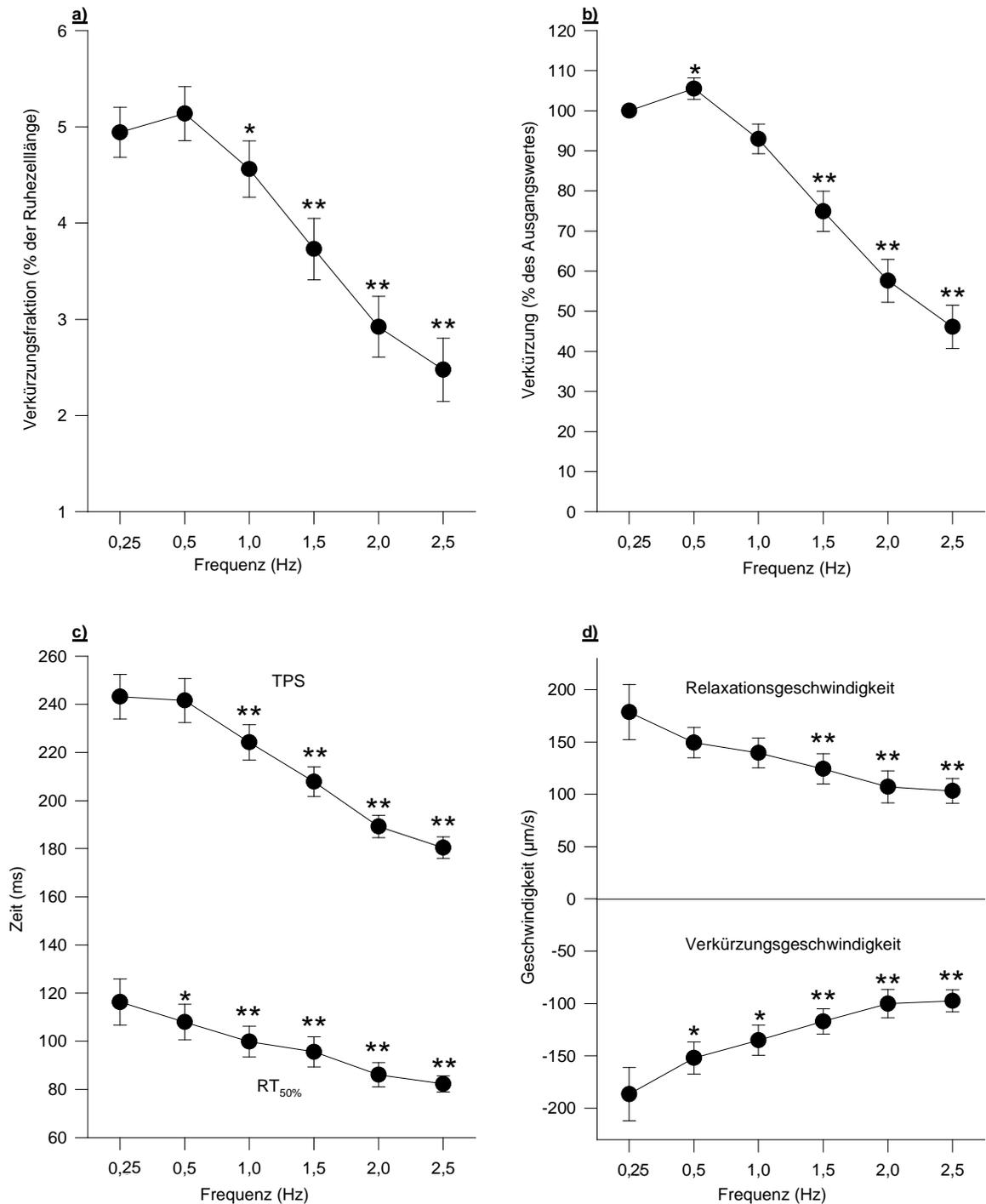


Abb. IV.7: Verkürzungs-Frequenz-Beziehung frisch isolierter Myozyten (n=34). Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM. Nach statistischer Testung entspricht * = $p < 0,05$ und ** = $p < 0,01$ gegenüber dem jeweiligen Ausgangswert.

a: Verkürzungsfraction in % der Ruhezelllänge; b: Verkürzung relativ zur Ausgangsverkürzung; c: Zeit bis zur maximalen Zellverkürzung (TPS, time to peak shortening) und Dauer der Relaxation auf 50% der Ruhezelllänge (RT_{50%}); d: Verkürzungs- und Relaxationsgeschwindigkeit

Tabelle IV.2 zeigt die Mittelwerte der für die Verkürzungs-Frequenz-Beziehung untersuchten Zellen:

Frequenz (Hz)	0,25	0,5	1	1,5	2	2,5
Anzahl Herzen	28	28	28	28	26	20
FS	4,9±0,3	5,1±0,3	4,6±0,3 *	3,7±0,3 **	2,9±0,3 **	2,5±0,3 **
FS%	100	106±3 *	93±4	75±5 **	58±5 **	46±5 **
TPS	243±9	242±9	224±7 **	208±6 **	189±5 **	180±4 **
RT _{50%}	116±10	108±7 *	100±6 **	96±6 **	86±5 **	82±3 **
-dL/dt	-187±25	-152±15 *	-135±14 **	117±12 **	-100±13 **	-97±11 **
+dL/dt	179±26	149±15	139±14	124±15 **	107±15 **	103±12 **

Tab. IV.2: Mittelwerte ±SEM der Kontraktilitätsparameter für die Verkürzungs-Frequenz-Beziehung von frisch isolierten Myozyten (34 Kardiomyozyten aus 28 Herzen). *= $p < 0,05$, **= $p < 0,01$. FS= Verkürzung in % der Ruhzellänge; FS%= Verkürzungsfraction relativ zum Ausgangswert; TPS= Zeit bis zur maximalen Kontraktion (ms); RT_{50%}=Dauer der Relaxation auf 50% (ms); -dL/dt= Verkürzungsgeschwindigkeit (µm/s); +dL/dt= Relaxationsgeschwindigkeit (µm/s)

IV.4.2 Verkürzungs-Frequenz-Beziehung bei über 24 Stunden kultivierten Zellen

Nach 24 Stunden in primärer Zellkultur wurde an 23 Zellen aus 19 Herzen das kontraktile Verhalten in der Verkürzungs-Frequenz-Beziehung gemessen.

Mit steigender Frequenz nahm die Verkürzungsfraction ab. Das zeigt Abb. IV.8 für die Mittelwerte: Die Verkürzungsfraction sank von initial $4,0 \pm 0,3$ % auf $2,5 \pm 0,2$ % bei 2,5 Hz, was bei einer Normalisierung des Ausgangswertes auf 100 % einer Abnahme auf 62 ± 6 % entspricht (Abb. IV.8 a und b). Bereits ab 1 Hz war diese Abnahme gegenüber dem Ausgangswert statistisch signifikant.

Die Verkürzungs- und die Relaxationsgeschwindigkeit blieben nahezu unverändert (Abb. IV.8 d). Daraus ergab sich eine Abnahme der gemessenen Kontraktionszeiten (Abb. IV.8 c), für die TPS von 316 ± 23 ms auf 214 ± 8 ms ($p < 0,01$) und für die Relaxation von 156 ± 22 ms auf 106 ± 5 ms. Nach einem Tag in Zellkultur zeigten die Zellen also eine deutlich negative Verkürzungs-Frequenz-Beziehung.

IV. Ergebnisse

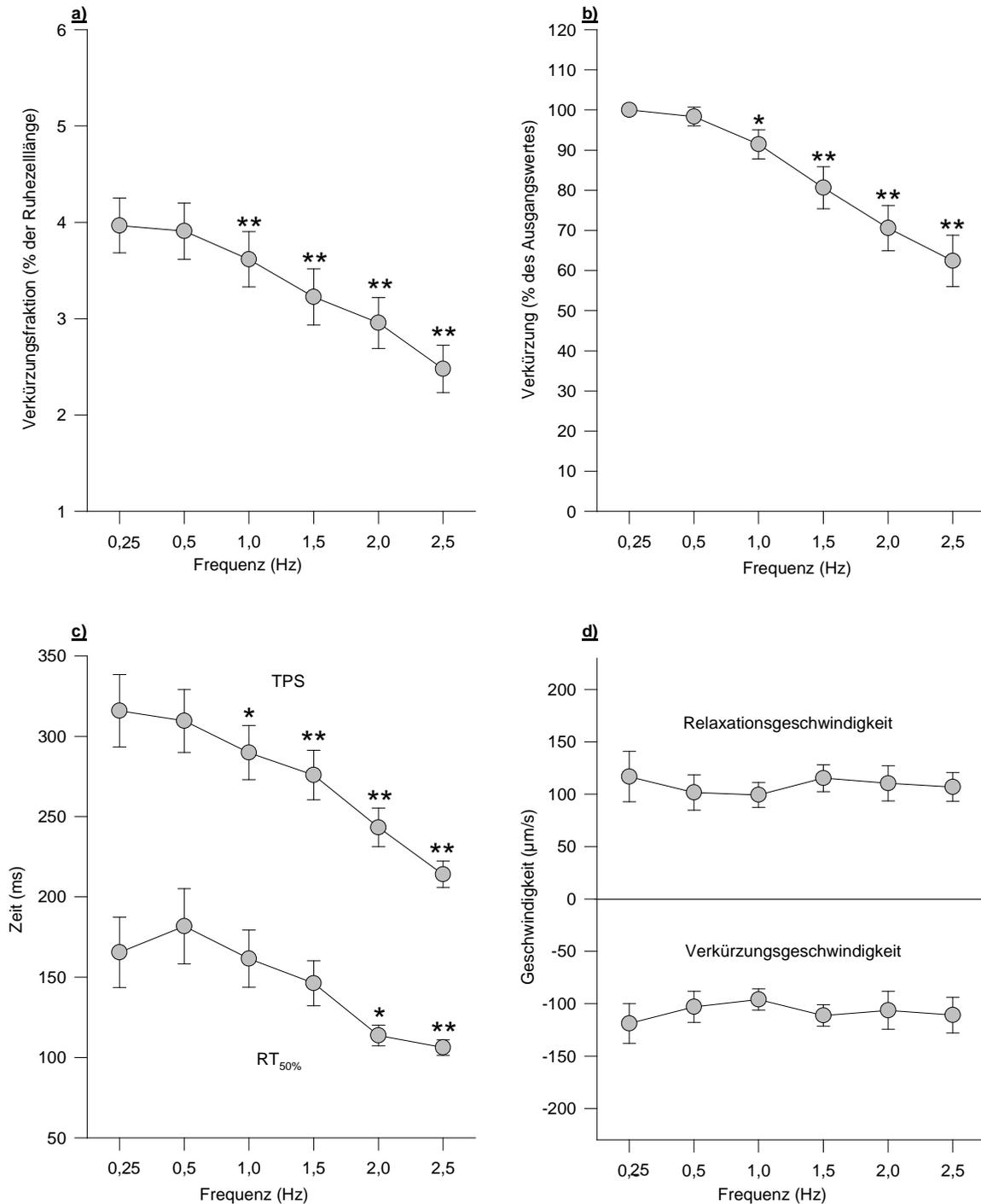


Abb. IV.8: Verkürzungs-Frequenz-Beziehung von Kardiomyozyten nach 24h in primärer Zellkultur. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM. Nach statistischer Testung entspricht * = $p < 0,05$ und ** = $p < 0,01$ gegenüber dem jeweiligen Ausgangswert.

a: Verkürzungsfraction in % der Ruhezelllänge; b: Verkürzung relativ zur Ausgangsverkürzung; c: Zeit bis zur maximalen Zellverkürzung (TPS, time to peak shortening) und Dauer der Relaxation auf 50% der Ruhezelllänge ($RT_{50\%}$); d: Verkürzungs- und Relaxationsgeschwindigkeit

Tabelle IV.3 gibt einen Überblick über die Mittelwerte:

Frequenz (Hz)	0,25	0,5	1	1,5	2	2,5
Anzahl Herzen	19	19	19	19	16	12
FS	4,0±0,3	3,9±0,3	3,6±0,3 **	3,2±0,3 **	3,0±0,3 **	2,5±0,2 **
FS%	100	98±2	91±4 *	81±5 **	71±6 **	62±6 **
TPS	316±23	310±20	290±17 *	276±16 **	243±12 **	214±8 **
RT _{50%}	156±22	182±23	162±18	146±14	114±6 *	106±5 **
-dL/dt	-119±19	-103±15	-96±10	-111±10	-106±18	-111±17
+dL/dt	117±24	102±17	99±12	115±13	110±17	107±14

Tab. IV.3: Mittelwerte ±SEM der Kontraktilitätsparameter für die Verkürzungs-Frequenz-Beziehung nach 24 h Zellkultur (23 Kardiomyozyten aus 19 Herzen).

*= $p < 0,05$, **= $p < 0,01$. FS= Verkürzung in % der Ruhezelllänge; FS%= Verkürzungsfraction relativ zum Ausgangswert; TPS= Zeit bis zur maximalen Kontraktion (ms); RT_{50%}=Dauer der Relaxation auf 50% (ms); -dL/dt= Verkürzungsgeschwindigkeit (µm/s); +dL/dt= Relaxationsgeschwindigkeit (µm/s)

IV.4.3. Verkürzungs-Frequenz-Beziehung bei 48 Stunden kultivierten Zellen

Auch nach 48stündiger Zellkultur wurde der Einfluß der Frequenzerhöhung auf das kontraktile Verhalten der Myozyten gemessen. Es wurden 12 Zellen aus 10 Herzen untersucht.

Nach einer zwischen 0,25 und 0,5 Hz nicht veränderten Verkürzungsfraction sah man eine Abnahme der Verkürzungsfraction, die im höheren Frequenzbereich sehr steil verlief, wie Abb. IV.9 für die Mittelwerte zeigt. Zu beachten ist, daß am Ende des Experiments nur noch Zellen aus zwei der 10 Herzen funktionstüchtig waren, die Parameter der 2,5 Hz-Darstellung also eher Richtwerte als ein statistisch vergleichbares Kollektiv darstellen.

Die Verkürzungsfraction sank mit Steigerung der Frequenz von $4,5 \pm 0,5$ % bei 0,25 Hz auf $2,3 \pm 0,4$ % bei 2 Hz ($p < 0,01$) und auf $0,6 \pm 0,1$ % bei 2,5 Hz (Abb. IV.9a). Auf den Ausgangswert normalisiert ergab sich somit eine Abnahme der Verkürzungsfraction auf 54 ± 7 % ($p < 0,01$) bei einer Frequenz von 2 Hz und auf nur mehr 21 ± 9 % bei einer Frequenz von 2,5 Hz (Abb. IV.9b). Die Abnahmen der Verkürzung waren ab 1,5 Hz statistisch signifikant unterschiedlich gegenüber dem Ausgangswert. Dieser Abfall von Verkürzungs- und Relaxationsgeschwindigkeit ging einher mit verkürzten Zeitparametern: Die TPS sank von 306 ± 20 ms auf 263 ± 12 ms ($p < 0,05$) bei 2 Hz, die RT_{50%} von 167 ± 17 ms auf 131 ± 9 ms ($p < 0,01$). Auch nach zwei Tagen in Zellkultur blieb also die Verkürzungs-Frequenz-Beziehung negativ.

IV. Ergebnisse

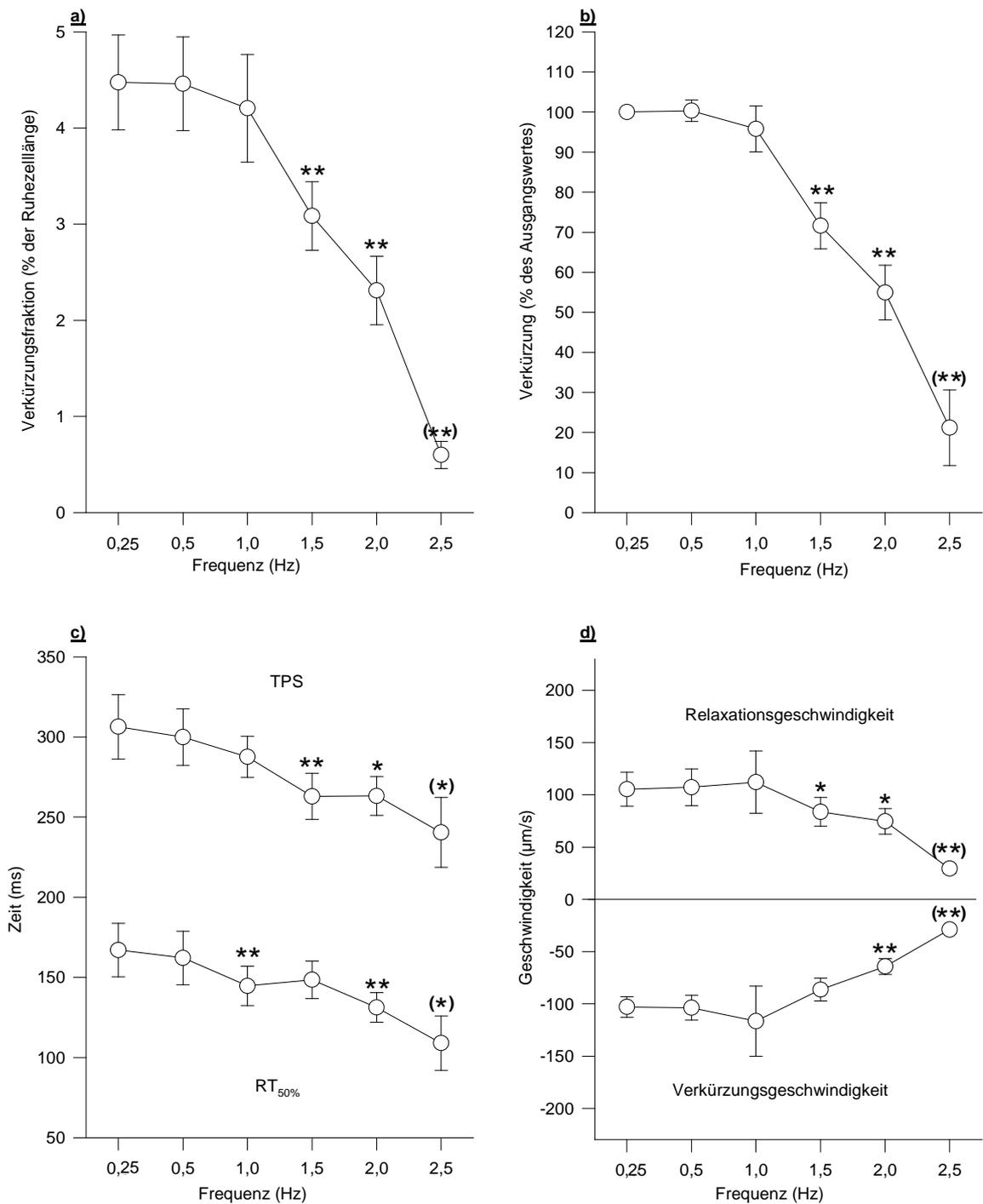


Abb. IV.9: Verkürzungs-Frequenz-Beziehung von Kardiomyozyten nach 48h in primärer Zellkultur. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM. Nach statistischer Testung entspricht * = $p < 0,05$ und ** $p < 0,01$ gegenüber dem jeweiligen Ausgangswert. () = statistisch signifikant getestet bei weniger als 5 Herzen.

a: Verkürzungsfraction in % der Ruhezelllänge; b: Verkürzung relativ zur Ausgangsverkürzung; c: Zeit bis zur maximalen Zellverkürzung (TPS, time to peak shortening) und Dauer der Relaxation auf 50% der Ruhezelllänge (RT_{50%}); d: Verkürzungs- und Relaxationsgeschwindigkeit

IV. Ergebnisse

Einen Überblick über die Mittelwerte gibt Tabelle IV.4.

Frequenz (Hz)	0,25	0,5	1	1,5	2	2,5
Anzahl Herzen	10	10	10	10	9	2
FS	4,5±0,5	4,5±0,5	4,2±0,6	3,1±0,4 **	2,3±0,4 **	0,6±0,1 **
FS%	100	100±3	96±6	72±6 **	55±7 **	21±9 **
TPS	306±20	300±18	288±13	263±14 **	263±12 *	241±22 *
RT _{50%}	167±17	162±17	145±12 **	148±12	131±9 *	109±17 *
-dL/dt	-103±10	-104±12	-117±34	-86±11	-64±8 **	-29±4 **
+dL/dt	105±16	107±18	112±30	84±14 *	75±12 *	29±4 **

Tab. IV.4: Mittelwerte \pm SEM der Kontraktilitätsparameter für die Verkürzungs-Frequenz-Beziehung nach 48 h Zellkultur (12 Kardiomyozyten aus 10 Herzen).

*= $p<0,05$, **= $p<0,01$ FS= Verkürzung in % der Ruhezelllänge; FS%= Verkürzungsfraction relativ zum Ausgangswert; TPS= Zeit bis zur maximalen Kontraktion (ms); RT_{50%}=Dauer der Relaxation auf 50% (ms); -dL/dt= Verkürzungsgeschwindigkeit ($\mu\text{m/s}$); +dL/dt= Relaxationsgeschwindigkeit ($\mu\text{m/s}$)

IV.4.5 Vergleich der Verkürzungs-Frequenz-Beziehungen bei verschiedener Zellkulturdauer

Alle untersuchten Myozytengruppen, ob vor oder nach Zellkultur, zeigten grundsätzlich eine inverse VFB. Uns interessierte, ob und welche Unterschiede zwischen den Gruppen existierten. In Abb. IV.10 wurden die einzeln schon bekannten Mittelwerte der Untersuchungen direkt nach Isolation, nach 24 und 48 Stunden Zellkultur zum besseren Vergleich in eine Grafik gebracht.

Direkt nach der Isolation schlugen die frischen Zellen mit einer Ausgangsverkürzung bei 0,25 Hz von $4,9 \pm 0,3$ % am kräftigsten. Die nach einem Tag gemessenen Zellen unterschieden sich mit $4,0 \pm 0,3$ % signifikant ($p<0,01$), davon; die nach zwei Tagen durchschnittlich erreichte Ausgangsverkürzung von $4,5 \pm 0,5$ % differierten von keinem der beiden anderen in signifikanter Weise.

Der weitere Abfall der Verkürzungsfraction gestaltete sich in den unterschiedlichen Gruppen verschieden: Die 24h kultivierten Zellen hatten anteilig die geringste Funktionseinbuße und somit ab 1,5 Hz eine größere Verkürzungsfraction als die 48h- Gruppe. Die Verkürzungsfraction der 48h kultivierten Zellen verlief bis 2 Hz etwa parallel zu den frisch isolierten Zellen und fiel dann sehr steil ab.

Dies wird gut ersichtlich in der auf 100% des Ausgangswertes normalisierten Darstellung (Abb. IV.10 a).

IV. Ergebnisse

Die Mittelwerte der Zeitparameter zeigten jeweils einen ähnlichen Verlauf, waren aber dadurch, daß die kultivierten Zellen in ihren Ausgangswerten mit einer TPS von 316 ± 23 (24h) bzw. 306 ± 20 (48h) gegenüber den „Frischexperimenten“ mit einer TPS von 243 ± 9 ms ($p < 0,01$) begannen, parallel verschoben. Das ließ sich auch anhand der $RT_{50\%}$ zeigen: die frisch isolierten Zellen benötigten bei 0,25 Hz 116 ± 10 ms, die 24h kultivierten Zellen 165 ± 22 ms ($p < 0,05$) und die 48h kultivierten Zellen 167 ± 17 ms ($p < 0,05$ versus frisch isolierte Zellen), um 50% ihrer Ruhezelllänge wieder zu erreichen. Bei Steigerung der Frequenz kontrahierten sich die 48 h alten Zellen ab 2 Hz schneller als die 24 h kultivierten; TPS und $RT_{50\%}$ dieser beiden Gruppen unterschieden sich aber nicht signifikant (Abb. IV.10 b und c). Die Verkürzungsgeschwindigkeit war bei 0,25 Hz höher bei den frischen Zellen im Vergleich zu den 24h kultivierten Zellen (-187 ± 25 $\mu\text{m/s}$ versus -119 ± 19 $\mu\text{m/s}$; ($p < 0,05$)). Dasselbe galt für die Relaxationsgeschwindigkeit (179 ± 26 versus 117 ± 24 $\mu\text{m/s}$; ($p < 0,05$)). Die 48h kultivierten Zellen unterscheiden sich in ihren Ausgangswerten der TPS mit -103 ± 10 $\mu\text{m/s}$ ($p < 0,01$) bzw der $RT_{50\%}$ mit 105 ± 16 $\mu\text{m/s}$ ($p < 0,05$) ebenfalls signifikant von den frisch isolierten Zellen.

Ab einer Frequenz von 1,5 Hz unterschieden sich die 24h kultivierten Zellen gegenüber denen mit einer Kulturdauer von 48h in der Verkürzungsgeschwindigkeit signifikant. In der Relaxationsgeschwindigkeit fielen letztere bei 1,5 und 2,5 Hz ebenfalls signifikant ab (Abb. IV.10 d).

IV. Ergebnisse

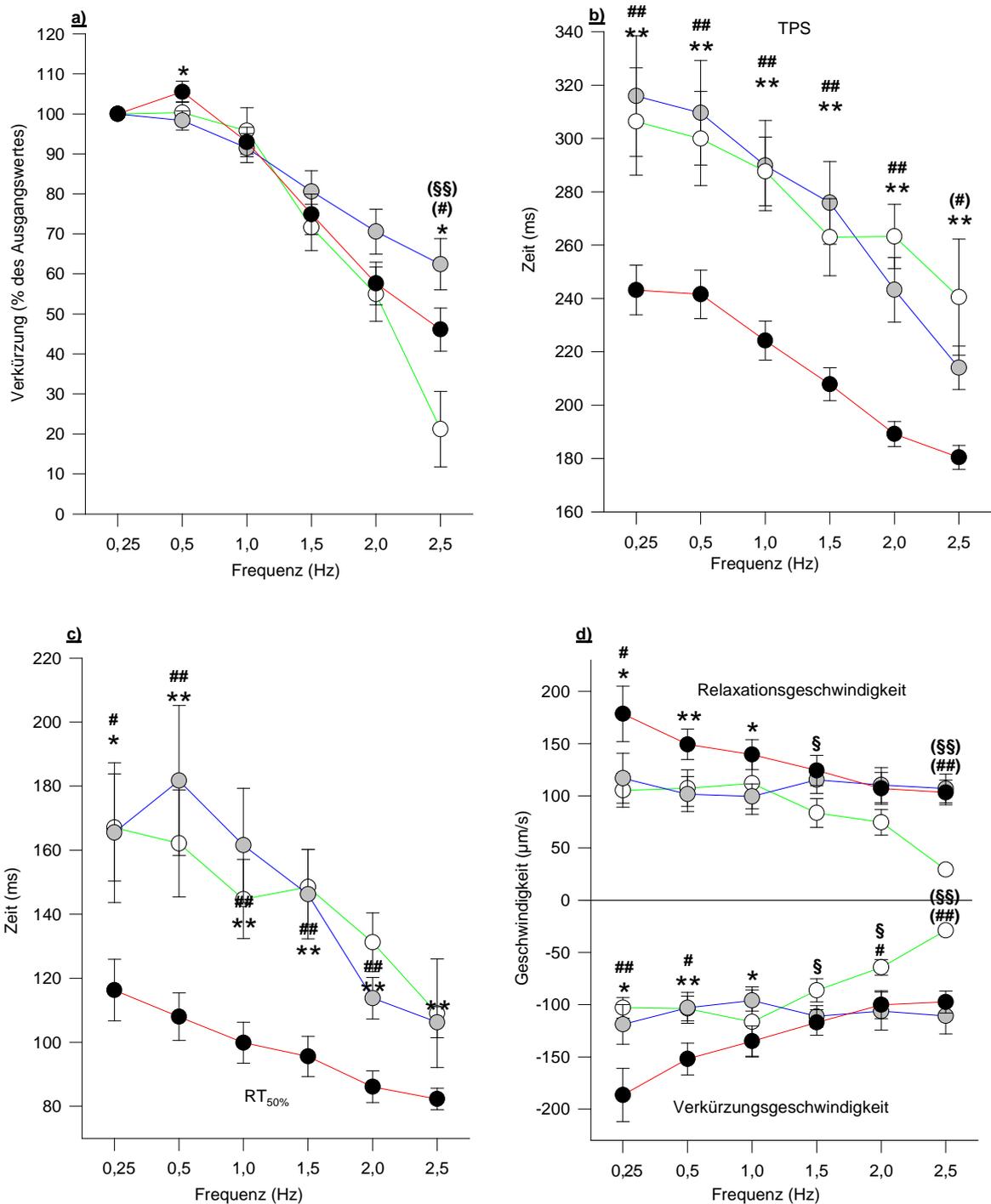


Abb. IV.10: Verkürzungs-Frequenz-Beziehung frisch isolierter (geschlossene Kreise, rote Linien), 24 Stunden (graue Kreise, blaue Linien) und 48 Stunden (offene Kreise, grüne Linien) kultivierter Myozyten. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM. Nach statistischer Testung entspricht * = $p < 0,05$ und ** $p < 0,01$ im Vergleich zwischen frisch isolierten und 24h kultivierten Zellen; # = $p < 0,05$ und ## $< 0,01$ im Vergleich zwischen frisch isolierten und 48h kultivierten Zellen; § $p < 0,05$ und §§ $< 0,01$ im Vergleich zwischen 24h und 48h kultivierten Zellen. Bei Versuchszahlen unter $n=5$ sind die Signifikanzzeichen in Klammern gesetzt
a: Verkürzung relativ zur Ausgangsverkürzung; b: Zeit bis zur maximalen Zellverkürzung (TPS, time to peak shortening); c: Dauer der Relaxation auf 50% der Ruhezelllänge (RT_{50%}); d: Verkürzungs- und Relaxationsgeschwindigkeit

IV.5 Einfluß der Zellkultur auf die Isoprenalin-KWK

Das Protokoll dieser Meßreihe bestand nach einer basalen Messung bei 0,5 Hz in einer kumulativen Erhöhung der Isoprenalin- Konzentration von 10^{-9} bis 10^{-5} mol/l bzw. Einzeldosisversuchen im genannten Konzentrationsbereich.

IV.5.1 Wirkung von Isoprenalin auf frisch isolierte Myozyten

In diese Untersuchungsreihe gingen insgesamt 30 Zellen aus 28 Herzen ein.

Isoprenalin wirkte an frisch isolierten Zellen dosisabhängig positiv inotrop (Abb. 4 12 a). Die Verkürzungsfraction stieg unter der maximalen Isoprenalin-Konzentration von 10^{-5} mmol/l von $4,7 \pm 0,3$ % (basal) auf $7,7 \pm 1,1$ % ($p < 0,01$) an.

Normalisiert auf den Ausgangswert der Kontraktion (=100%) ergab dies eine Zunahme der Verkürzungsfraction auf 205 ± 27 % (Abb. IV.11 b). Diese Kontraktionszunahme war schon ab einer Isoprenalinkonzentration von 10^{-8} mmol/l signifikant unterschiedlich vom Ausgangswert.

Bei starker Zunahme der Verkürzung verlängerte sich die Kontraktionszeit nur unwesentlich. Bei höheren Isoprenalin- Konzentrationen (10^{-7} mmol/l) nahm sie von initial 234 ± 10 ms auf 221 ± 10 ms ab ($p < 0,05$) (Abb. IV.11 c). Dementsprechend stieg die maximale Verkürzungsgeschwindigkeit von -148 ± 18 $\mu\text{m/s}$ (basal) auf -249 ± 50 $\mu\text{m/s}$ an (Konzentration von 10^{-7} mmol/l ($p < 0,01$)). Obwohl die Kontraktionsamplitude noch gleich groß war, fiel bei einer Isoprenalinkonzentration von 10^{-5} mmol/l die Verkürzungsgeschwindigkeit wieder leicht ab (Abb. IV.11 d).

Die halbmaximale Relaxationszeit ($RT_{50\%}$) wurde unter Isoprenalin tendentiell kürzer, ohne jedoch Signifikanzniveau zu erreichen (Abb. IV.11c). Im Gegensatz dazu stieg die Relaxationsgeschwindigkeit von initial 164 ± 23 $\mu\text{m/s}$ auf 272 ± 69 $\mu\text{m/s}$ ($p < 0,05$) bei 10^{-7} mmol/l , fiel dann aber bei einer höheren Isoprenalin- Konzentration von 10^{-5} mmol/l wieder ab (Abb. IV.11d). Als Grund dafür kann eine zunehmende Calciumüberladung der Zelle angenommen werden.

IV. Ergebnisse

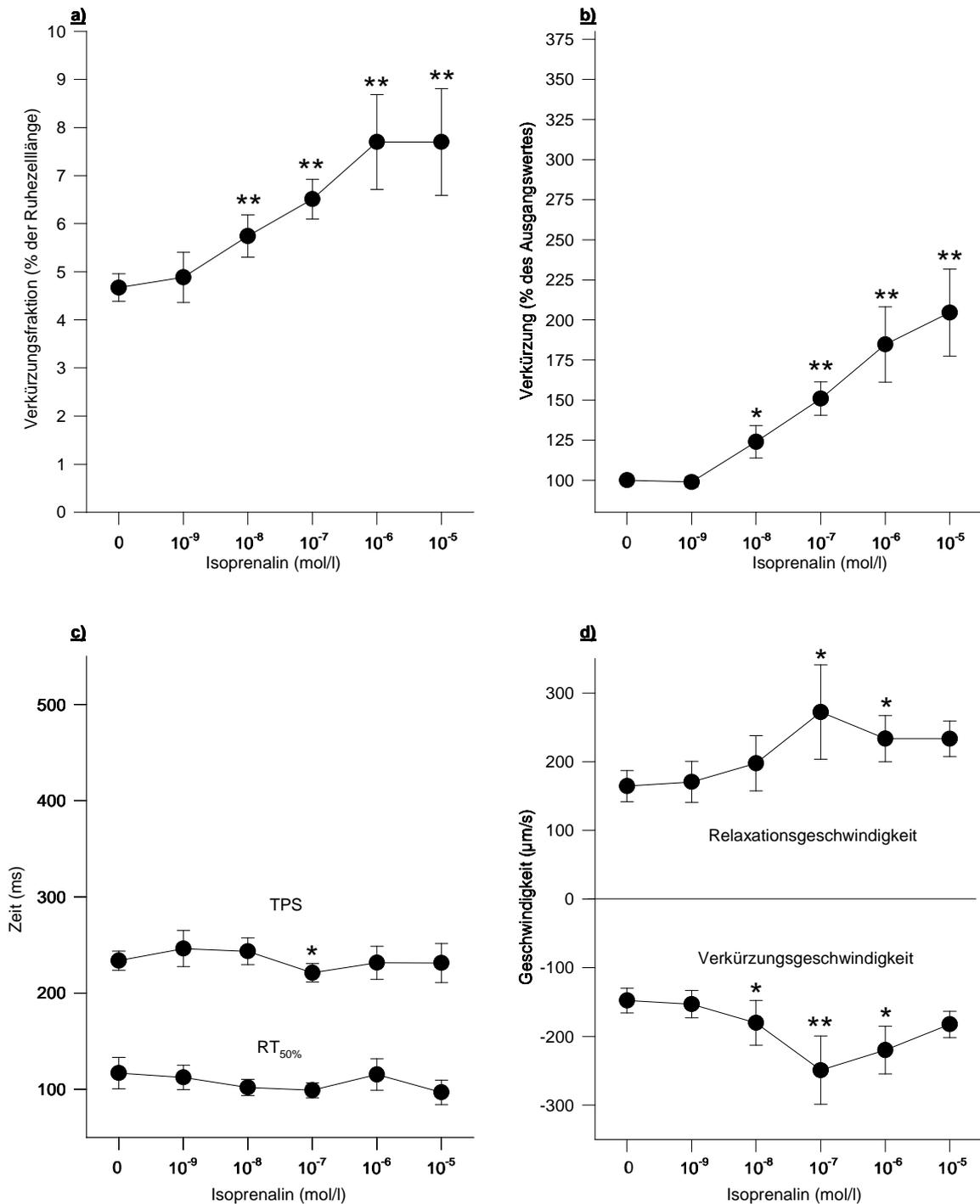


Abb. IV.11: Isoprenalin-KWK an frisch isolierten Myozyten. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM. Nach statistischer Testung entspricht * = $p < 0,05$ und ** = $p < 0,01$ gegenüber dem jeweiligen Ausgangswert.

a: Verkürzungsfraction in % der Ruhezelllänge; b: Verkürzung relativ zur Ausgangsverkürzung; c: Zeit bis zur maximalen Zellverkürzung (TPS, time to peak shortening) und Dauer der Relaxation auf 50% der Ruhezelllänge ($RT_{50\%}$); d: Verkürzungs- und Relaxationsgeschwindigkeit

Einen Überblick über die beschriebenen Veränderungen zeigt Tabelle IV.5:

Isoprenalin (mmol/l)	0	10 ⁻⁹	10 ⁻⁸	10 ⁻⁷	10 ⁻⁶	10 ⁻⁵
Anzahl Herzen	28	13	19	25	12	8
FS	4,7±0,3	4,9±0,5	5,7±0,4 **	6,5±0,4 **	7,7±1,0 **	7,7±1,1 **
FS%	100±0	99±3	124±10 *	151±10 **	185±24 **	205±27 **
TPS	234±10	246±19	244±14	221±10 *	232±17	231±20
RT _{50%}	117±16	112±13	102±8	99±8	115±16	97±13
-dL/dt	-148±18	-153±20	-180±33	-249±50 **	-220±35	-182±19
+dL/dt	164±23	170±30	197±40	272±69 *	234±34	233±26 *

Tab. IV.5: Mittelwerte ±SEM der Kontraktilitätsparameter für die Isoprenalin-KWK (30 frisch isolierte Kardiomyozyten aus 28 Herzen).

*= $p < 0,05$, **= $p < 0,01$. FS= Verkürzung in % der Ruhezelllänge; FS%= Verkürzungsfraction relativ zum Ausgangswert; TPS= Zeit bis zur maximalen Kontraktion (ms); RT_{50%}=Dauer der Relaxation auf 50% (ms); -dL/dt= Verkürzungsgeschwindigkeit (µm/s); +dL/dt= Relaxationsgeschwindigkeit (µm/s)

IV.5.2 Wirkung von Isoprenalin nach 24 Stunden Zellkultur

In diese Meßreihe gingen 18 Zellen aus insgesamt 14 Herzen ein.

Auch nach 24 h in Zellkultur zeigte sich ein positiv inotroper Effekt des Isoprenalins. Die Verkürzungsfraction stieg von $4,0 \pm 0,4$ % auf $7,4 \pm 1,3$ % an (Isoprenalin 10^{-6} mmol/l; $p < 0,05$). Bei noch höheren Konzentrationen nahm die Verkürzungsfraction wieder ab (Abb. IV.12a). Dies entsprach einem Anstieg auf 245 ± 65 % ($p < 0,05$ vs. basal) und einem folgenden Abfall auf 143 % ($p < 0,01$ vs. basal bei geringer Versuchszahl) (Abb. IV.12 b). Mit dem Anstieg der Verkürzungsfraction ging eine leichte Verkürzung der TPS und RT_{50%} einher, die bei 10^{-6} mmol/l für die RT_{50%} mit 114 ± 9 ms signifikant unterschiedlich ($p < 0,05$) zum Ausgangswert (160 ± 16 ms) war. Bei Isoprenalin 10^{-5} mmol/l nahmen die Zeiten wieder zu (Abb. IV.12 c).

Das spiegelte auch der Verlauf der Verkürzungs- und Relaxationsgeschwindigkeiten wider: Sie stiegen bis zu einer Isoprenalinkonzentration von 10^{-6} mmol/l an (signifikant schneller bei 10^{-7} und 10^{-6}), um danach abzufallen (Abb. IV.12 d). Als Grund dafür kann eine Calcium-Überladung der Zellen angenommen werden.

IV. Ergebnisse

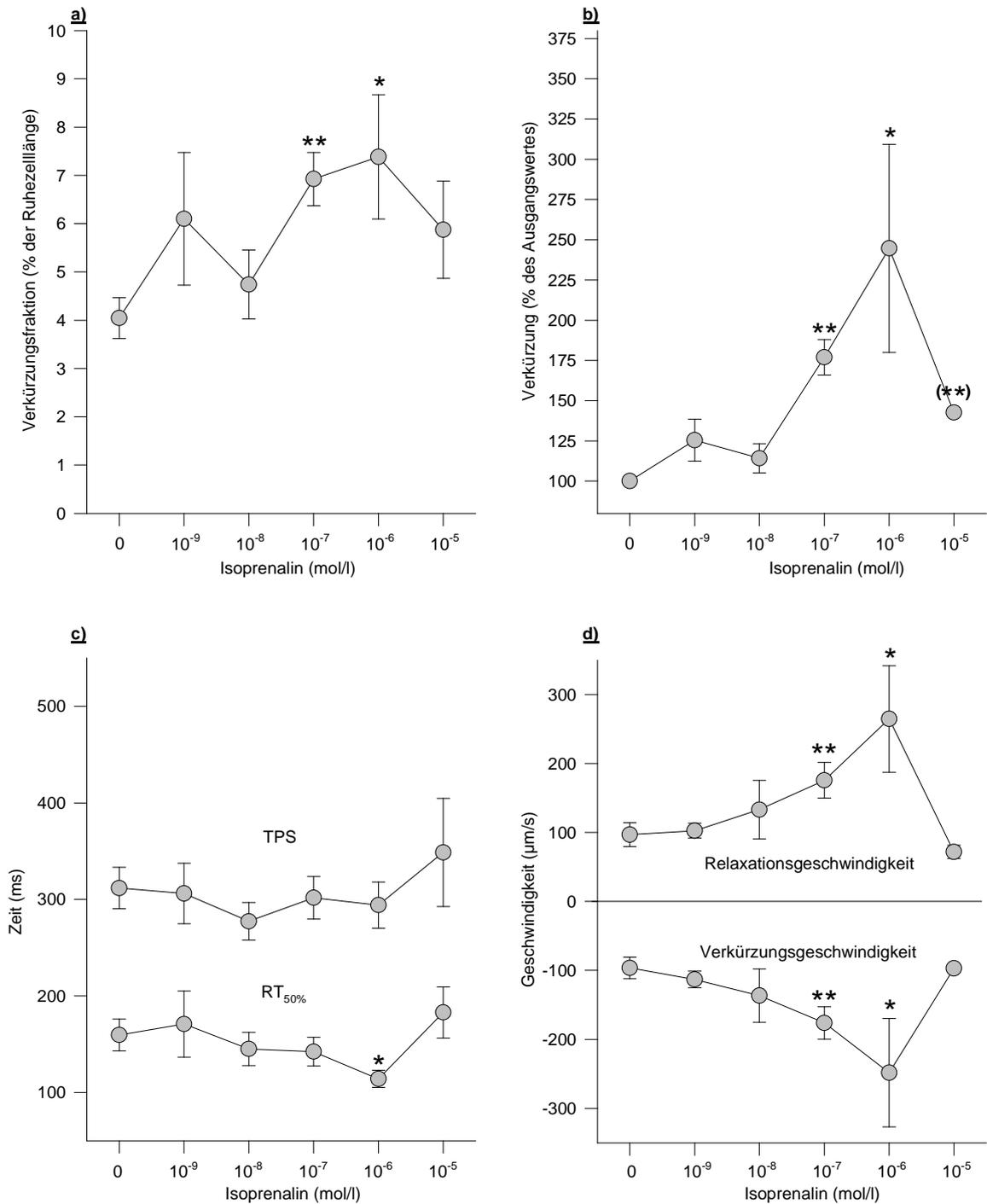


Abb. IV.12: Isoprenalin-KWK an humanen Myozyten nach 24 h primärer Zellkultur. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM. Nach statistischer Testung entspricht $\star = p < 0,05$ und $\star\star = p < 0,01$ gegenüber dem jeweiligen Ausgangswert.

a: Verkürzungsfraction in % der Ruhezelllänge; b: Verkürzung relativ zur Ausgangsverkürzung; c: Zeit bis zur maximalen Zellverkürzung (TPS, time to peak shortening) und Dauer der Relaxation auf 50% der Ruhezelllänge (RT_{50%}); d: Verkürzungs- und Relaxationsgeschwindigkeit

Tabelle IV.6 zeigt die Mittelwerte im Überblick:

Isoprenalin (mmol/l)	0	10 ⁻⁹	10 ⁻⁸	10 ⁻⁷	10 ⁻⁶	10 ⁻⁵
Anzahl Herzen	14	3	9	12	6	2
FS	4,0±0,4	6,1±1,4	4,7±0,7	6,9±0,6 **	7,4±1,3 *	5,9±1,0
FS%	100±0	125±13	114±9	177±11 **	245±65 *	143±0 **
TPS	312±22	306±31	277±19	302±22	294±24	349±56
RT _{50%}	160±16	171±34	145±17	142±15	114±9 *	183±27
-dL/dt	-96±16	-113±12	-137±39	-176±24 **	-248±79 *	-97±2
+dL/dt	97±17	103±11	133±43	176±26 **	265±77 *	72±10

Tab. IV.6: Mittelwerte ±SEM der Kontraktilitätsparameter für die Isoprenalin-KWK nach 24h Zellkultur (18 Kardiomyozyten aus 14 Herzen).

*= $p < 0,05$, **= $p < 0,01$. FS= Verkürzung in % der Ruhezelllänge; FS%= Verkürzungsfraction relativ zum Ausgangswert; TPS= Zeit bis zur maximalen Kontraktion (ms); RT_{50%}=Dauer der Relaxation auf 50% (ms); -dL/dt= Verkürzungsgeschwindigkeit (µm/s); +dL/dt= Relaxationsgeschwindigkeit (µm/s)

IV.5.3 Wirkung von Isoprenalin nach 48 Stunden Zellkultur

In diese Gruppe gingen die Meßwerte von 6 Zellen aus 6 Herzen ein.

In Abb. IV.13 sind die Mittelwerte bei ansteigender Isoprenalin-Konzentration zu sehen.

Wieder war ein dosisabhängiger positiv inotroper Effekt zu beobachten. Abb. IV.13 a zeigt den Anstieg der Verkürzungsfraction von $3,9 \pm 0,6$ % auf ein Plateau von $7,4 \pm 1$ % bei 10^{-7} mmol/l und $7,6 \pm 1$ % bei 10^{-6} mmol/l. Bei einer Normalisierung auf den Ausgangswert wurde sichtbar, daß das Wirkmaximum bei einer Isoprenalinkonzentration von 10^{-6} mmol/l mit 222 ± 58 % ($p < 0,05$) erreicht war. Eine weitere Isoprenalin- Zugabe brachte keinen weiteren Effekt; die Verkürzung sank auf 189 % des Ausgangswertes (Abb. IV.13).

Die Verkürzungs- und Relaxationsgeschwindigkeiten nahmen leicht zu und waren bei 10^{-7} mmol/l (Relaxation) bzw. bei 10^{-6} mmol/l (Verkürzung) signifikant höher als der Ausgangswert (Abb. IV.13d).

IV. Ergebnisse

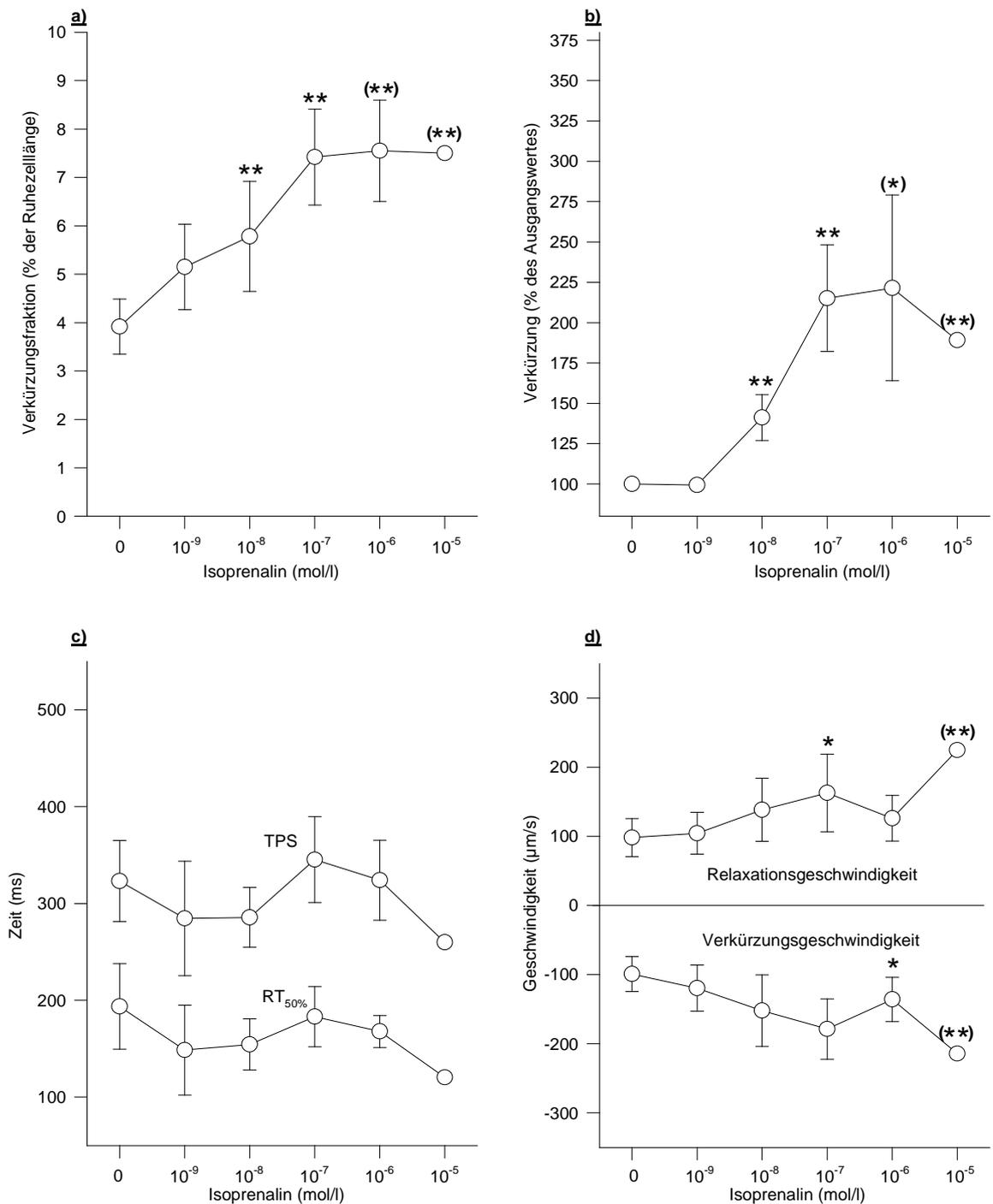


Abb. IV.13: Isoprenalin-KWK bei Kardiomyozyten nach 48h in primärer Zellkultur. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM. Nach statistischer Testung entspricht * = $p < 0,05$ und ** $p < 0,01$ gegenüber dem jeweiligen Ausgangswert. () = statistisch signifikant getestet bei weniger als 5 Herzen.

a: Verkürzungsfraction in % der Ruhezelllänge; b: Verkürzung relativ zur Ausgangsverkürzung; c: Zeit bis zur maximalen Zellverkürzung (TPS, time to peak shortening) und Dauer der Relaxation auf 50% der Ruhezelllänge ($RT_{50\%}$); d: Verkürzungs- und Relaxationsgeschwindigkeit

Tabelle IV.7 verschafft einen Überblick über die Mittelwerte der Versuchsreihe:

Isoprenalin (mmol/l)	0	10^{-9}	10^{-8}	10^{-7}	10^{-6}	10^{-5}
Anzahl Herzen	6	2	5	5	4	1
FS	3,9±0,6	5,2±0,9	5,8±1,1 **	7,4±1,0 **	7,6±1,0 **	7,5
FS%	100±0	99±0	141±14 **	215±33 **	222±58 *	189
TPS	323±42	285±59	286±31	345±44	324±41	260±0
RT _{50%}	194±44	149±46	154±26	183±31	168±16	120±0
-dL/dt	-99±25	-119±33	-152±52	-179±44 *	-136±32	-214±0
+dL/dt	98±28	105±30	139±46	163±56	126±33	225±0

Tab. IV.7: Mittelwerte ±SEM der Kontraktilitätsparameter für die Isoprenalin-KWK nach 48h Zellkultur (6 Zellen aus 6 Herzen).

*= $p < 0,05$, **= $p < 0,01$. FS= Verkürzung in % der Ruhezelllänge; FS%= Verkürzungsfraction relativ zum Ausgangswert; TPS= Zeit bis zur maximalen Kontraktion (ms); RT_{50%}=Dauer der Relaxation auf 50% (ms); -dL/dt= Verkürzungsgeschwindigkeit ($\mu\text{m/s}$); +dL/dt= Relaxationsgeschwindigkeit ($\mu\text{m/s}$)

IV.5.4 Vergleich der Isoprenalinwirkung bei frisch isolierten Zellen und Zellkulturdauer von 24h bzw. 48h

Alle untersuchten Gruppen zeigten eine deutlich positiv inotrope Antwort auf Isoprenalin.

Um Unterschiede der Isoprenalinwirkung herauszuarbeiten, zeigt Abb. IV.14 die Mittelwerte der Experimente direkt nach Isolation, nach 24 h und nach 48 h in einer Graphik zusammengefaßt.

In der auf den Ausgangswert normalisierten Verkürzungsfraction stiegen zuerst die Werte der 48 h in Zellkultur befindlichen Myozyten steil an und erreichten schon bei den Konzentrationen 10^{-7} und 10^{-6} mmol/l ihr Kontraktionsmaximum von 215 ± 33 % bzw. 222 ± 58 %. Eine weitere Erhöhung der Isoprenalinkonzentration konnte dann keine weitere positive Inotropie bewirken; die Verkürzungsfraction fiel ab auf 189 %.

Nach 24 h in Zellkultur erreichten die Myozyten ihr Kontraktionsmaximum von 245 ± 65 % erst bei 10^{-6} mmol/l Isoprenalin. Danach erfolgte ebenfalls ein Abfall auf 143 %.

Bei den frisch isolierten Zellen dagegen nahm die Verkürzungsfraction langsamer zu und hatte bei 10^{-5} mmol/l mit 205 ± 27 % ihr Maximum noch nicht überschritten (Abb. IV. 14a).

Die Wirksamkeit des Katecholamins wurde größer: die EC_{50%} stieg im Vergleich zwischen frisch isolierten Zellen und denen nach 48 Stunden in Zellkultur um das 4,5-Fache an von 5.16×10^{-8} mol/l (C.I., 1.89×10^{-8} - 1.40×10^{-7} mol/l) in frisch isolierten Zellen auf 1.12×10^{-8} mol/l (C.I., 4.38×10^{-9} - 2.86×10^{-8} mol/l) in 48h kultivierten ($p < 0.05$ vs. frisch isoliert).

IV. Ergebnisse

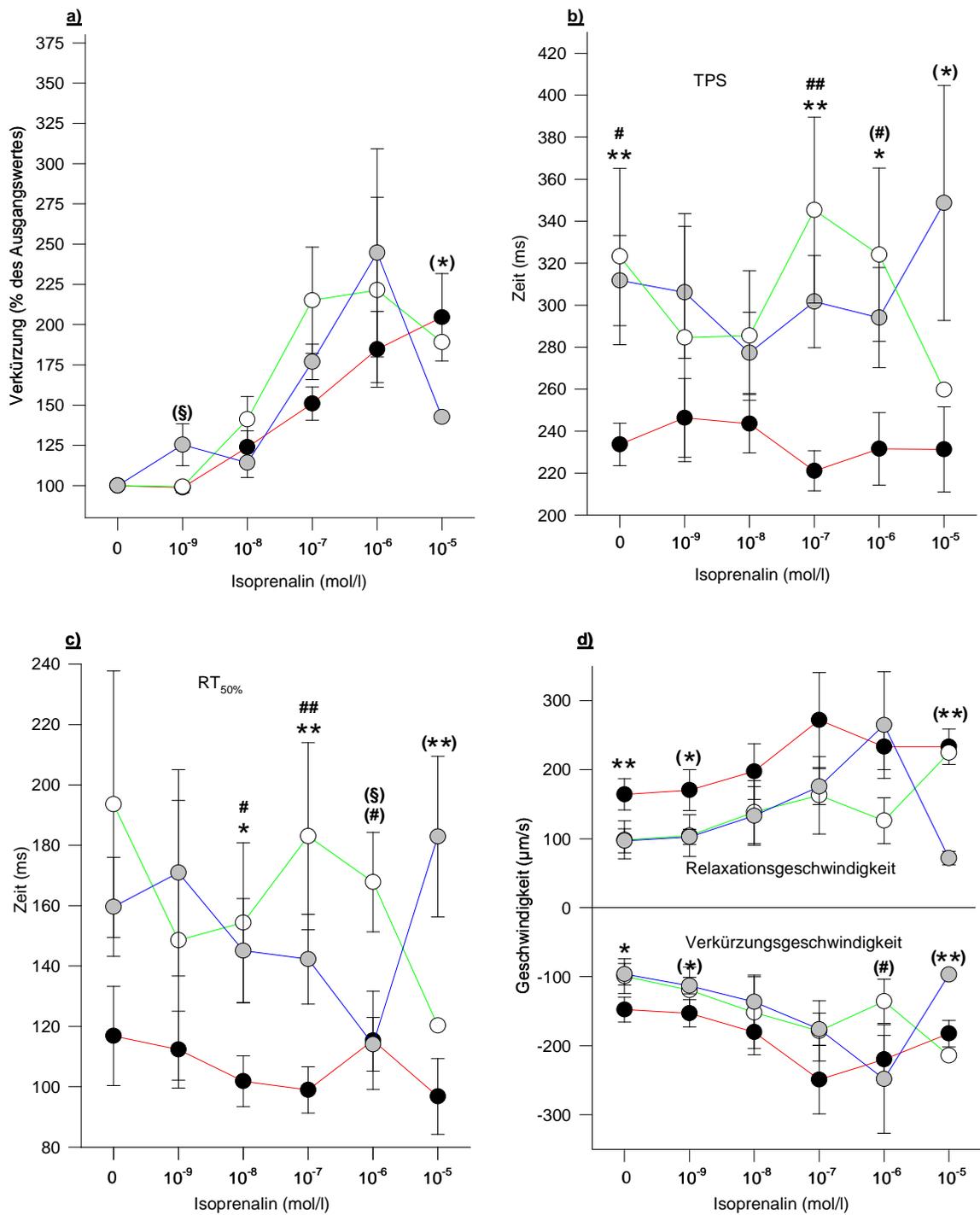


Abb. IV.14: Isoprenalin-KWK an frisch isolierten (geschlossene Kreise, rote Linie), 24 Stunden (graue Kreise, blaue Linie) und 48 Stunden (offene Kreise, grüne Linie) kultivierten Myozyten. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM. Nach statistischer Testung entspricht $\star = p < 0,05$ und $\star\star = p < 0,01$ im Vergleich zwischen frisch isolierten und 24h kultivierten Zellen; $\# = p < 0,05$ und $\#\# < 0,01$ im Vergleich zwischen frisch isolierten und 48h kultivierten Zellen; $\S = p < 0,05$ und $\S\S < 0,01$ im Vergleich zwischen 24h und 48h kultivierten Zellen. Bei Versuchszahlen unter $n=5$ sind die Signifikanzzeichen in Klammern gesetzt a: Verkürzung relativ zur Ausgangsverkürzung; b: Zeit bis zur maximalen Zellverkürzung (TPS, time to peak shortening); c: Dauer der Relaxation auf 50% der Ruhezelllänge (RT_{50%}); d: Verkürzungs- und Relaxationsgeschwindigkeit

Es wird also deutlich, daß die Zellkultur zu einer Linksverschiebung der Isoprenalin-KWK führt. Dabei war die maximal erreichte Isoprenalinwirkung nicht verändert, die Empfindlichkeit der Zellen für Isoprenalin nahm jedoch signifikant zu.

Die basale TPS war für die frischen Zellen mit 234 ± 10 ms signifikant kürzer als für die kultivierten mit 312 ± 22 ms (24h; $p < 0,01$ vs. frisch) bzw. 323 ± 42 (48h; $p < 0,05$ vs. frisch). Sie nahm unter Isoprenalin für die kultivierten Zellen zunächst ab, zeigte aber bei 10^{-7} mmol/l Isoprenalin wieder eine signifikante Verlängerung gegenüber den frisch isolierten Zellen (Abb. IV.14b).

Auch die Relaxationszeit ($RT_{50\%}$) war bei den kultivierten Zellen länger als in den frisch isolierten. Die 24h kultivierten Zellen zeigten tendentiell eine Abnahme der $RT_{50\%}$ bei ansteigender Isoprenalin-Konzentration, bis auf die Isoprenalin-Höchstkonzentration, wo auch die Relaxation wieder verlängert war. Auch nach 48h Zellkultur war die $RT_{50\%}$ sowohl basal als auch unter Isoprenalin gegenüber den frischen Zellen verlängert (Abb. IV.14c).

Eine dazu analoge Tendenz zeigten Verkürzungs- und Relaxationsgeschwindigkeit: Sowohl basal als auch bei niedrigen Isoprenalin-Konzentrationen bis 10^{-7} mmol/l Isoprenalin waren die Geschwindigkeiten der kultivierten Zellen niedriger, stiegen dann aber parallel zu denen der frischen Myozyten ebenfalls an (Abb. IV.14d).

IV.6 Einfluß der Zellkultur auf die Calcium-KWK

In dieser Versuchsreihe wurde die Wirkung ansteigender Konzentrationen von extrazellulärem Calcium beobachtet. Die KWK umfaßte einen Bereich von 1,5 bis 9,0 mmol/l Calcium.

IV.6.1 Die Calcium-Wirkung an frisch isolierten Zellen

Hier wurden 11 Zellen aus 8 Herzen gemessen.

Abb. IV.15 zeigt die Mittelwerte der gemessenen Kontraktionsveränderungen. Calcium hatte einen dosisabhängigen positiv inotropen Effekt. Die Verkürzungsfraction zeigte einen Anstieg von $4,3 \pm 0,7$ % auf bis zu $7,5 \pm 0,8$ % bei 5,6 mmol/l Ca^{2+} . Bereits ab einer Erhöhung des extrazellulären Calciums auf 1,8 mmol/l war die Zunahme der Verkürzungsfraction signifikant unterschiedlich gegenüber dem Ausgangswert (Abb. IV.15 a).

Die Normalisierung des Ausgangswertes auf 100% zeigte einen kontinuierlichen Anstieg der Verkürzungsfraction auf bis zu 241 ± 54 % bei 9,0 mmol/l Ca^{2+} (Abb. IV.15 b).

IV. Ergebnisse

Mit steigender Verkürzung bei höheren Calcium- Konzentrationen ging eine Zunahme der TPS einher, die ab 4,0 mmol/l Ca^{2+} mit 332 ± 30 ms gegenüber initialen 286 ± 32 ms Signifikanzniveau erreichte. Die $\text{RT}_{50\%}$ stieg ebenfalls an: beginnend bei 119 ± 21 , erreichte sie ab 5,6 mmol/l Ca^{2+} mit 145 ± 19 einen signifikanten Unterschied gegenüber dem Ausgangswert (Abb. IV.15 c).

Verkürzungs- und Relaxationszeit nahmen bis 5,6 mmol/l Ca^{2+} zu, um dann unter das Ausgangsniveau abzufallen (Abb. IV.15 d).

IV. Ergebnisse

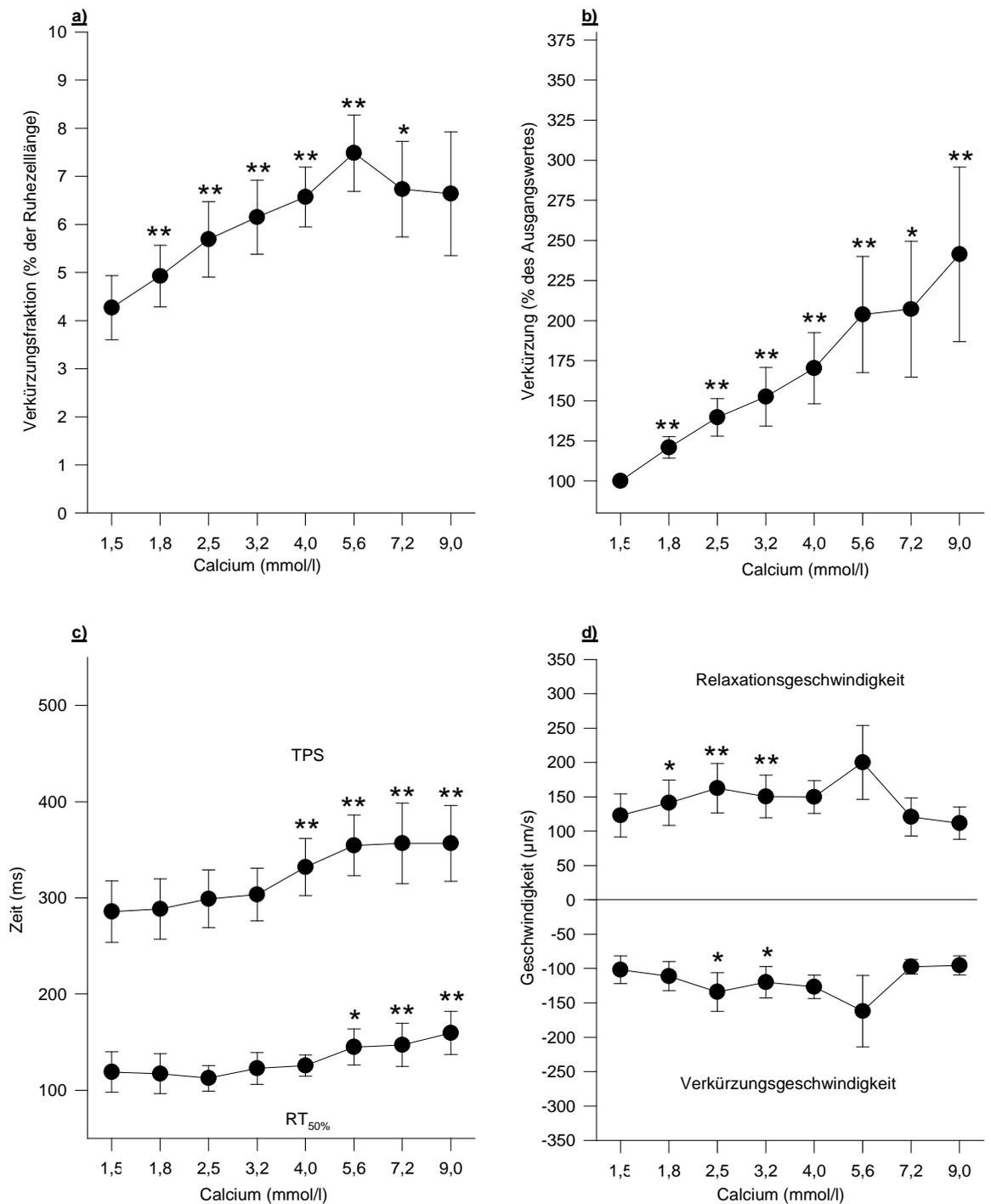


Abb. IV.15: Calcium-KWK an frisch isolierten Myozyten. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM. Nach statistischer Testung entspricht * = $p < 0,05$ und ** = $p < 0,01$ gegenüber dem jeweiligen Ausgangswert.

a: Verkürzungsfraction in % der Ruhezelllänge; b: Verkürzung relativ zur Ausgangsverkürzung; c: Zeit bis zur maximalen Zellverkürzung (TPS, time to peak shortening) und Dauer der Relaxation auf 50% der Ruhezelllänge ($RT_{50\%}$); d: Verkürzungs- und Relaxationsgeschwindigkeit

Eine Zusammenfassung der Mittelwerte zeigt Tab. IV.8:

Calcium (mmol/l)	1,5	1,8	2,5	3,2	4,0	5,6	7,2	9,0
Anzahl Herzen	8	8	8	8	8	5	5	5
FS	4,3±0,7	4,9±0,6 **	5,7±0,8 **	6,2±0,8 **	6,6±0,6 **	7,5±0,8 **	6,7±1,0 *	6,6±1,3
FS%	100	121±7 **	140±12 **	153±18 **	170±22 **	204±36 **	207±42 *	241±54 **
TPS	286±32	288±31	299±30	303±27	332±30 **	354±31 **	357±42 **	357±39 **
RT _{50%}	119±21	117±21	112±13	123±17	125±11	145±19 *	147±22 **	160±22 **
-dL/dt	-102±20	-111±21	-134±28	-120±23 *	-127±17	-162±52	-97±11	-95±14
+dL/dt	123±31	141±33	162±36 **	150±31 **	150±24	200±54	121±27	112±23

Tab. IV.8: Mittelwerte ±SEM der Kontraktilitätsparameter für die Calcium-KWK an frisch isolierten Myozyten (11 Kardiomyozyten aus 8 Herzen).

*= $p < 0,05$, **= $p < 0,01$ FS= Verkürzung in % der Ruhezelllänge; FS%= Verkürzungsfraction relativ zum Ausgangswert; TPS= Zeit bis zur maximalen Kontraktion (ms); RT_{50%}=Dauer der Relaxation auf 50% (ms); -dL/dt= Verkürzungsgeschwindigkeit (µm/s); +dL/dt= Relaxationsgeschwindigkeit (µm/s)

IV.6.2 Die Calcium-Wirkung an 24h kultivierten Myozyten

In diese Versuchsreihe gingen die Daten von 6 Myozyten aus 5 Herzen ein.

Abb. IV.16 zeigt die Mittelwerte der Versuche. Wiederum wirkte Calcium dosisabhängig positiv inotrop und erzielte in der Verkürzungsfraction einen Anstieg von $3,6 \pm 0,4$ auf $7,0 \pm 0,2$ % bei $9,0 \text{ mmol/l Ca}^{2+}$ (Abb. IV.16 a). Das entsprach einer Zunahme von 100% auf 237 ± 63 % (Abb. IV.16 b). Bereits bei $1,8 \text{ mmol/l Ca}^{2+}$ war die Zunahme signifikant unterschiedlich zum Ausgangswert.

Anfangs stieg die TPS von $287 \pm 30 \text{ ms}$ auf bis zu $367 \pm 42 \text{ ms}$ ($p < 0,01$) bei $3,2 \text{ mmol/l Ca}^{2+}$ an, um dann wieder auf $329 \pm 71 \text{ ms}$ (n.s.) abzusinken. Die RT_{50%} zeigte ein ähnliches Phänomen. Durch das Herausfallen einiger Zellen aus der Versuchsreihe (Arrhythmien, Kontraktur) bei $5,6 \text{ mmol/l Ca}^{2+}$ ergibt sich nur scheinbar ein Abfall der RT_{50%}. Es handelt sich also um ein methodisches Problem, nicht um einen Ca^{2+} -Effekt.

IV. Ergebnisse

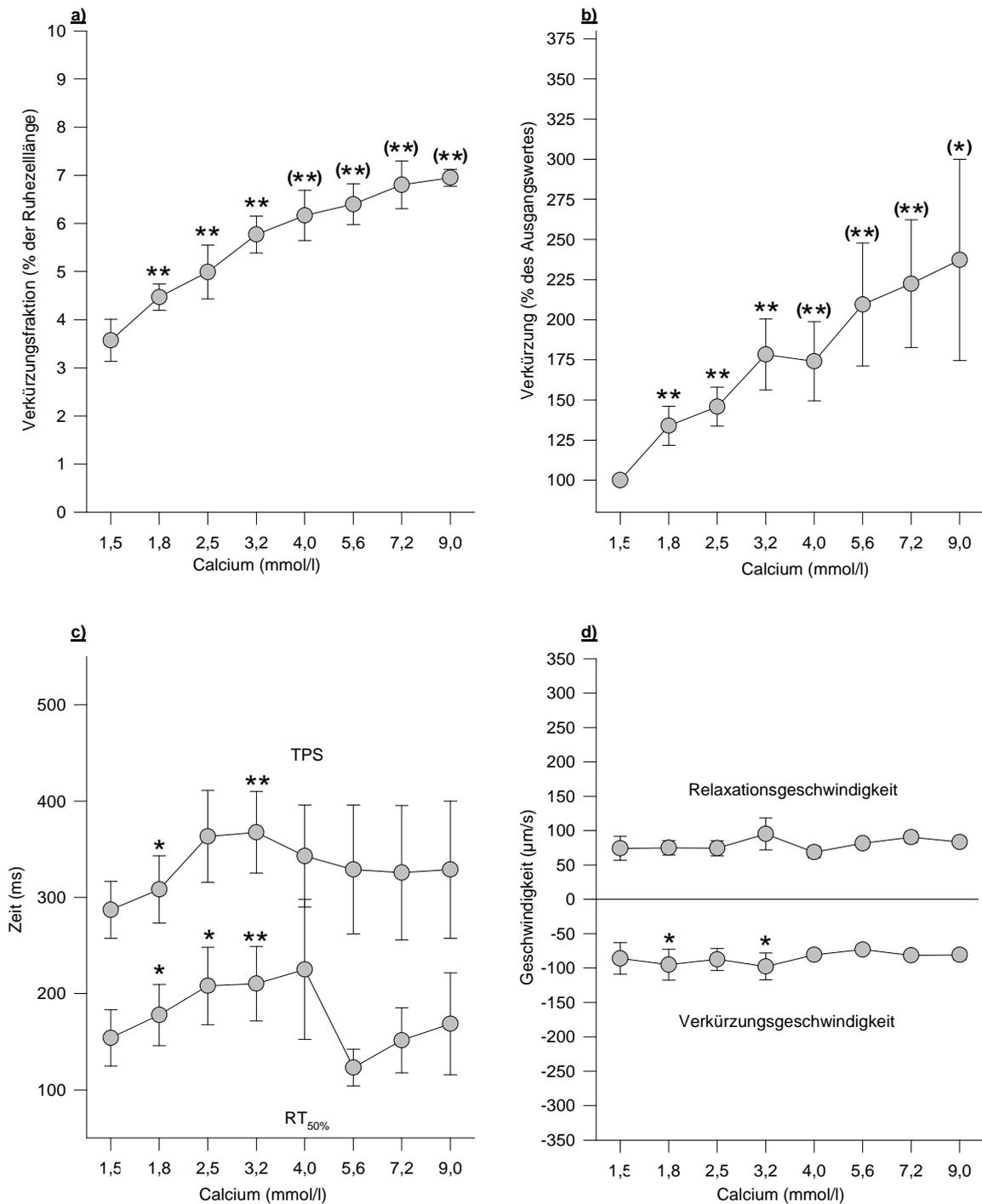


Abb. IV.16: Calcium-KWK an humanen Myozyten nach 24 h primärer Zellkultur. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM. Nach statistischer Testung entspricht $\star = p < 0,05$ und $\star\star = p < 0,01$ gegenüber dem jeweiligen Ausgangswert.

a: Verkleinerungsfraction in % der Ruhezelllänge; b: Verkleinerung relativ zur Ausgangsverkleinerung; c: Zeit bis zur maximalen Zellverkleinerung (TPS, time to peak shortening) und Dauer der Relaxation auf 50% der Ruhezelllänge ($RT_{50\%}$); d: Verkleinerungs- und Relaxationsgeschwindigkeit

IV. Ergebnisse

Die Relaxationsgeschwindigkeit änderte sich durch Erhöhung der extrazellulären Calciumkonzentration kaum. Die Verkürzungsgeschwindigkeit nahm anfangs von $-86 \pm 23 \mu\text{m/s}$ auf $-98 \pm 20 \mu\text{m/s}$ ($p < 0,05$) bei $3,2 \text{ mmol/l Ca}^{2+}$ zu und näherte sich dann wieder dem Ausgangswert an.

Tabelle IV.9 verschafft einen Überblick über die Mittelwerte:

Calcium (mmol/l)	1,5	1,8	2,5	3,2	4,0	5,6	7,2	9,0
Anzahl Herzen	5	5	5	5	3	2	2	2
FS	$3,6 \pm 0,4$	$4,5 \pm 0,3$ **	$5,0 \pm 0,6$ **	$5,8 \pm 0,4$ **	$6,2 \pm 0,5$ **	$6,4 \pm 0,4$ **	$6,8 \pm 0,5$ **	$7,0 \pm 0,2$ **
FS%	100	134 ± 12 **	146 ± 12 **	178 ± 22 **	174 ± 25 **	209 ± 38 **	222 ± 40 **	237 ± 63 *
TPS	287 ± 30	308 ± 35 *	363 ± 48	367 ± 42 **	343 ± 53	329 ± 67	326 ± 70	329 ± 71
RT _{50%}	154 ± 29	178 ± 32 *	208 ± 40 *	210 ± 39 **	225 ± 73	123 ± 19	151 ± 34	169 ± 53
-dL/dt	-86 ± 23	-95 ± 22 *	-87 ± 16	-98 ± 20 *	-81 ± 5	-73	-82 ± 1	-81 ± 7
+dL/dt	74 ± 18	75 ± 10	74 ± 11	95 ± 23	69 ± 8	82 ± 7	90 ± 8	83 ± 5

Tab. IV.9: Mittelwerte \pm SEM der Kontraktivitätsparameter für die Calcium-KWK nach 24 h Zellkultur (6 Myozyten aus 5 Herzen). * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$. FS = Verkürzung in % der Ruhezelllänge; FS% = Verkürzungsfraction relativ zum Ausgangswert; TPS = Zeit bis zur maximalen Kontraktion (ms); RT_{50%} = Dauer der Relaxation auf 50% (ms); -dL/dt = Verkürzungsgeschwindigkeit ($\mu\text{m/s}$); +dL/dt = Relaxationsgeschwindigkeit ($\mu\text{m/s}$)

IV.6.3 Die Calcium-Wirkung an Myozyten nach 48 h Zellkultur

Die folgenden Versuche wurden an 7 Myozyten aus 5 Herzen durchgeführt.

In Abb. IV.17 sind die Mittelwerte der Versuche abgebildet. Wie erwartet, zeigte sich ein dosisabhängiger positiv inotroper Effekt.

Er erreichte sein Maximum bei $4,0 \text{ mmol/l Ca}^{2+}$ mit einem Anstieg der zellulären Verkürzungsfraction von initial $2,4 \pm 0,1 \%$ auf $6,5 \pm 1,7 \%$ ($p < 0,05$ bei $n=4$). Anschließend fiel die Verkürzungsfraction auf $5,6 \pm 1,4 \%$ ($p < 0,05$ bei $n=2$) ab (Abb. IV.17 a).

IV. Ergebnisse

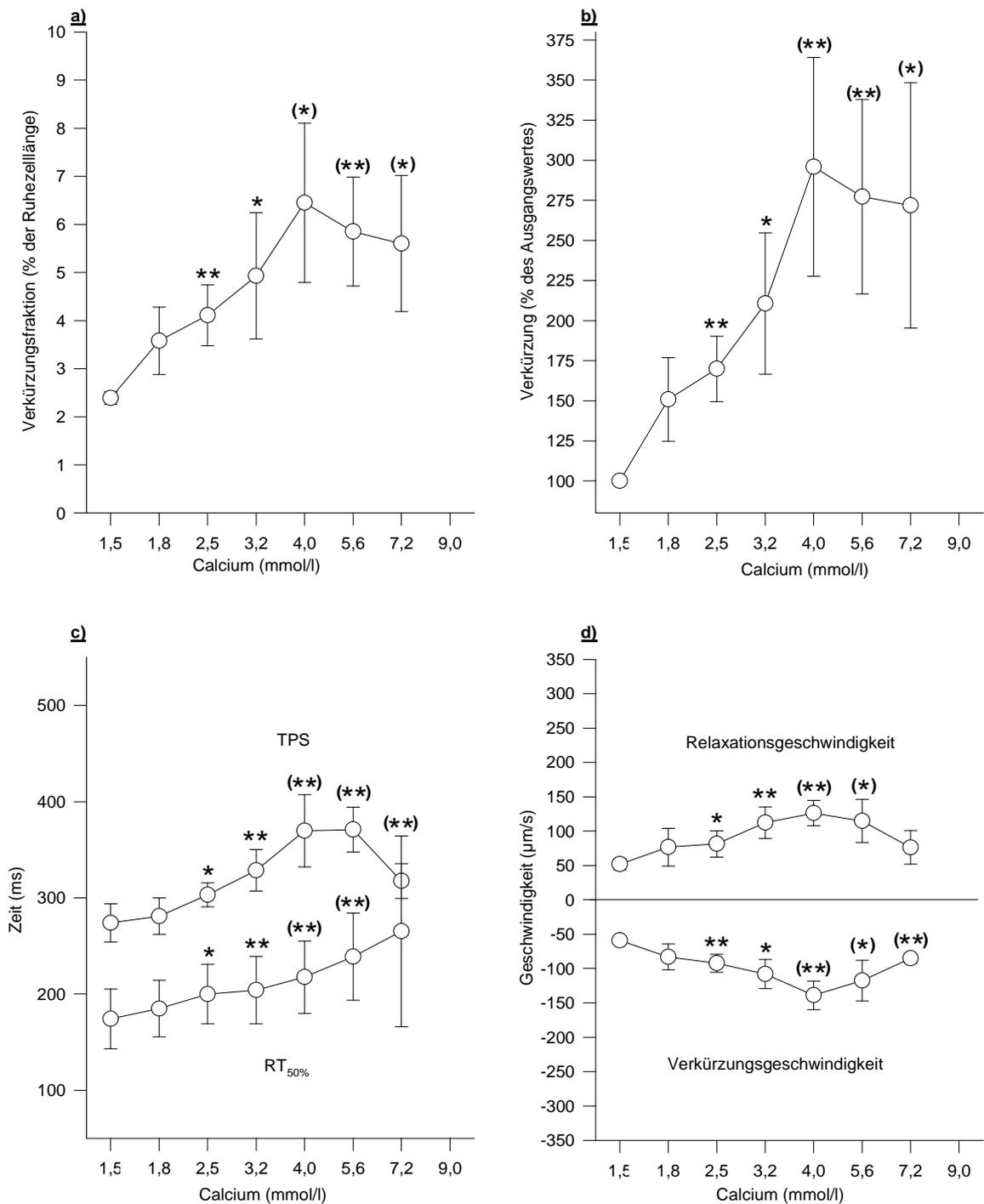


Abb. IV.17: Calcium-KWK bei Kardiomyozyten nach 48h in primärer Zellkultur. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM. Nach statistischer Testung entspricht $\star = p < 0,05$ und $\star\star = p < 0,01$ gegenüber dem jeweiligen Ausgangswert. () = statistisch signifikant getestet bei weniger als 5 Herzen.
a: Verkürzungsfraction in % der Ruhezelllänge; b: Verkürzung relativ zur Ausgangsverkürzung; c: Zeit bis zur maximalen Zellverkürzung (TPS, time to peak shortening) und Dauer der Relaxation auf 50% der Ruhezelllänge (RT_{50%}); d: Verkürzungs- und Relaxationsgeschwindigkeit

IV. Ergebnisse

Auf den Ausgangswert normalisiert, bedeutete das eine Zunahme von 100 % auf 296 ± 68 % ($p < 0,01$ bei $n=4$) mit anschließender Abnahme auf 272 ± 77 % ($p < 0,05$ bei $n=2$). Die TPS wies bis $5,6 \text{ mmol/l Ca}^{2+}$ einen Anstieg von $274 \pm 20 \text{ ms}$ auf $371 \pm 23 \text{ ms}$ ($p < 0,01$ vs. Ausgangswert) mit anschließendem Abfall auf $318 \pm 18 \text{ ms}$ ($p < 0,01$ vs. Ausgangswert) auf. Die $RT_{50\%}$ stieg kontinuierlich von 174 ± 31 bis auf bis zu $265 \pm 99 \text{ ms}$ an (Abb.IV.17 c). Verkürzungs- und Relaxationsgeschwindigkeit verzeichneten eine Zunahme, die bei $4,0 \text{ mmol/l Ca}^{2+}$ maximal war.

Eine Übersicht über die Mittelwerte gewährt Tabelle IV.10.

Calcium (mmol/l)	1,5	1,8	2,5	3,2	4,0	5,6	7,2
Anzahl Herzen	5	5	5	5	4	4	2
FS	$2,4 \pm 0,1$	$3,6 \pm 0,7$	$4,1 \pm 0,6^{**}$	$4,9 \pm 1,3^*$	$6,5 \pm 1,7^*$	$5,9 \pm 1,1^{**}$	$5,6 \pm 1,4^*$
FS%	100	151 ± 26	$170 \pm 20^{**}$	$211 \pm 44^*$	$296 \pm 68^{**}$	$277 \pm 61^{**}$	$272 \pm 77^*$
TPS	274 ± 20	281 ± 19	$303 \pm 12^*$	$328 \pm 22^{**}$	$370 \pm 38^{**}$	$371 \pm 23^{**}$	$318 \pm 18^{**}$
$RT_{50\%}$	174 ± 31	185 ± 29	$200 \pm 31^*$	$204 \pm 35^{**}$	$217 \pm 38^{**}$	$239 \pm 45^{**}$	265 ± 99
-dL/dt	-59 ± 5	-83 ± 19	$-92 \pm 13^{**}$	$-108 \pm 21^*$	$-139 \pm 21^{**}$	-117 ± 30	$-85 \pm 7^{**}$
+dL/dt	52 ± 8	77 ± 27	$81 \pm 19^*$	$112 \pm 23^{**}$	$126 \pm 18^{**}$	$115 \pm 31^*$	76 ± 25

Tab. IV.10: Mittelwerte \pm SEM der Kontraktilitätsparameter für die Calcium-KWK nach 48h Zellkultur (7 Kardiomyozyten aus 5 Herzen).

*= $p < 0,05$, **= $p < 0,01$. FS= Verkürzung in % der Ruhezelllänge; FS%= Verkürzungsfraction relativ zum Ausgangswert; TPS= Zeit bis zur maximalen Kontraktion (ms); $RT_{50\%}$ =Dauer der Relaxation auf 50% (ms); -dL/dt= Verkürzungsgeschwindigkeit ($\mu\text{m/s}$); +dL/dt= Relaxationsgeschwindigkeit ($\mu\text{m/s}$)

IV.6.4 Einfluß der Zellkultur auf die Calcium-Wirkung

Calcium hatte bei allen drei Gruppen eine positiv inotrope Wirkung. Abb. IV.18 zeigt die Kurvenverläufe der Gruppen zusammengefaßt.

Es bestand ein hochsignifikanter Unterschied in der Ausgangsverkürzung der 48h kultivierten Zellen gegenüber den anderen Gruppen. Wurde dieser durch die Normalisierung der Ausgangswerte auf 100% aufgehoben (Abb. IV.18 a), zeigte sich ein ähnlicher Anstieg der Verkürzungsfraction in den frisch isolierten und den 24 h kultivierten Zellen; demgegenüber stieg die Verkürzungsfraction der 48 h kultivierten Zellen schneller und stärker an. Sie erreichte bei $4,0 \text{ mmol/l Ca}$ mit 296 ± 68 % ihr Maximum. An diesem Punkt schlugen die frisch isolierten Zellen $170 \pm 22\%$ (n.s. vs. 48h) und die 24 h kultivierten 174 ± 25 % vom Ausgangswert ($p < 0,05$ vs.48h bei $n < 5$).

IV. Ergebnisse

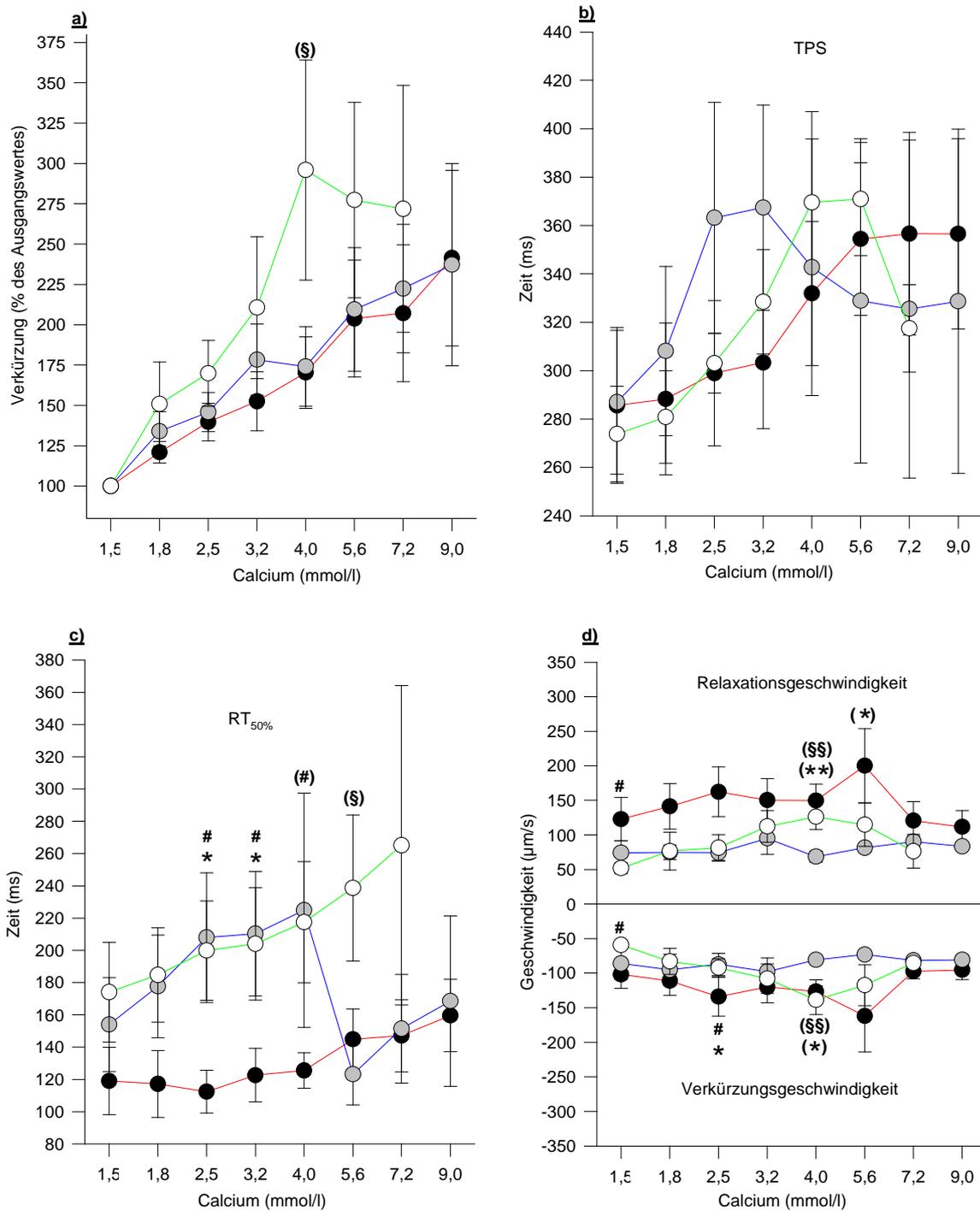


Abb. IV.18: Calcium-KWK an frisch isolierten (geschlossene Kreise, rote Linie), 24 Stunden (graue Kreise, blaue Linie) und 48 Stunden (offene Kreise, grüne Linie) kultivierten Myozyten. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM. Nach statistischer Testung entspricht $\star = p < 0,05$ und $\star\star = p < 0,01$ im Vergleich zwischen frisch isolierten und 24h kultivierten Zellen; $\# = p < 0,05$ und $\#\# < 0,01$ im Vergleich zwischen frisch isolierten und 48h kultivierten Zellen; $\S = p < 0,05$ und $\S\S < 0,01$ im Vergleich zwischen 24h und 48h kultivierten Zellen. Bei Versuchszahlen unter $n=5$ sind die Signifikanzzeichen in Klammern gesetzt.

a: Verkürzung relativ zur Ausgangsverkürzung; b: Zeit bis zur maximalen Zellverkürzung (TPS, time to peak shortening); c: Dauer der Relaxation auf 50% der Ruhezelllänge ($RT_{50\%}$); d: Verkürzungs- und Relaxationsgeschwindigkeit

In der TPS ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

Die halbmaximale Relaxationszeit $RT_{50\%}$ war bei den kultivierten Zellen länger als bei den Frischzellen. Der plötzliche Abfall der $RT_{50\%}$ ist, wie in IV.6.1 dargelegt, auf ein methodisches Problem zurückzuführen.

Die Verkürzungs- und die Relaxationsgeschwindigkeit waren in den 48 h kultivierten Myozyten signifikant niedriger als in den Frischzellen. Dagegen zeigte sich bei 4,0 mmol/l Ca^{2+} , daß die Geschwindigkeit der 24 h kultivierten Zellen signifikant langsamer war als die der anderen Gruppen.

IV.7 Funktionelle Versuche bei Zellen nach Adenovirus-gekoppeltem Gentransfer und 48 Stunden Zellkultur

Die folgenden Versuche wurden mit geringen Zellzahlen durchgeführt. Daher können die Resultate nur als vorläufige Anhaltspunkte betrachtet werden; weitere Untersuchungen mit größeren Fallzahlen sind notwendig.

IV.7.1 Einfluß von Adenovirus-gekoppeltem Gentransfer auf die Verkürzungs-Frequenz-Beziehung

Zur funktionellen Charakterisierung der kultivierten Myozyten wurden wiederum schrittweise Erhöhungen der Stimulationsfrequenz von 0,25 Hz auf 2,5 Hz vorgenommen.

IV.7.1.1 Verkürzungs-Frequenz-Beziehung nach Adenovirus-gekoppeltem Gentransfer und 48 Stunden Zellkultur

Nach adenoviralem Gentransfer und anschließender 48stündiger Zellkultur konnten die Ergebnisse von 4 Zellen aus zwei Herzen ausgewertet werden. Für die Frequenzen von 1,5 Hz waren es 3 Zellen aus 2 Herzen, für 2 Hz 2 Zellen aus 2 Herzen, und bei 2,5 Hz wurde sogar nur eine Zelle aus einem Herzen vermessen. Statistische Methoden sind hier nur eingeschränkt aussagekräftig. Trotzdem sind statistische Tests durchgeführt worden; die Ergebnisse werden aber eingeklammert aufgeführt.

In Abb. IV.19 sind die Mittelwerte der Versuche dargestellt.

Von einer Verkürzung von $2,8 \pm 0,3\%$ ausgehend, lag die Verkürzungsfraction bei 0,5 Hz bei $2,9 \pm 0,5\%$. Mit höherer Stimulationsfrequenz folgte dann ein stetiger Abfall auf schließlich 0,5% bei einer Frequenz von 2,5 Hz (Abb. IV.19 a). Relativ zum Ausgangswert ausgedrückt entsprach dies einem Abfall von 100 % bei 0,25 Hz auf 22 % bei 2,5 Hz (Abb. IV.19 b).

IV. Ergebnisse

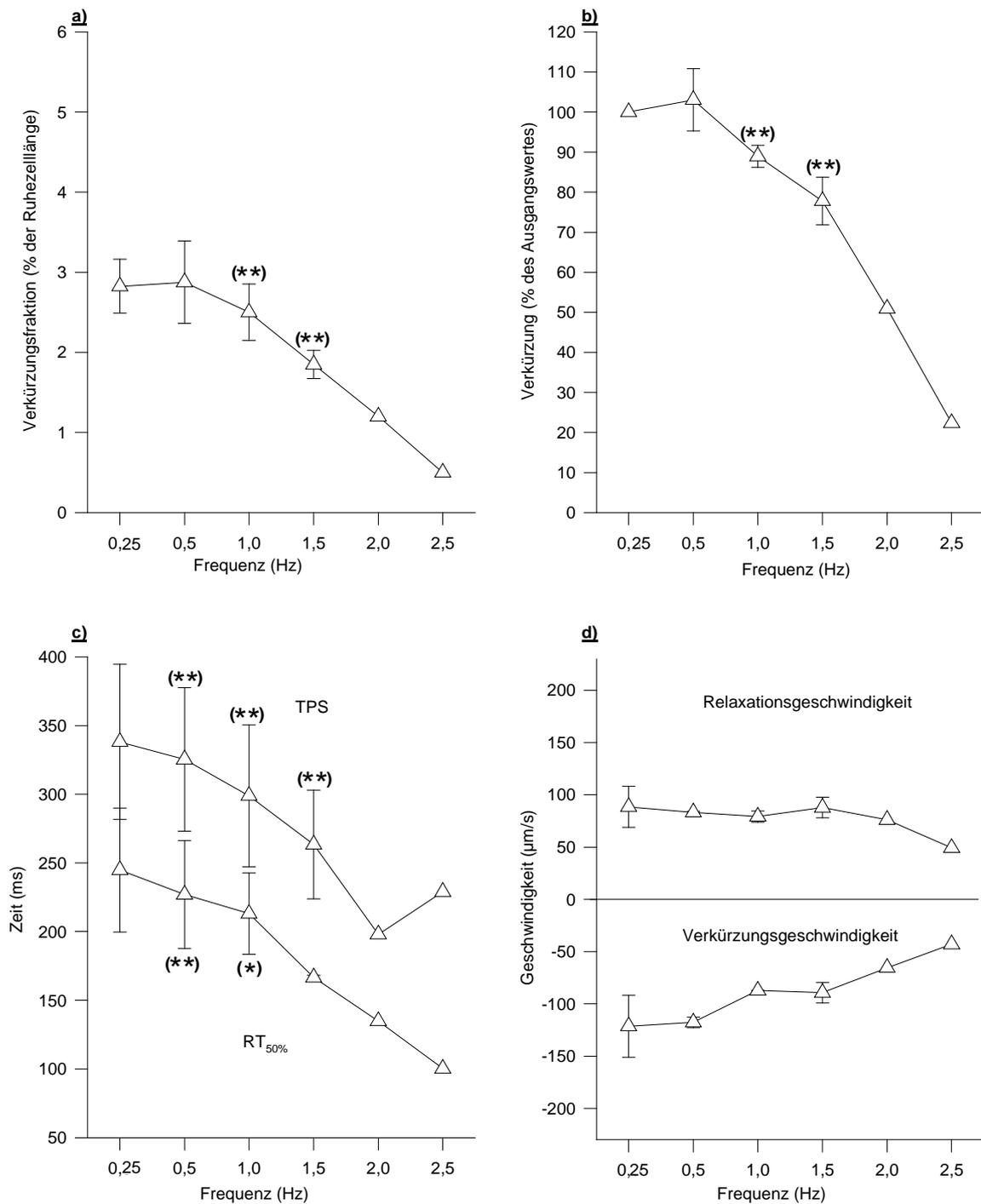


Abb. IV.19: Verkürzungs-Frequenz-Beziehung von Kardiomyozyten nach adenoviralem Gentransfer und 48h in primärer Zellkultur. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM. Nach statistischer Testung entspricht (*) = $p < 0,05$ und (***) $p < 0,01$ gegenüber dem jeweiligen Ausgangswert.

a: Verkürzungsfraction in % der Ruhezelllänge; b: Verkürzung relativ zur Ausgangsverkürzung; c: Zeit bis zur maximalen Zellverkürzung (TPS, time to peak shortening) und Dauer der Relaxation auf 50% der Ruhezelllänge (RT_{50%}); d: Verkürzungs- und Relaxationsgeschwindigkeit

IV. Ergebnisse

Mit recht langer TPS von 338 ± 56 ms bei einer Frequenz von 0,25 Hz beginnend, nahm diese bis auf 229 ms ab. Die $RT_{50\%}$ lag initial bei 254 ± 45 ms und sank auf 100 ms bei 2,5 Hz (Abb. IV.19 c).

Tabelle IV.11 zeigt die Mittelwerte noch einmal zusammengefaßt:

Frequenz (Hz)	0,25	0,5	1	1,5	2	2,5
Anzahl Herzen	2	2	2	2	1	1
FS	$2,8 \pm 0,3$	$2,9 \pm 0,5$	$2,5 \pm 0,4^{(**)}$	$1,9 \pm 0,2^{(**)}$	1,2	0,5
FS%	100	103 ± 8	$89 \pm 3^{(**)}$	$78 \pm 6^{(**)}$	51	22
TPS	338 ± 56	$325 \pm 52^{(**)}$	$299 \pm 52^{(**)}$	$263 \pm 40^{(**)}$	198	229
$RT_{50\%}$	254 ± 45	$227 \pm 39^{(**)}$	$213 \pm 30^{(**)}$	167 ± 2	135	100
-dL/dt	-121 ± 30	-118 ± 5	-87 ± 0	-89 ± 10	-66	-43
+dL/dt	89 ± 20	83 ± 1	79 ± 5	88 ± 10	76	49

Tab. IV.11: Mittelwerte \pm SEM der Kontraktilitätsparameter für die Verkürzungs-Frequenz-Beziehung nach adenoviralem Gentransfer und 48 h Zellkultur (4 Kardiomyozyten aus 2 Herzen).

*= $p < 0,05$, **= $p < 0,01$ bei $n=2$. FS= Verkürzung in % der Ruhezelllänge; FS%= Verkürzungsfraction relativ zum Ausgangswert; TPS= Zeit bis zur maximalen Kontraktion (ms); $RT_{50\%}$ =Dauer der Relaxation auf 50% (ms); -dL/dt= Verkürzungsgeschwindigkeit ($\mu\text{m/s}$); +dL/dt= Relaxationsgeschwindigkeit ($\mu\text{m/s}$)

IV.7.1.2 Vergleich der Verkürzungs-Frequenz-Beziehungen mit und ohne Gentransfer

Um eventuelle Veränderungen in der kontraktiven Funktion durch einen Gentransfer mit einem Nicht-Funktionsprotein, in diesem Falle mit dem AdLacZ- Virus, herauszuarbeiten, wurden diese Zellen mit den nicht-transfizierten 48 h kultivierten Zellen verglichen. Wie bereits erwähnt, finden statistische Tests durch die geringe Zahl der gemessenen Zellen keine sinnvolle Anwendung und sind deshalb eingeklammert dargestellt.

Wie Abb. IV.20 zeigt, hatten die transfizierten Zellen eine basale Verkürzungsfraction von $2,8 \pm 0,3\%$. Diese unterschied sich wesentlich von der basalen Verkürzungsfraction der nicht transfizierten Zellen mit gleicher Inkubationszeit ($4,5 \pm 0,5\%$). In beiden Gruppen nahm die Verkürzungsfraction im weiteren Verlauf bei Steigerung der Frequenz ab auf 0,5 % (β -Gal) bzw. $0,6 \pm 0,1\%$ (48 h) bei 2,5 Hz. Auf den Ausgangswert normalisiert, ergaben sich keine wesentlichen Unterschiede zwischen den beiden Gruppen (Abb. IV.20 a), d.h. die Abnahmerate der Kontraktion bei Steigerung der Frequenz war vergleichbar.

In der Kontraktionszeit (TPS) unterschieden sich die Versuchsreihen nicht erheblich (β -Gal 338 ± 56 ms vs. nichttransfiziert 306 ± 20 ms bei 0,25 Hz und β -Gal 229 ms vs. nichttransfiziert 241 ± 22 ms bei 2,5 Hz; Abb. IV.20b).

IV. Ergebnisse

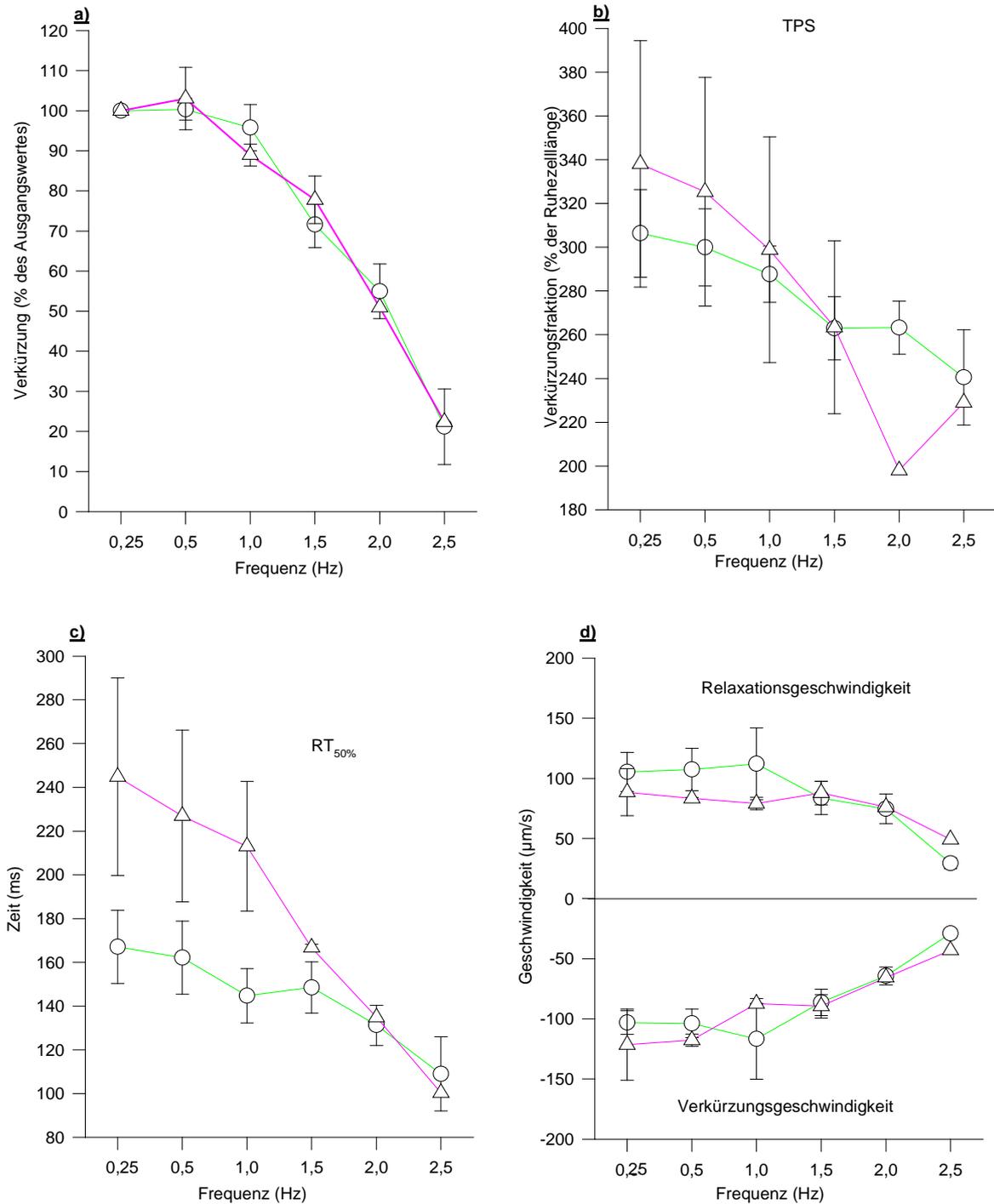


Abb. IV.20: Verkürzungs-Frequenz-Beziehung 48 Stunden kultivierter Myozyten ohne (offene Kreise, grüne Linie) und mit (Dreiecke, Linie in Pink) vorangegangenem adenoviralem Gentransfer. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM. Nach statistischer Testung entspricht $\star = p < 0,05$ und $\star\star = p < 0$. Wegen der geringen Versuchszahlen unter $n=5$ sind die Signifikanzzeichen in Klammern gesetzt a: Verkürzung relativ zur Ausgangsverkürzung; b: Zeit bis zur maximalen Zellverkürzung (TPS, time to peak shortening); c: Dauer der Relaxation auf 50% der Ruhezelllänge (RT_{50%}); d: Verkürzungs- und Relaxationsgeschwindigkeit

Die $RT_{50\%}$ war anfangs bei den AdLacZ-transfizierten Zellen mit 245 ± 45 ms gegenüber den kultivierten Zellen ohne Gentransfer mit 167 ± 17 ms verlängert; ab 1,5 Hz näherten sich die Gruppen einander sehr an (Abb. IV.20 c).

Verkürzungs- und Relaxationszeiten zeigten einen sehr ähnlichen Verlauf (Abb. IV.20 d).

IV.7.2 Einfluß von Adenovirus-gekoppeltem Gentransfer auf die Isoprenalinwirkung

Das Protokoll dieser Meßreihe bestand nach einer basalen Messung bei 0,5 Hz in einer kumulativen Erhöhung der Isoprenalin- Konzentration von 10^{-9} bis 10^{-5} mol/l bzw.

Einzel-dosisversuchen im genannten Konzentrationsbereich.

IV.7.2.1 Wirkung von Isoprenalin nach adenoviral vermitteltem Gentransfer und 48stündiger Zellkultur

In diese Anordnung gingen die Ergebnisse von 2 Zellen aus 2 Herzen ein, die hier dargestellten Ergebnisse zeigen also nur eine vorläufige Tendenz (s.o.).

Isoprenalin vermittelte in den untersuchten Zellen einen positiv inotropen Effekt, der die Verkürzungsfraction von initial $2,6 \pm 0,1$ % auf 3,5 % bei 10^{-6} mmol/l ansteigen ließ (Abb. IV.21a). Auf den Ausgangswert normalisiert, ergab dies eine maximale Zunahme von 25% (Abb. IV.21 b).

Die TPS verlängerte sich vom Basalwert (349 ± 43 ms) ab 10^{-6} mmol/l deutlich auf schließlich 517 ms bei 10^{-5} mmol/l. Isoprenalin beschleunigte die Relaxation (RT_{50} von 256 ± 7 ms basal auf 218 ± 10 bei Isoprenalin 10^{-7} mmol/l (Abb. IV.21 c)).

IV. Ergebnisse

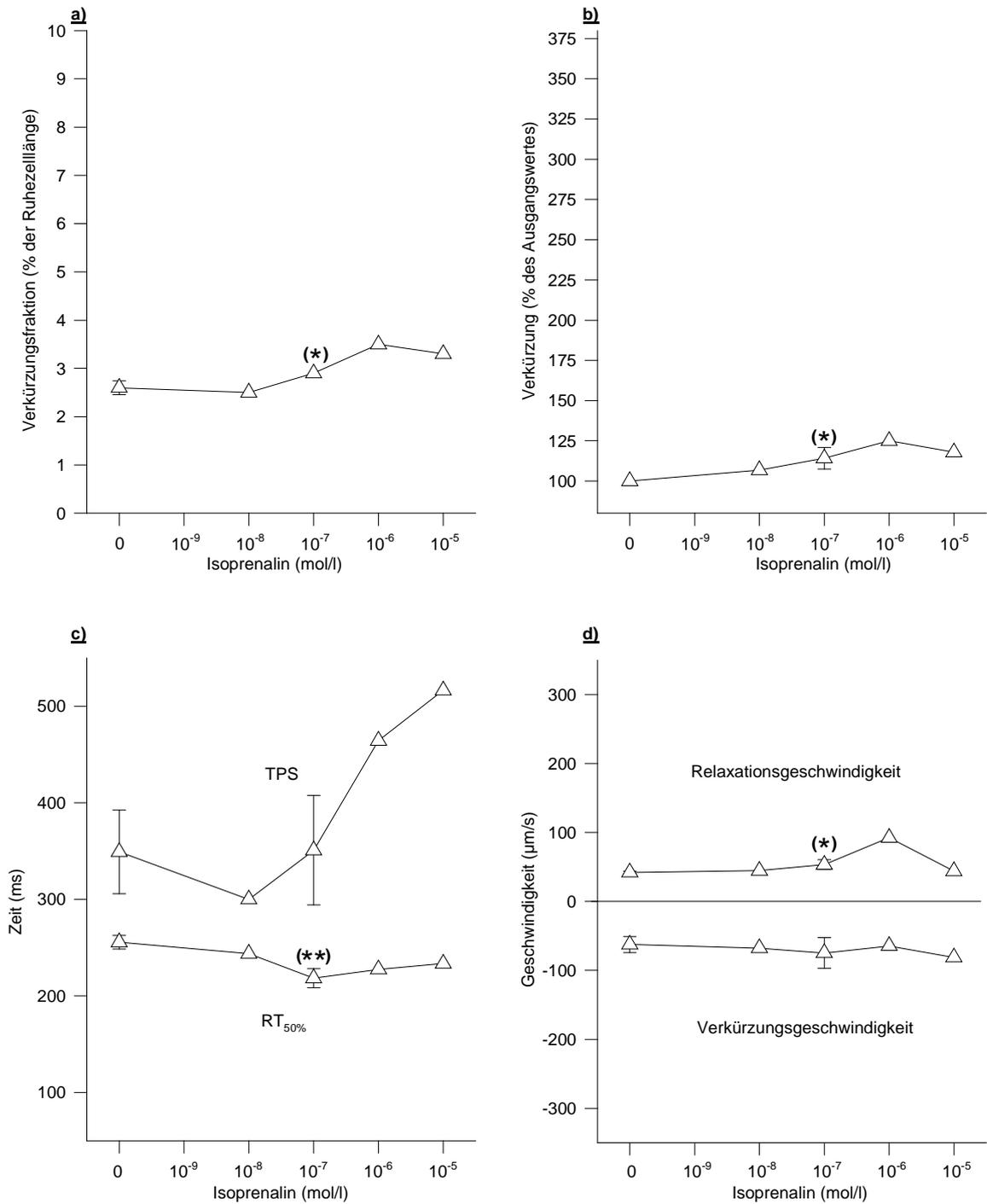


Abb. IV.21: Isoprenalin-KWK bei Kardiomyozyten nach adenoviralem Gentransfer und 48h Zellkultur. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM. Nach statistischer Testung entspricht (*) = $p < 0,05$ bei geringer Fallzahl von $n=2$.
a: Verkürzungsfraction in % der Ruhezelllänge; b: Verkürzung relativ zur Ausgangsverkürzung; c: Zeit bis zur maximalen Zellverkürzung (TPS, time to peak shortening) und Dauer der Relaxation auf 50% der Ruhezelllänge ($RT_{50\%}$); d: Verkürzungs- und Relaxationsgeschwindigkeit

Tabelle IV.12 zeigt die Werte zusammenfassend:

Isoprenalin (mmol/l)	0	10^{-8}	10^{-7}	10^{-6}	10^{-5}
Anzahl Herzen	2	1	2	1	1
FS	2,6±0,1	2,5	2,9±0 (*)	3,5	3,3
FS%	100±0	107	114±7 (*)	125	118
TPS	349±43	300	351±57	465	517
RT _{50%}	256±7	244	218±10 (**)	228	234
-dL/dt	-62±12	-68	-75±22	-65	-81
+dL/dt	42±2	45	53±7 (*)	93	44

Tab. IV.12: Mittelwerte ±SEM der Kontraktilitätsparameter für die Isoprenalin-KWK nach adenoviralem Gentransfer und 48 h in primärer Zellkultur (2 Kardiomyozyten aus 2 Herzen).

*= $p < 0,05$, **= $p < 0,01$ bei $n=2$. FS= Verkürzung in % der Ruhezelllänge; FS%= Verkürzungsfraction relativ zum Ausgangswert; TPS= Zeit bis zur maximalen Kontraktion (ms); RT_{50%}=Dauer der Relaxation auf 50% (ms); -dL/dt= Verkürzungsgeschwindigkeit ($\mu\text{m/s}$); +dL/dt= Relaxationsgeschwindigkeit ($\mu\text{m/s}$)

IV.7.2.2 Isoprenalinwirkung an Myozyten nach Adenovirus-gekoppeltem Gentransfer des LacZ-Gens

Eine Zusammenstellung der Mittelwerte der über 48 h kultivierten Zellen mit und ohne vorausgegangenen Gentransfer sollte Unterschiede zwischen diesen Gruppen aufzeigen.

Die Verkürzungsfraction war bei den AdLacZ-behandelten Zellen vermindert (basal $2,6 \pm 0,1$ % für die infizierten Zellen vs. $3,9 \pm 0,6$ % für die nicht infizierten; $p < 0,05$; cave: geringe Fallzahl). Wurde diese Differenz durch eine Normalisierung des Ausgangswertes auf 100 % aufgehoben, offenbarten sich dennoch sehr unterschiedliche Verläufe unter Isoprenalin-Einfluß: Während die nicht- infizierten Zellen eine maximale Verkürzungsfraction von 222 ± 58 % bei 10^{-6} mmol/l Isoprenalin zeigten, wiesen die mit AdLacZ infizierten Myozyten dort 125 % als maximal mögliche Zunahme der Verkürzungsfraction auf.

Die TPS zeigte bis 10^{-7} mmol/l Isoprenalin einen parallelen Verlauf. Dann nahm sie bei den nicht-infizierten Myozyten ab auf 260 ms und stieg bei dem infizierten Myozyten auf 517 ms an.

Die RT_{50%} war mit initial 256 ± 7 ms gegenüber 194 ± 44 ms bei der nicht-infizierten Gruppe verlangsamt und blieb das über den gesamten Versuch.

Auch die Verkürzungs- und Relaxationsgeschwindigkeiten waren gegenüber den nicht-infizierten Zellen verlangsamt.

IV. Ergebnisse

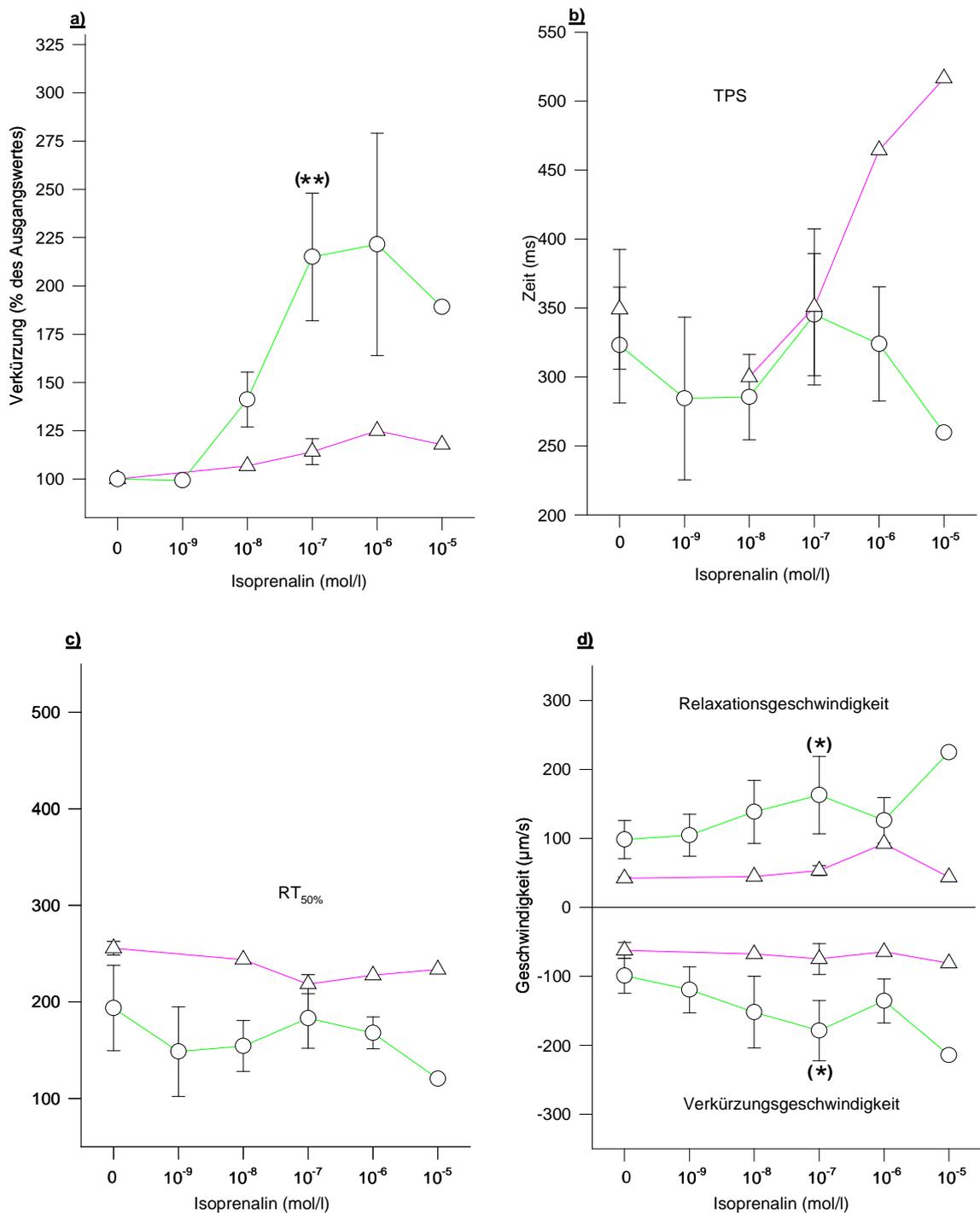


Abb. IV.22: Isoprenalin-KWK an 48 Stunden kultivierten Myozyten ohne (offene Kreise, grüne Linie) und mit (Dreiecke, Linie in Pink) vorangegangenem adenoviralem Gentransfer. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM. Nach statistischer Testung entspricht (*) = $p < 0,05$ und (***) $p < 0,01$ bei Versuchszahlen von $n=2$.

a: Verkürzung relativ zur Ausgangsverkürzung; b: Zeit bis zur maximalen Zellverkürzung (TPS, time to peak shortening); c: Dauer der Relaxation auf 50% der Ruhezelllänge ($RT_{50\%}$); d: Verkürzungs- und Relaxationsgeschwindigkeit

Wiederum muß betont werden, daß diese Ergebnisse bei den geringen Versuchszahlen von $n=2$ für AdLacZ unter Vorbehalt zu betrachten sind.

V. Diskussion

Zellkultur und Adenovirus-vermittelter Gentransfer sind Techniken, die weitreichende Untersuchungen veränderter Genexpression und Zellfunktion ermöglichen. Jedoch beeinflusst schon die Zellkultur an sich das biologische Verhalten der Zellen. An humanen Myozyten liegen bisher kaum Daten über diese Veränderungen vor.

Die wichtigsten Befunde der vorliegenden Arbeit bestehen darin, daß

1. durch enzymatische Zellisolation mittels Koronarperfusion aus terminal insuffizienten menschlichen Herzen funktionstüchtige Myozyten mit erhaltener inotroper Kompetenz gewonnen werden können,
2. die primäre Zellkultur möglich ist, wobei die Kontraktionsamplitude leicht reduziert und die Kontraktions- und Relaxationsparameter verlängert werden,
3. Zellkultur die Empfindlichkeit für Isoprenalin erhöht, nicht aber die maximale Ansprechbarkeit, während sich die Antwort auf steigende Stimulationsfrequenzen gegenüber frisch isolierten Zellen nicht grundsätzlich verändert,
4. die relative Zunahme der Verkürzungsfraction durch die Erhöhung des extrazellulären Ca^{2+} gesteigert werden kann
5. Adenovirus-vermittelter Gentransfer des Reportergens LacZ auch an humanen Myozyten effizient möglich ist, und daß der Gentransfer per se die kontraktile Funktion und die Ansprechbarkeit auf das Katecholamin Isoprenalin ebenfalls zu beeinflussen scheint.

V.1 Humanes Myokard

Untersuchungen der myokardialen Funktion und des pharmakologischen Ansprechens auf verschiedene Substanzen mit dem Ziel positiver Inotropie stehen seit Jahren im Mittelpunkt der Herzinsuffizienzforschung. In neuerer Zeit wurde die Methode des viral vermittelten Gentransfers in der Herzinsuffizienzforschung etabliert (Donahue et al., 1997; Akhter et al., 1997; Hajjar et al., 1998; del Monte et al., 1999 und 2002; Lehnart et al., 2000). Neueste Überlegungen betreffen nun auch die Transplantation embryonaler und adulter Stammzellen (Dowell et al., 2003; Passier und Mummery, 2003).

Die physiologische Herzkontraktion besteht aus isometrischer Kraftentwicklung (um Druck im Ventrikel zu erzeugen) und aus isotonischer Verkürzung (um das Blut auszuwerfen). In vitro wird meist nur eine dieser Bedingungen erfüllt. Daher können die unterschiedlichen Untersuchungsmethoden Teilaspekte der kardialen Kontraktilität erfassen. Es stellt sich immer die Frage, welche Methode für die vorliegende Fragestellung die geeignete ist, welche Vor- und Nachteile sie bietet und inwieweit die Ergebnisse auf den Gesamtorganismus übertragbar sind.

Untersuchungen in vivo, in denen die klinischen Parameter „Herzzeitvolumen“ (HZV), „linksventrikuläre Ejektionsfraktion“ (EF) und „maximale Druckerhöhungsgeschwindigkeit“ (dP/dt_{max}) als Parameter der Kontraktilität sicher erfaßt werden können, scheinen für die Übertragbarkeit auf den Gesamtorganismus am sinnvollsten. Abgesehen davon, daß Untersuchungen dieser Art für die schwer kranken Patienten nicht zumutbar sind, spielen hier stets verschiedene Einflußgrößen mit hinein: Alle kontraktile Mechanismen zeigen eine Abhängigkeit von der Vor- und Nachlast des Herzens. Diese wiederum werden durch den Gefäßtonus und die Inotropie bestimmt.

In-vitro-Methoden minimieren diese extrakardialen Faktoren und machen dazu bestimmte Untersuchungen, die Patienten nicht zumutbar sind, überhaupt erst möglich.

Die Verwendung von humanem Myokard unterliegt allerdings mehreren Beschränkungen: Es fehlt an gesundem Vergleichsmaterial, denn Myokard nicht- insuffizienter Herzen steht nur dann zur Verfügung, wenn das Herz eines zur Organspende bereiten und zugelassenen Patienten aus technischen Gründen nicht transplantiert werden kann. Erstens tritt dieser Fall aufgrund des enormen Spenderorganmangels selten ein, und zweitens sind bei solchen Herzen kardiale Veränderungen nicht auszuschließen, wie Owen et al. zeigen konnten (1999). Das macht die Einstufung als „gesund“ fragwürdig.

Auch terminal insuffizientes Myokard ist nur in beschränkter Menge verfügbar, so daß hier neben den explantierten Herzen aus der Uniklinik Göttingen auch Herzen aus den Herzzentren Bad Oeynhausen, Heidelberg und Freiburg untersucht wurden. Daraus ergab sich eine Transportzeit von bis zu 10 Stunden bis zum Beginn der Isolation. Die Verwendung von carbogengesättigter Krebs-Henseleit-Tyrode mit dem Zusatz von 2,3-Butandion-Monoxim

(BDM) löste dieses logistische Problem weitgehend. BDM vermindert den Sauerstoffbedarf des Herzens und schützt vor Kontraktur. Diese Effekte treten schnell ein und sind durch Auswaschen voll reversibel (Mulieri et al., 1989).

Als eine weitere Limitation der Methode muß angeführt werden, daß das Herzmaterial, mit dem die Versuche durchgeführt wurden, nicht - wie z. B. im Tierversuch üblich - standardisiert war bezüglich Alter, Geschlecht und Grundkrankheit.

Die Verwendung ventrikulärer Myokardpräparate aus explantierten menschlichen Herzen ist trotz des eingeschränkt verfügbaren Untersuchungsmaterials und der recht komplizierten Beschaffungslogistik von großem Vorteil. Wie Hasenfuss (1998b) zusammenfaßt, haben Untersuchungen zur Herzinsuffizienz an Kleinsäugetern, aber auch an Hunden und Schafen Limitationen in ihrer Übertragbarkeit auf den Menschen. Somit scheint die direkte Untersuchung von humanem Material notwendig und stellt - bei allen methodischen Nachteilen - die pathophysiologische Situation am besten dar.

V.1.1 Myozyten versus multizelluläre Muskelstreifenpräparate

Experimentelle Untersuchungen in vitro können außer an isolierten Ganzherzen entweder am Muskelstreifen-Präparat oder an der isolierten Einzelzelle durchgeführt werden.

Die Vorteile der Muskelstreifen-Präparate liegen darin, daß durch kontrollierte Dehnung des Präparates die Vorlastbedingungen konstant eingestellt werden können.

Der Vorteil der isolierten Myozyten besteht darin, daß das Medium die Zelle direkt umspült und daher eine optimale Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff gewährleistet ist. Auch die Applikation von Pharmaka erfolgt sicher, und parakrine Faktoren z.B. aus dem Endothel sind eliminiert. Außerdem gibt es bei der Gewinnung von linksventrikulären Trabekeln oft technische Probleme, so daß häufig rechtsventrikuläres Gewebe benutzt wird.

Es gibt daher Gründe, warum sich die Ergebnisse unterscheiden könnten, z.B. die Art der Kontraktion - isoton versus isometrisch - , die enzymatische Isolation - gibt es hier ein „Überleben der Stärksten“? - bei den Myozyten; in den multizellulären Präparationen parakrine Faktoren und der Einfluß von extrazellulärer Matrix. Wenn Myozyten als Modell

für kontraktiles Verhalten brauchbar sein sollen, dann müssen die Ergebnisse mit denen multizellulärer Präparationen vergleichbar sein.

Brixius et al. (2001) konnten anhand von Experimenten an Myozyten und Muskelstreifen aus denselben Herzen zeigen, daß deren Ergebnisse bezüglich ihrer Frequenzinotropie vergleichbar sind. Harding et al. (1991) wiesen eine vergleichbare kontraktile Antwort von Myozyten und Muskelstreifen aus jeweils denselben Herzen auf extrazelluläre Ca^{2+} -Erhöhung nach, fanden aber auf Isoprenalin eine stärkere Zunahme der Kontraktilität in Myozyten. Die Temperatur der Myozytenversuche lag allerdings mit $32^{\circ} C$ deutlich unter der der Muskelstreifen ($37^{\circ} C$).

V.2 Methoden

V.2.1 Isolation

1981 gelang es Powell et al. erstmals, humane Kardiomyozyten aus Kinderherzen enzymatisch zu isolieren, die sich durch Feldstimulation zum Kontrahieren anregen ließen. Ein Jahr später waren Bustamante et al. (1982) auch in der Isolation calciumtoleranter Humanmyozyten von Erwachsenen erfolgreich. In den folgenden Jahren wurde die enzymatische Isolation der Humanmyozyten vielfach aufgegriffen und weiterentwickelt, wobei verschiedene Enzyme wie Kollagenase (Powell et al., 1981; Silver et al., 1983), zusätzlich Protease (Bustamante et al., 1982) und weitere Zusätze wie Hyaluronidase (Peeters et al., 1995) zum Einsatz kamen.

Die Isolation von Myozyten aus menschlichen Herzen ist mit verschiedenen Problemen behaftet. Das ist teils der starken Fibrose des Gewebes anzulasten, die einen aggressiveren Einsatz von Enzymen als beispielsweise in Kleintierherzen erfordert. Dazu kommen starke interindividuelle Gewebsunterschiede, die immer wieder neue Einwirkzeiten der Enzyme erfordern. Außerdem ist es oft schwierig, eine ausreichend große Menge an Gewebe zu bekommen, wie sie für das in der vorliegenden Arbeit benutzte Protokoll erforderlich ist. Dann hilft die sogenannte „Chunk“- Methode weiter, bei der kleine Stückchen Myokard in

Enzymlösung inkubiert werden. Bei uns ergab auch diese Methode funktionstüchtige Zellen, allerdings in geringerer Anzahl.

Das für diese Arbeit angewandte Protokoll ist eine Modifikation der Veröffentlichungen von Mattiello et al. (1998) und Silver et al. (1983) und ergab morphologisch sehr gute Zellen, die physiologische Calcium-Konzentrationen des Außenmediums und physiologische Temperaturen tolerierten.

V.2.2 Versuchsbedingungen

Wenn schon rein isometrisch oder isotonisch kontrahierende Präparate immer nur eine Komponente der Herzkontraktion wiedergeben können, sollten die übrigen

Versuchsbedingungen möglichst nah an physiologischen Parametern orientiert sein.

Untersuchungen an isolierten Myozyten werden häufig bei unphysiologisch niedrigen Temperaturen von 32° C durchgeführt (Davies CH et al., 1995; Harding et al., 1991; Davia et al., 1997), oder sogar bei Raumtemperatur (Piot et al., 1996). Weisser et al. (2001) konnten zeigen, daß milde Hypothermie (bis 31° C) in Menschen- und Schweinemyokard positiv inotrope Effekte hat. Sie schrieben das v.a. einer Sensitivierung der Myofilamente zu. Die vorliegenden Versuche wurden bei Temperaturen zwischen 35,5 und 37,5 ° C durchgeführt, um derartige Einflüsse möglichst auszuschalten.

V.2.2 Zellkultur

Primäre Zellkultur ist die Vorbedingung für eine Reihe von experimentellen Protokollen, z.B. solchen, die mit vektorvermitteltem Gentransfer arbeiten. Wie Mitcheson et al. (1998) in einer Übersicht darlegen, sind die meisten Versuche an neonatalen Myozyten durchgeführt worden.

Es ist allerdings schwierig, diese Experimente auf erwachsene Organismen zu übertragen.

Außerdem gibt es Probleme in der Extrapolierung von Studien an Kleinsäugetieren auf humanes insuffizientes Myokard.

Abhängig von Spezies und Kulturbedingungen ist die Zellkultur von Kardiomyozyten mit zellulären Veränderungen behaftet. Dazu gehören De-Differenzierung und Änderung mechanischer und elektrischer Eigenschaften (Berger et al., 1994; Ikeda et al., 1990; Piper et

al., 1990). An menschlichen isolierten Herzmuskelzellen sind solche Veränderungen bisher nicht beschrieben.

Für die Zellkulturen in dieser Studie wurde serumfreies Kulturmedium benutzt (siehe auch I.4.1), weil die Funktionsmessungen bei möglichst wenig entdifferenzierten Zellen stattfinden sollten. Wir benutzten Medium M199 mit Zusätzen, die in ähnlicher Zusammensetzung schon in anderen Studien gute Resultate in den Überlebensraten der Zellen zeigten (Volz et al., 1991).

V.2.3 Adenoviral vermittelter Gentransfer

Verschiedene Änderungen auf molekularer Ebene sind für menschliche insuffiziente Herzen beschrieben, z.B. die reduzierte Expression der SERCA2a (Hasenfuss et al., 1994c) oder der β_1 -Adrenozeptoren (Bristow et al., 1982). Ein Gentransfer solcher Funktionsproteine in insuffizientes Myokard scheint nützlich, um den Anteil der jeweiligen Veränderung am Krankheitsgeschehen abschätzen zu können.

In Kaninchenmyokard konnte durch gelungenen adenoviral vermittelten Gentransfer mit einer Überexpression des β -Adrenozeptors die β -adrenerge Antwort potenziert werden (Akhter et al., 1997; Drazner et al., 1997; Maurice et al., 1999). Die Überexpression des SERCA2a-Gens bewirkte verbesserte Kontraktions- und Relaxationskinetiken (Giordano et al., 1997; Hajjar et al., 1997; Meyer et al., 1999).

Zusätzlich sorgte der Gentransfer von üblicherweise nicht im Myokard exprimierten Proteinen wie dem Vasopressin V_2 -Rezeptor für eine erhöhte Kontraktilität in Rattenmyozyten durch eine Modulation der endogenen adenylatzyklase-vermittelten Signaltransduktion (Laugwitz et al., 1999). Auch der Transfer des normalerweise im Skelettmuskel exprimierten SERCA1-Gens in Rattenmyozyten bewirkte einen Anstieg der SR- Ca^{2+} -Aufnahme und eine Beschleunigung der Kontraktions- und Relaxationskinetik (Chossat et al., 2001).

Del Monte et al. (1999) konnten erstmals einen gelungenen Gentransfer mit einem Funktionsprotein in menschliche Kardiomyozyten publizieren. Sie zeigten, daß eine adenoviral vermittelte Überexpression der SERCA2a in einer erhöhten Ca^{2+} -Aufnahme des SR und einer besseren Kontraktilität bei höheren Stimulationsraten resultierte. Allerdings wurden weder alle kontraktilen Parameter benannt, noch die genaue Infektionsrate und -effizienz bei einer MOI von 100 pfu pro Zelle. Auch der Einfluß der Zellkultur und der der adenoviralen Infektion als solcher wurden nicht untersucht. In einer anderen Studie von del Monte et al. (2002) wurden menschliche insuffiziente Myozyten entweder mit SERCA2a, antisense-Phospholamban oder zum Vergleich mit dem Reportergen LacZ transfiziert. Wiederum verbesserten die funktionellen Veränderungen die Kontraktionsamplitude und Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeiten. Die Ausgangsbedingungen der frisch isolierten Zellen wurden aber ebenso wenig benannt wie die Kontraktilitätsänderungen auf erhöhte Stimulationsfrequenzen.

Williams et al. (2004) maßen an humanen Zellen aus zehn Herzen nach 24 Stunden Zellkultur den Einfluss von β -AdrenozeptorKinase-1 (β ARK-1)-Inhibierung mittels Gentransfer. Nach o.g. Kultivierungszeit ließ sich zwischen lediglich kultivierten und AdGFP-transfizierten Zellen kein signifikanter Unterschied in der Kontraktionsamplitude und der Antwort auf β -Stimulation durch Isoprenalin erzielen. Über Ausgangsbedingungen, Temperatur und Stimulationsfrequenz findet sich keine Aussage.

V.3 Funktionsmessungen

V.3.1 Basale Kontraktion frisch isolierter und kultivierter Zellen

Die ventrikulären Zellen dieser Studie verkürzten sich im Mittel um $4,7 \pm 0,2\%$ ihrer Ruhezelllänge bei 0,5 Hz. Das entspricht etwa den Werten, die Dipla et al. (1999) in einer Studie mit $5,21 \pm 0,61$ angaben. In anderen Untersuchungen variierte die Verkürzungsfraction bei 0,5 Hz von $8,1 \pm 0,5\%$ (Brixius et al., 2001) bei 32°C bis $2,88 \pm 0,42\%$ (Harding et al., 1991), ebenfalls bei 32°C .

Nach 24 bzw. 48 Stunden in Zellkultur zeigten sich Veränderungen im Kontraktionsverhalten der kultivierten gegenüber frisch isolierten Zellen: Die Verkürzungsfraction sank nach 24

Stunden in Zellkultur um 21%. Dabei stiegen die Verkürzungs- und Relaxationszeiten an und die Verkürzungs- und Relaxationsgeschwindigkeiten verlangsamten sich. Nach 48-stündiger Kulturdauer ließ sich in der Verkürzungsfraction gegenüber den frisch isolierten Zellen kein signifikanter Unterschied ausmachen; die Verkürzungs- und Relaxationsparameter verlangsamten sich aber sämtlich gegenüber denen der frisch isolierten Zellen.

Das Umfeld kultivierter Myozyten unterscheidet sich stark von dem *in vivo*. Es ist bekannt, daß in Kultur gehaltene Zellen einen Teil ihrer Kontraktilität einbüßen: an Kaninchenmyozyten, die über 72 Stunden kultiviert worden waren, beobachteten Meyer et al. (1999) eine Reduktion der Verkürzungsfraction um 37% und einen Anstieg der $RT_{50\%}$ um 34%. Bei adulten Rattenmyozyten bewegte sich das Ausmaß der Funktionseinbuße nach 72 Stunden in Zellkultur bei 30 bis 50% sowohl für die Verkürzungsfraction wie auch für die Verkürzungsgeschwindigkeit (Berger et al., 1994); wurden sie in der Zellkultur elektrisch stimuliert, war das nicht der Fall. Die kultivierten und mit 3 Hz stimulierten Zellen unterschieden sich in keinem der untersuchten Parameter (relative Verkürzung, Verkürzungs- und Relaxationszeiten und -geschwindigkeiten) signifikant von den frisch isolierten Vergleichszellen. Dabei unterschieden sich stimulierte und unstimulierte Zellen gleicher Kulturdauer im Phasenkontrastmikroskop morphologisch nicht voneinander. Mit Hilfe von Verapamil wurde in dieser Versuchsreihe ein Teil der Myozyten elektromechanisch entkoppelt. Diese Zellen zeigten trotz Stimulation dieselben Funktionseinbußen wie die nichtstimulierten. Daraus schlossen die Autoren, daß der Funktionserhalt mit der Kontraktion der Zellen an sich und nicht nur mit der Erregung der Zellmembran verknüpft ist. Entsprechende Vergleichsversuche zwischen frisch isolierten und kultivierten menschlichen Myozyten sind in der Literatur nicht zu finden; im Trend entsprachen unsere Ergebnisse aber den oben erwähnten Tierversuchen.

Eine weitere mögliche Erklärung für die herabgesetzte Kontraktilität findet sich bei Pollack et al. (1991), die feststellten, daß alleine die Adhäsion der Zellen an eine mit Laminin vorbehandelte Oberfläche bei Katzenmyozyten zu einer geringeren und verlangsamten

Kontraktion führte. Allerdings wurde bei uns auch im „Frischexperiment“ Laminin als Anheftungshilfe für die Zellen verwendet, so daß dies nicht das gesamte Ausmaß an Kontraktilitätseinbuße erklären kann.

In der vorliegenden Studie wiesen die mit β -Gal-transfizierten Zellen nach 48 Stunden Zellkultur eine Verkürzungsfraction von $2,8 \pm 0,4\%$ auf. Diese lag somit deutlich unter der Verkürzungsfraction frischer Zellen, stimmte jedoch mit Befunden von del Monte et al. (2002) überein, die ebenfalls an humanen Myozyten zwei Tage nach Infektion mit β -Gal-GFP eine Verkürzungsfraction von $2,7 \pm 1\%$ fanden. Über die Eigenschaften der frisch isolierten Zellen im Vergleich wurde bei del Monte et al. jedoch nichts berichtet. Dieser Vergleich war ein Schwerpunkt dieser Arbeit.

Die Relaxationszeit und die Verkürzungs- und Relaxationsgeschwindigkeit verlängerten sich gegenüber den frisch isolierten Zellen. Im Vergleich mit den nicht transfizierten (und gleich lang kultivierten) Zellen zeigten sich außer in der Verkürzungsfraction keine Unterschiede. Bei der Beurteilung dieser Daten ist wichtig zu behalten, daß nur sechs Zellen aus zwei Herzen in die Untersuchung gingen, so daß diese Ergebnisse vorläufigen Charakter haben. An Kaninchenmyozyten, die mit Ad β Gal infiziert worden waren, fanden Meyer et al. (1999) gegenüber nichtinfizierten Vergleichsmyozyten keine Unterschiede im kontraktilen Verhalten. Lehnart et al. (2000) konnten in Kaninchen trabekeln, die entweder mit AdLacZ oder adenoviral ohne Reportergen infiziert worden waren, nach 48 Stunden, die diese schlagend kultiviert worden waren, ebenfalls keine Unterschiede in allen gemessenen Kontraktilitätsparametern feststellen. Auch Williams et al. (2004) konnten in Zellen aus fünf Humanherzen nach 24 Stunden Inkubation mit AdGFP keinen Unterschied in der Verkürzungsfraction nachweisen.

Insofern bleibt abzuwarten, ob eine größere Versuchszahl den Unterschied der Verkürzungsfraction in LacZ-infizierten gegenüber nicht infizierten Myozyten nivellieren kann.

V.3.2 Verkürzungs-Frequenz-Beziehung

Die Steigerung der myokardialen Kontraktionskraft mit zunehmender Herzfrequenz - nach dem Erstbeschreiber Bowditch-Effekt genannt - ist für die Regulation der Myokard- und Kreislauffunktion ein wichtiger physiologischer Mechanismus. Katecholaminunabhängig kann so das Herzminutenvolumen bei Belastung gesteigert werden. Bei herzinsuffizienten Patienten ist dieser Mechanismus aufgehoben oder sogar invers. Feldmann et al. (1988) und Hasenfuss et al. (1994a) konnten diesen Effekt in vivo zeigen, und zahlreiche Untersuchungen wiesen ihn in vitro nach, z.B. Feldmann et al. (1988), Pieske et al. (1992) und Hasenfuss et al. (1994c) an isolierten Muskelstreifenpräparaten und Davies CH et al. (1995) an isolierten Muskelzellen aus menschlichen Herzen.

An den Myozyten dieser Arbeit zeigte sich, daß eine Erhöhung der Stimulationsfrequenz von 0,25 Hz auf 2,5 Hz zu einer hochsignifikanten Abnahme der relativen Verkürzung auf 46 ± 5 % des Ausgangswertes führte. Obwohl die absoluten Verkürzungs- und Relaxationszeiten abnahmen, sanken die maximalen Verkürzungs- und Relaxationsgeschwindigkeiten.

Davies CH et al. (1995) fanden in insuffizienten Humanmyozyten bei 37° C und „maximal stimulierendem Ca^{2+} “ einen Abfall der prozentualen Verkürzung von $4,4 \pm 0,4$ % bei 0,2 Hz auf $3,9 \pm 0,4$ % bei 1,42 Hz; Brixius et al. (2001) stellten bei 32° C und 2,0 mmol/l Ca^{2+} einen Abfall der relativen Verkürzung auf $62,2 \pm 11,5$ % bei einer Erhöhung der Frequenz von 0,5 Hz auf 2 Hz fest. Trotz nicht ganz vergleichbarer Versuchsbedingungen zeigten alle Experimente dieselbe Tendenz.

Für humane Myozyten in Zellkultur existieren bislang keine Veröffentlichungen, die die Verkürzungs-Frequenz-Beziehung über die Zeit quantifizieren. Janssen et al. (1999) kultivierten adulte insuffiziente Humantrabekel über 2-6 Tage und konnten während der ersten 5 Tage keine signifikanten Veränderungen in deren Kraft-Frequenz-Beziehung feststellen. Die Trabekel wurden allerdings die ganze Zeit über mit 0,5 Hz elektrisch stimuliert.

Auch in der vorliegenden Studie zeigten sich in der frequenzabhängigen Abnahme der Verkürzungsfraction keine Unterschiede, wenn man die Verkürzung auf den Ausgangswert normalisierte und somit die festgestellte generelle Funktionseinbuße der nicht stimulierten Zellen durch die Kultur eliminierte. TPS und $RT_{50\%}$ verliefen bei den kultivierten Zellen parallel verschoben zu denen der frisch isolierten Zellen, d.h., die kultivierten Zellen benötigten von Beginn an mehr Zeit für Kontraktion und Relaxation, reagierten aber im Verlauf grundsätzlich gleich. Diese parallelverschobenen Verläufe beobachteten auch Berger et al. (1994) bei Rattenmyozyten im Vergleich zwischen elektrisch dauerstimulierten und nicht stimulierten Zellkulturen.

V.3.3 Isoprenalinwirkung an humanen Myozyten

Isoprenalin wirkt am Myozyten über eine Stimulation der β -Adrenozeptoren und vermittelt v.a. über eine Erhöhung des intrazellulären cAMP positiv inotrope und lusitrope Wirkung (siehe auch Kap I.3.4). Diese geht mit einer überproportionalen Erhöhung des Ca^{2+} -Transienten (Pieske et al., 1997) und einem entsprechend erhöhten Energieverbrauch einher (Hasenfuss et al., 1994b). Der positiv inotrope Effekt ist bei Herzinsuffizienz vermindert (Pieske et al., 1997; Böhm et al., 1992).

Die untersuchten Myozyten zeigten ein inotropes Ansprechen auf β -Rezeptoren-Stimulation. Dabei nahm die Verkürzungsfraction bei frisch isolierten Zellen bei einer Isoprenalinkonzentration von 10^{-6} mol/l um maximal 105% des Ausgangswertes zu und die Verkürzungs- und die Relaxationsgeschwindigkeit stiegen signifikant an.

In einer Untersuchung von Harding et al. (1991), in der die Reaktionen von Myozyten und Muskelstreifen auf Isoprenalin untersucht wurden, wird die Verkürzungszunahme der Myozyten auf „maximal aktivierendes Isoprenalin“ mit 263% angegeben. Absolut ausgedrückt erreichten die Zellen allerdings nur eine Verkürzungsfraction von $7,04 \pm 1,06$ % (in dieser Studie: $7,7 \pm 1,1$ %); der Ausgangswert war bei Harding et al. mit $2,88 \pm 0,42$ % wesentlich niedriger als in dieser Untersuchung ($4,7 \pm 0,3$ %). Außerdem unterschieden sich die Meßbedingungen: es wurde bei 32°C und 0,2 Hz gemessen (hier: 37°C , 0,5 Hz). Die bei

Harding et al. gleichzeitig bei 0,5 Hz gemessenen Muskelstreifen zeigten nur eine Zunahme um 78 % ihrer Ausgangskraft.

Die $RT_{50\%}$ der Myozyten sank bei Harding et al. signifikant. In der vorliegenden Studie konnte eine signifikante Zunahme der Verkürzungs- und Relaxationsgeschwindigkeit verzeichnet werden.

Die Zellkultur beeinflusste die maximal inotrope Antwort auf Isoprenalin nicht. Allerdings wurde die Wirksamkeit des Katecholamins größer: die $EC_{50\%}$ stieg im Vergleich zwischen frisch isolierten Zellen und denen nach 48 Stunden in Zellkultur um das 4,5-Fache an. Pollack et al. (1991) konnten an Katzenmyozyten nach 5 Tagen in Zellkultur ebenfalls eine erhöhte Empfindlichkeit auf Noradrenalin feststellen, und Mitcheson et al. (1997) beschrieben an Kaninchenmyozyten einen Anstieg im L-Typ- Ca^{2+} -Kanal-Strom auf Isoprenalinstimulation hin, allerdings nur nach 24 Stunden und nicht nach 4 Tagen.

Möglicherweise hängt die größere Sensibilität für Katecholamine in den hier untersuchten Myozyten mit einer Erholung von den ständig erhöhten Katecholaminspiegeln und somit einer verbesserten Ansprechbarkeit der β -Adrenozeptoren der herzinsuffizienten Patienten zusammen.

Janssen et al. (1999) fanden nach 48 Stunden an schlagenden humanen Trabekeln keine Änderung der Isoprenalinantwort, so daß eine Erholung der β -Rezeptoren wahrscheinlich nicht das einzige Erklärungsmodell bleiben kann.

V.3.4 Calciumwirkung an humanen Myozyten

Calcium ist die gemeinsame Endstrecke wesentlicher physiologischer Regulationsmechanismen der myokardialen Kontraktilität. Maßgeblich ist dabei das während der Systole freiwerdende Ca^{2+} , das durch die Bindung an das Troponin C zu einer Aktivierung der kontraktilen Proteine führt. Während die Wirkung des Isoprenalins von der Anzahl und Funktion der β -Rezeptoren abhängt, wirkt Ca^{2+} direkt. Durch eine Aufladung des SR mit Ca^{2+} kann der maximal erreichbare positiv inotrope Effekt erzielt werden („kontraktile Reserve“).

Die frisch isolierten Myozyten dieser Untersuchung zeigten bei einer Erhöhung des extrazellulären Ca^{2+} von 1,5 auf 9 mmol/l eine Steigerung ihrer Verkürzung um 141 ± 54 % relativ zum Ausgangswert. Das ist wiederum geringer als in der oben erwähnten Untersuchung von Harding et al. (1991), in der von 1,3 mmol/l auf „maximal aktivierendes Ca^{2+} “ eine Zunahme um etwa 200 % im Vergleich zum Ausgangswert dokumentiert wurde. Die Versuchstemperatur lag dort bei 32°C , die Frequenz bei 0,2 Hz. Auch Davies CH et al. (1995) erwähnen eine stärkere Zunahme auf „maximal stimulierendes Ca^{2+} “ bei 32°C als bei 37°C , ohne dies jedoch näher zu quantifizieren. Daß hier eine Sensitivierung der Myofilamente durch Hypothermie (Weisser et al., 2001) eine Rolle spielte, ist nicht auszuschließen.

Beuckelmann et al. (1992) wiesen in insuffizienten Myozyten ein höheres diastolisches Ca^{2+} nach als in nicht-insuffizienten. Bei einer Erhöhung des extrazellulären Ca^{2+} kann dieses ohnehin erhöhte diastolische Ca^{2+} zu einer diastolischen Dysfunktion führen bis hin zur Zellkontraktur. Diese und auftretende Spontankontraktionen zwangen hier in einigen Experimenten oberhalb von 4 mmol/l Ca^{2+} zum Versuchsabbruch. Kaum eine Zelle tolerierte mehr als 9 mmol/l extrazelluläres Ca^{2+} . Möglicherweise wäre bei einem besser erhaltenen Ca^{2+} -Stoffwechsel der Zelle die maximal zu erzielende inotrope Wirkung an den Myofilamenten noch größer gewesen.

Durch die Zellkultur ergab sich eine verbesserte kontraktile Antwort auf ansteigendes extrazelluläres Ca^{2+} . Allerdings wurde die Ca^{2+} -Toleranz der 48 h kultivierten Zellen geringer: keine tolerierte mehr als 7,2 mmol/l Ca^{2+} im Außenmedium, ohne in Kontraktur zu gehen.

VI. Zusammenfassung

Adenoviral vermittelter Gentransfer ist heutzutage eine verbreitete Methode, um die Auswirkungen veränderter Proteinexpression auf Zellfunktionen zu erforschen. Wenig ist allerdings darüber bekannt, ob und inwieweit alleine die Bedingungen der dazu nötigen Zellkultur und der viralen Infektion als solcher die Funktion des insuffizienten Humanmyokards modifizieren.

In der vorliegenden Arbeit wurde daher das Verhalten isolierter, terminal insuffizienter humaner Kardiomyozyten direkt nach Isolation und unter Zellkulturbedingungen nach 24 und 48 Stunden sowie nach adenoviral vermitteltem Gentransfer von β -Galaktosidase (β -Gal) untersucht. Das Kontraktionsverhalten wurde unter Basalbedingungen (37° C, 0,5 Hz) und unter ansteigenden Stimulationsraten sowie unter inotroper Stimulation mit dem β -Adrenozeptoragonisten Isoprenalin als auch unter erhöhten extrazellulären Ca^{2+} -Spiegeln getestet.

Mittels enzymatischer Digestion via Koronarperfusion konnten funktionstüchtige Zellen gewonnen werden, die bei physiologischen Temperaturen und physiologischen Ca^{2+} -Konzentrationen unter elektrischer Stimulation stabil isotonisch kontrahierten.

Nach einem bzw. zwei Tagen in primärer Zellkultur benötigten die Zellen mehr Zeit für Kontraktion und Relaxation, und die Amplitude der basalen Kontraktion verringerte sich geringfügig, wie es aus Tierversuchen mit nicht stimulierten, kultivierten Kardiomyozyten vorbekannt ist. Die Isoprenalin-Konzentrations-Wirkungs-Kurve war durch die Zellkultur linksverschoben. Das war bei Tiermyozyten, nicht aber bei humanen Muskelstreifen vorbeschrieben. In der Reaktion auf höhere Frequenzen und erhöhtes extrazelluläres Ca^{2+} zeigte sich keine grundsätzliche Änderung der kultivierten gegenüber den frisch isolierten Zellen.

Der Adenovirus-vermittelte Gentransfer resultierte in einer histochemisch nachweisbaren β -Gal-Expression. Die basale Kontraktionsamplitude lag jedoch deutlich unter der der nicht-infizierten Zellen, während sich die übrigen Parameter nicht signifikant unterschieden.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß funktionstüchtige humane Kardiomyozyten aus insuffizientem Myokard sowohl für direkt durchzuführende Experimente als auch für solche, die Zellkultur benötigen, gewonnen werden können. Die Bedeutung von Zellkultur, viraler Infektion und veränderter Proteinexpression als Einflußfaktoren auf das kontraktile Verhalten darf jedoch nicht außer Acht gelassen werden.

VII. Anhang: Patientendaten

Tabelle VII.1:

Daten der Patienten, deren Herzen in die vorliegenden Untersuchungen eingingen

Alter	Geschl.	Ätiol.	PCW	LVEDP	EF	HZV	CI	Medikation
63	m	ICM	0	90	26			ACE, DIG, DIU, AAR,KOA
38	m	DCM	20	13	18	6,6		βBL, ACE, DIG, DIU, KOA
57	m	DCM	12	63	30		3,2	ACE, DIG, CAL, DIU
57	m	ICM	3	24	24	3,4		
68	m	ICM	28		35	3,4	1,7	βBL,ACE,DIG,DIU,KOA
30	m	DCM		11		4	1,5	DIG,DIU,PDE,KOA
66	w	DCM	23		26		2,9	βBL,ACE,DIG,DIU,VASDIL,KOA
59	m	ICM	24		24		3	AT1,CAL,VASDIL,
59	m	ICM	18		41*		3,4	DIU,KOA,
64	m	DCM						βBL,ACE,DIU,KAT,PDE,AAR,KOA
45	m	ICM						βBL,CAL,DIU,KAT,PDE
65	m	ICM	30		35	3,6	1,4	βBL,DIG,DIU,KOA
66	m	ICM	20		29		3	AT1,DIG,DIU,VASDIL,KOA
65	m	ICM	20		27		2,2	βBL,ACE,DIU,KAT,PDE,AAR,KOA
55	m	ICM	33	29	21	4,8		ACE,DIG,VASDIL,KAT, PDE,AAR,KOA
49	m	DCM	10			3,3	1,8	βBL,ACE,DIG,AAR,KOA
53	m	DCM			15			βBLACE,DIG,DIU,KOA
46	w	DCM			21	3,1	1,7	βBLACE,DIG,DIU
50	m	DCM						DIU,KOA,
59	m	DCM	19				1,7	βBL,ACE,KOA,
49	m	ICM	10			6,5	4,6	DIG,CAL,DIU,KOA
62	w	DCM	8		15	3,3	2	ACE,DIG,DIU,KOA
42	m	DCM	28				2,2	ACE,DIG,DIU,KOA
66	m	DCM	12		30	3,4	1,9	n.bek.

VII. Anhang

41	w	DCM	8	8	25		3,5	βBL,ACE,DIG,DIU
Alter	Geschl.	Ätiol.	PCW	LVEDP	EF	HZV	CI	Medikation
52	w	DCM	18	6	10	3,7	2,2	βBL,ACE,DIU,KOA
56	w	DCM	30		25		2,2	AT1,DIG,DIU,KOA
66	m	ICM	28		36		1,9	AT1,DIG,CAL,DIU,VASDIL, AAR
63	m	ICM	21		28		1,5	AT1,DIG,DIU
69	m	DCM	27		27		2,1	AT1,DIG,VASDIL,KOA
66	m	DCM	21		18		2,2	ACE,DIG,DIU,KAT,PDE, AAR,KOA
68	m	DCM	14		30		1,9	βBL,ACE,DIG,DIU,AAR, KOA
55	w	DCM	18				3,5	βBL,ACE,DIG,DIU
39	w	HNOCM	30		47		2	DIG, DIU, ACE, KAT
50	m	DCM	10	10	23		2,1	n.bek.
61	m	DCM	30	30	39	4,3	2,5	ACE, AT1,DIG,DIU, AAR,KOA
57	m	ICM	13	16	19	4	2,1	ACE,DIU
	m	DCM			24			n.bek.
56,1			18,9	27,3	26	4,1	2,3	MITTELWERT
9,7			8,6	25,1	7,8	1,1	0,7	Standardabweichung

Abkürzungen:

Parameter: PCW: Pulmonalkapillärer Wedge-Druck (mm Hg); LVEDP: Linksventrikulärer enddiastolischer Druck (mm Hg); EF: Ejektionsfraktion (%); HZV: Herzzeitvolumen (l/min); CI: Cardiac index

Ätiologie: DCM: dilatative Kardiomyopathie; ICM: ischämische Kardiomyopathie; HNOCM: hypertrophe nicht-obstruktive Kardiomyopathie.

Medikation: βBL: β-Adrenozeptorantagonisten; ACE: Angiotensin-Converting-Enzym-Inhibitoren; AT1: Angiotensin-II- Rezeptor-Antagonisten; DIG: Digitalisglykoside; DIU: Diuretika; CAL: Calciumantagonisten; AAR: Antiarrhythmika (außer β-BL und CAL); PDE: Phosphodiesterasehemmer; VASDIL: Vasodilanzien; KOA: Antikoagulanzen; KAT: Katecholamine; n. bek: nicht bekannt

VIII. Literaturverzeichnis

Akhter SA, Skaer CA, Kypson AP, McDonald PH, Peppel KC, Glower DD, Lefkowitz RJ, Koch WJ (1997): Restoration of beta-adrenergic signaling in failing cardiac ventricular myocytes via adenoviral-mediated gene transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(22), 12100-5

Baudet S, Weisser J, Janssen AP, Beulich K, Bieleck U, Pieske B, Noireand J, Janssen PML, Hasenfuss G, Prestle J (2001): Increased Basal contractility of cardiomyocytes overexpressing protein kinase C ϵ and blunted inotropic response to endothelin-1. *Cardiovasc Res* 50(3), 486-494

B  nardeau A, Hatem SN, R  cker-Martin C, Tessier S, Dinanian S, Samuel J-L, Coraboeuf E, Mercadier J-J (1997): Primary culture of human atrial myocytes is associated with the appearance of structural and functional characteristics of immature myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 29, 1307-1320

Berger HJ, Prasad SK, Davidoff AJ, Pimental D, Ellingsen O, Marsh JD, Smith TW, Kelly RA (1994): Continual electric field stimulation preserves contractile function of adult ventricular myocytes in primary culture. *Am J Physiol* 266(1 Pt 2), H341-9

Bers DM (2002): Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature* 415, 198-205

Beuckelmann DJ, N  bauer M, Erdmann E (1992): Intracellular calcium handling in isolated ventricular myocytes from patients with terminal heart failure. *Circulation* 85(3), 1046-55

Blinks JR, Endoh M (1986): Modification of myofibrillar responsiveness to Ca^{++} as an inotropic mechanism. *Circulation* 73(3 Pt 2), III85-98

Böhm M, La Rosee K, Schmidt U, Schulz C, Schwinger RH, Erdmann E (1992): Force-frequency relationship and inotropic stimulation in the nonfailing and failing human myocardium: implications for the medical treatment of heart failure. *Clin Invest* 70(5), 421-5

Böhm M, Reiger B, Schwinger RH, Erdmann E (1994): cAMP concentrations, cAMP dependent protein kinase activity, and phospholamban in non-failing and failing myocardium. *Cardiovasc Res* 28(11), 1713-9

Borg TK, Terracio L: Attachment substrates for heart muscle cells. In: *Cell culture techniques for heart and vessel research*. Piper HM, editors. Springer-Verlag, Berlin 1990, 99-107

Bowditch, HP (1871): Über die Eigenthümlichkeiten der Reizbarkeit, welche die Muskelfasern des Herzens zeigen. *Ber Sachs Akad Wiss* 23, 652-689

Bristow MR (2000): β -adrenergic receptor blockade in chronic heart failure. *Circulation* 101, 558-569

Bristow MR, Ginsburg R, Minobe W, Cubicciotti RS, Sageman WS, Lurie K, Billingham ME, Harrison DC, Stinson EB (1982): Decreased catecholamine sensitivity and beta-adrenergic-receptor density in failing human hearts. *N Engl J Med* 307(4), 205-11

Brixius K, Hoischen S, Reuter H, Lasek K, Schwinger RHG (2001): Force/shortening-frequency relationship in multicellular muscle strips and single cardiomyocytes of human failing and nonfailing hearts. *J Card Fail* 4, 335-341

Buckley NM, Penefsky ZJ, Litwak RS (1972): Comparative force-frequency relationships in human and other mammalian ventricular myocardium. *Pflugers Arch* 332(4), 259-70.

Bustamante JO, Watanabe T, Murphy DA, McDonald TF (1982): Isolation of single atrial and ventricular cells from the human heart. *Can Med Assoc J* 126(7), 791-3

Cavanaugh MW (1955): Pulsation, migration and division in dissociated chick heart cells in vitro. *J Exp Zool* 128, 573-589

Chossat N, Griscelli F, Jourdon P, Logeart D, Ragot T, Heimbürger M, Perricaudet M, Lompre A, Hatem S, Mercadier J (2001): Adenoviral SERCA1a gene transfer to adult rat ventricular myocytes induces physiological changes in calcium handling. *Cardiovasc Res* 49(2), 288-97

Cohn JN (1989): The sympathetic nervous system in heart failure. *J Cardiovasc Pharmacol* 14 Suppl 5, 57-61

Davia K, Davies CH, Harding SE (1997): Effects of inhibition of sarcoplasmic reticulum calcium uptake on contraction in myocytes isolated from failing human ventricle. *Cardiovasc Res* 33(1), 88-97

Davies CH, Davia K, Bennett JG, Pepper JR, Poole-Wilson PA, Harding SE (1995): Reduced contraction and altered frequency response of isolated ventricular myocytes from patients with heart failure. *Circulation* 92(9), 2540-9

Davies M, Hobbs F, Davis R, Kenkre J, Roalfe AK, Hare R, Wosornu D, Lancashire RJ (2001): Prevalence of left-ventricular systolic dysfunction and heart failure in the Echocardiographic Heart of England Screening study: a population based study. *Lancet* 358(9280), 439-44

del Monte F, Harding SE, Schmidt U, Matsui T, Kang ZB, Dec GW, Gwathmey JK, Rosenzweig A, Hajjar RJ (1999): Restoration of contractile function in isolated cardiomyocytes from failing human hearts by gene transfer of SERCA2a. *Circulation* 100(23), 2308-11

del Monte F, Harding SE, Dec GW, Gwathmey JK, Hajjar RJ (2002): Targeting phospholamban by gene transfer in human heart failure. *Circulation* 105(8), 904-7

Dipla K, Mattiello JA, Margulies KB, Jeevanandam V, Houser SR (1999): The sarcoplasmic reticulum and the Na⁺/Ca²⁺ exchanger both contribute to the Ca²⁺ transient of failing human ventricular myocytes. *Circ Res* 84(4), 435-44

Donahue JK, Kikkawa K, Johns DC, Marban E, Lawrence JH (1997) : Ultrarapid, highly efficient viral gene transfer to the heart. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(9), 4664-8

Dowell JD, Rubart M, Pasumarthi KBS, Soonpaa MH, Field LJ (2003): Myocyte and myogenic stem cell transplantation in the heart. *Cardiovasc Res* 58, 336-350

Drazner MH, Peppel KC, Dyer S, Grant AO, Koch WJ, Lefkowitz RJ (1997): Potentiation of beta-adrenergic signaling by adenoviral-mediated gene transfer in adult rabbit ventricular myocytes. *J Clin Invest* 99(2), 288-96

Dzau VJ, Colucci WS, Hollenberg NK, Williams GH (1981): Relation of the renin-angiotensin-aldosterone system to clinical state in congestive heart failure. *Circulation* 63(3), 645-51

Ellingsen O, Davidoff AJ, Prasad SK, Berger H-J, Springhorn JP, Marsh JD, Kelly RA, Smith TW (1993): Adult rat ventricular myocytes cultured in defined medium: phenotype and electromechanical function. *Am J Physiol* 265, H747-754

Eriksson H (1995): Heart failure: a growing public health problem. *J Intern Med* 237(2), 135-41

Fabiato A (1983): Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. *Am J Physiol* 245(1), C1-14

Feldman MD, Alderman JD, Aroesty JM, Royal HD, Ferguson JJ, Owen RM, Grossman W, McKay RG (1988): Depression of systolic and diastolic myocardial reserve during atrial pacing tachycardia in patients with dilated cardiomyopathy. *J Clin Invest* 82, 1661-1669

Fischer M, Baessler a, Muscholl M, Bröckel U, Luchner A, Hense H-W, Döring A, Riegger G, Schunkert H (2003): Epidemiologie der linksventrikulären systolischen Dysfunktion in der Allgemeinbevölkerung Deutschlands. *Z Kardiol* 92, 294-302

Fleming JW, Wisler PL, Watanabe AM (1992): Signal transduction by G proteins in cardiac tissues. *Circulation* 85, 420-433

Flesch M, Schwinger RH, Schiffer F, Frank K, Sudkamp M, Kuhn-Regnier F, Arnold G, Böhm M (1996): Evidence for functional relevance of an enhanced expression of the Na(+)-Ca²⁺ exchanger in failing human myocardium. *Circulation* 94(5), 992-1002

Francis GS, Benedict C, Johnstone DE, Kirlin PC, Nicklas J, Liang CS, Kubo SH, Rudin-Toretsky E, Yusuf S (1990): Comparison of neuroendocrine activation in patients with left ventricular dysfunction with and without congestive heart failure. A substudy of the Studies of Left Ventricular Dysfunction (SOLVD). *Circulation* 82(5), 1724-9

Frank O (1895): Zur Dynamik des Herzmuskels. *J Biol* 32, 370-447

Gao G, Alvira MR, Somanathan S, Lu Y, Vandenberghe LH, Rux JJ, Calcedo R, Sanmiguel J, Abbas Z, Wilson JM (2003): Adeno-associated viruses undergo substantial evolution in primates during natural infections. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(10), 6081-6

Giordano FJ, He H, McDonough P, Meyer M, Sayen MR, Dillmann WH (1997): Adenovirus-mediated gene transfer reconstitutes depressed sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase levels and shortens prolonged cardiac myocyte Ca²⁺ transients. *Circulation* 96(2), 400-3

Graham FL, Prevec L: Manipulation of adenovirus vectors. In: *Methods in Molecular Biology*. Hrsg Murray EJ. Humana press, Clifton, NJ, USA 1991, 109-128

Greengard P (1978): Phosphorylated proteins as physiological effectors. *Science* 199, 146-152

Hajjar RJ, Kang JX, Gwathmey JK, Rosenzweig A (1997): Physiological effects of adenoviral gene transfer of sarcoplasmic reticulum calcium ATPase in isolated rat myocytes. *Circulation* 95(2), 423-9

Hajjar RJ, Schmidt U, Matsui T, Guerrero JL, Lee KH, Gwathmey JK, Dec GW, Semigran MJ, Rosenzweig A (1998): Modulation of ventricular function through gene transfer in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(9), 5251-6

Harding SE, Gurden JM, Poole-Wilson PA (1991): a comparison of contractile function between papillary muscles and isolated myocytes from the same human hearts. *Cardioscience* 2, 141-146

Harding SE, Jones SM, O'Gara P, del Monte F, Vescovo G, Poole-Wilson PA (1992): Isolated ventricular myocytes from failing and non-failing human heart; the relation of age and clinical status of patients to isoproterenol response. *J Mol Cell Cardiol* 24(5), 549-64

Harrison SA, Reifsnnyder DH, Gallis B, Cadd GG, Beavo JA (1986): Isolation and characterization of bovine cardiac muscle cGMP-inhibited phosphodiesterase: a receptor for new cardiotonic drugs. *Mol Pharmacol* 29(5), 506-14

Harrison SM, McCall E, Boyett MR (1992): The relationship between contraction and intracellular sodium in rat and guinea-pig ventricular myocytes. *J Physiol* 449, 517-50

Harsdorf von R, Schott RJ, Shen YT, Vatner SF, Mahdavi V, Nadal-Ginard B (1993): Gene injection into canine myocardium as a useful model for studying gene expression in the heart of large mammals. *Circ Res* 72(3), 688-95

Hasenfuss G (1998a): Alterations of calcium-regulatory proteins in heart failure. *Cardiovasc Res* 37(2), 279-89

Hasenfuss G (1998b): Animal models of human cardiovascular disease, heart failure and hypertrophy. *Cardiovasc Res* 39(1), 60-76

Hasenfuss G, Holubarsch C, Hermann HP, Astheimer K, Pieske B, Just H (1994a): Influence of the force-frequency relationship on haemodynamics and left ventricular function in patients with non-failing hearts and in patients with dilated cardiomyopathy. *Eur Heart J* 15(2), 164-70

Hasenfuss G, Mulieri LA, Leavitt BJ, Alpert NR (1994b): Influence of isoproterenol on contractile protein function, excitation-contraction coupling, and energy turnover of isolated nonfailing human myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 26(11), 1461-9

Hasenfuss G, Reinecke H, Studer R, Meyer M, Pieske B, Holtz J, Holubarsch C, Posival H, Just H, Drexler H (1994c): Relation between myocardial function and expression of sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase in failing and nonfailing human myocardium. *Circ Res* 75(3), 434-42

Hasenfuss G, Pieske B, Castell M, Kretschmann B, Maier LS, Just H (1998): Influence of the novel inotropic agent Levosimendan on isometric tension and calcium cycling in failing human myocardium. *Circulation* 98, 2141-2147

Hasenfuss G, Schillinger W, Lehnart SE, Preuss M, Pieske B, Maier LS, Prestle J, Minami K, Just H (1999): Relationship between Na⁺-Ca²⁺-exchanger protein levels and diastolic function of failing human myocardium. *Circulation* 99(5), 641-8

Ho KK, Pinsky JL, Kannel WB, Levy D (1993a): The epidemiology of heart failure: the Framingham Study. *J Am Coll Cardiol* 22(4 Suppl A), 6A-13A

Ho KK, Anderson KM, Kannel WB, Grossman W, Levy D (1993b): Survival after the onset of congestive heart failure in Framingham Heart Study subjects. *Circulation* 88(1), 107-15

Holubarsch C, Ruf T, Goldstein DJ, Ashton RC, Nickl W, Pieske B, Pioch K, Ludemann J, Wiesner S, Hasenfuss G (1996): Existence of the Frank-Starling mechanism in the failing human heart. Investigations on the organ, tissue, and sarcomere levels. *Circulation* 94(4), 683-689

Houser SR, Piacentino V 3rd, Weisser J (2000): Abnormalities of calcium cycling in the hypertrophied and failing heart. *J Mol Cell Cardiol* 32(9), 1595-607

Hunt SA, Abraham WT, Chin MH, Feldman AM, Francis GS, Ganiats TG, Jessup M, Konstam MA, Mancini DM, Michl K, et al. (2005): ACC/AHA 2005 Guideline Update for the Diagnosis and Management of Chronic Heart Failure in the Adult: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Update the 2001 Guidelines for the Evaluation and Management of Heart Failure): developed in collaboration with the American College of

Chest Physicians and the International Society for Heart and Lung Transplantation: endorsed by the Heart Rhythm Society. *Circulation* 112(12), e154-235

Ikeda U, Briggs GM, Allen PD, Sen L, Medford RM, Smith TW (1990): Properties of adult rat ventricular cells in long-term culture. *Cardioscience* 1(3), 225-33

Jacobson SL (1977): Culture of spontaneously contracting myocardial cells from adult rats. *Cell Struct Funct* 2, 1-9

Jacobson SL, Piper HM (1986): Cell cultures of adult cardiomyocytes as models of the myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 18(7), 661-78

Janssen PM, Lehnart SE, Prestle J, Hasenfuss G (1999): Preservation of contractile characteristics of human myocardium in multi-day cell culture. *J Mol Cell Cardiol* 31(8), 1419-27

Jougasaki M, Wei C-M, McKinley L, Burnett JC (1995): Elevation of circulating and ventricular adrenomedullin in human congestive heart failure. *Circulation* 92, 286-289

Kentish JC, McCloskey DT, Layland J, Palmer S, Leiden JM, Martin AF, Solaro RJ (2001): Phosphorylation of troponin I by protein kinase A accelerates relaxation and crossbridge cycle kinetics in mouse ventricular muscle. *Circ Res* 88, 1059-1065

Kubo H, Margulies KB, Piacentino V 3rd, Gaughan JP, Houser SR (2001): Patients with end-stage congestive heart failure treated with beta-adrenergic receptor antagonists have improved ventricular myocyte calcium regulatory protein abundance. *Circulation* 104(9), 1012-8

Lamont C, Miller DJ (1992): Calcium sensitizing action of carnosine and other endogenous imidazoles in chemically skinned striated muscle. *J Physiol* 454, 421-34

Laugwitz KL, Ungerer M, Schoneberg T, Weig HJ, Kronsbein K, Moretti A, Hoffmann K, Seyfarth M, Schultz G, Schomig A (1999): Adenoviral gene transfer of the human V2 vasopressin receptor improves contractile force of rat cardiomyocytes. *Circulation* 99(7), 925-33

Lehnart SE, Janssen PM, Franz WM, Donahue JK, Lawrence JH, Marban E, Prestle J, Hasenfuss G (2000): Preservation of myocardial function after adenoviral gene transfer in isolated myocardium. *Am J Physiol* 279(3), H986-91

Levine B, Kalman J, Mayer L, Fillit HM, Packer M (1990): Elevated circulating levels of tumor necrosis factor in severe chronic heart failure. *N Engl J Med* 323(4) 236-41

Levitcki A (1988): From epinephrine to cyclic AMP. *Science* 241, 800-806

Li L, Desantiago J, Chu G, Kranias EG, Bers DM (2000): Phosphorylation of phospholamban and troponin I in β -adrenergic-induced acceleration of cardiac relaxation. *Am J Physiol* 278, H769-779

Lloyd-Jones DM, Larson MG, Leip EP, Beiser A, D'Agostino RB, Kannel WB, Murabito JM, Vasan RS, Benjamin EJ, Levy D (2002) Lifetime risk for developing congestive heart failure: the Framingham Heart Study. *Circulation* 106 (24), 3068-72

MacIntyre K, Capewell S, Stewart S, Chalmers JWT, Boyd J, Finlayson A, Redpath A, Pell JP, McMurray JJV (2000): Evidence of improving prognosis in heart failure. *Circulation* 102, 1126-1131

Mattiello JA, Margulies KB, Jeevanandam V, Houser SR (1998): Contributions of reverse-mode sodium-calcium exchange to contractions in failing human left ventricular myocytes. *Cardiovasc Res* 37:424-431

Maurice JP, Hata JA, Shah AS, White DC, McDonald PH, Dolber PC, Wilson KH, Lefkowitz RJ, Glower DD, Koch WJ (1999): Enhancement of cardiac function after adenoviral-mediated in vivo intracoronary beta2-adrenergic receptor gene delivery. *J Clin Invest* 104(1), 21-9

Meyer M, Bluhm WF, He H, Post SR, Giordano FJ, Lew WY, Dillmann WH (1999): Phospholamban-to-SERCA2 ratio controls the force-frequency relationship. *Am J Physiol* 276(3 Pt 2), H779-85

Mitcheson JS, Hancox JC, Levi AJ (1997): Cultured adult rabbit myocytes: effect of adding supplements to the medium, and response to isoprenaline. *J Cardiovasc Electrophysiol* 8(9), 1020-30

Mitcheson JS, Hancox JC, Levi AJ (1998): Cultured adult cardiac myocytes: future applications, culture methods, morphological and electrophysiological properties. *Cardiovasc Res* 39(2), 280-300

Morgan JP, Morgan, KG (1984): Calcium and cardiovascular function. Intracellular calcium levels during contraction and relaxation of mammalian cardiac and vascular smooth muscle as detected with aequorin. *Am J Med* 77(5A), 33-46

Mosterd A, Hoes AW, de Bruyne MC, Deckers JW, Linker DT, Hofman A, Grobbee DE (1999): Prevalence of heart failure and left ventricular dysfunction in the general population; The Rotterdam Study. *Eur Heart J* 20(6), 447-55

Mulieri LA, Hasenfuss G, Ittleman F, Blanchard EM, Alpert NR (1989): Protection of human left ventricular myocardium from cutting injury with 2,3-butanedione monoxime. *Circ Res* 65(5), 1441-9

Mulieri LA, Hasenfuss G, Leavitt B, Allen PD, Alpert NR (1992): Altered myocardial force-frequency relation in human heart failure. *Circulation* 85(5), 1743-50

Narula J, Haider N, Virmani R, DiSalvo TG, Kolodgie FD, Hajjar RJ, Schmidt U, Semigran MJ, Dec GW, Khaw BA (1996): Apoptosis in myocytes in end-stage heart failure. *N Engl J Med* 335(16), 1182-9

Owen VJ, Burton PB, Michel MC, Zolk O, Böhm M, Pepper JR, Barton PJ, Yacoub MH, Harding SE (1999): Myocardial dysfunction in donor hearts. A possible etiology. *Circulation*. 99(19), 2565-70

Packer M (1988): Neurohormonal interactions and adaptations in congestive heart failure. *Circulation* 77(4), 721-30

Passier R, Mummery C (2003): Origin and use of embryonic and adult stem cells in differentiation and tissue repair. *Cardiovasc Res* 58, 324-335

Peeters GA, Sanguinetti MC, Eki Y, Konarzewska H, Renlund DG, Karwande SV, Barry WH (1995): Method for isolation of human ventricular myocytes from single endocardial and epicardial biopsies. *Am J Physiol* 268(4 Pt 2), H1757-64

Piacentino V 3rd, Weber CR, Chen X, Weisser-Thomas J, Margulies KB, Bers DM, Houser SR (2003): Cellular basis of abnormal calcium transients of failing human ventricular myocytes. *Circ Res* 92(6), 651-8

Pieske B (1998): Neue Aspekte zur Pathophysiologie der Herzinsuffizienz. *Wien Med Wochenschr* 148(5), 108-20

Pieske B, Hasenfuss G, Holubarsch C, Schwinger RHG, Böhm M, Just H (1992): Alterations of the force-frequency relationship in the failing human heart depend on the underlying cardiac disease. *Basic Res Cardiol* 87(suppl 1), 213-221

Pieske B, Kretschmann B, Meyer M, Holubarsch C, Weirich J, Posival H, Minami K, Just H, Hasenfuss G (1995): Alterations in intracellular calcium handling associated with the inverse force-frequency relation in human dilated cardiomyopathy. *Circulation* 92(5), 1169-78

Pieske B, Schlotthauer K, Schattmann J, Beyersdorf F, Martin J, Just H, Hasenfuss G (1997): Ca²⁺-dependent and Ca²⁺-independent regulation of contractility in isolated human myocardium. *Basic Res Cardiol* 92 Suppl 1, 75-86

Piot C, Lemaire S, Albat B, Seguin J, Nargeot J, Richard S (1996): High frequency-induced upregulation of human cardiac calcium currents. *Circulation* 93(1), 120-8

Piper HM, Volz A, Schwartz P: Adult ventricular heart muscle cells. In: Cell culture techniques in heart and vessel research. Piper HM editors. Springer Verlag, Berlin 1990, 36-60

Pollack PS, Carson NL, Nuss HB, Marino TA, Houser SR (1991): Mechanical properties of adult feline ventricular myocytes in culture. *Am J Physiol* 260(1 Pt 2), H234-41

Port JD, Bristow MR (2001): Altered beta-adrenergic receptor gene regulation and signaling in chronic heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 33(5), 887-905

Powell T, Sturridge MF, Suvarna SK, Terrar DA, Twist VW (1981): Intact individual heart cells isolated from human ventricular tissue. *Br Med J (Clin Res Ed)* 283(6298), 1013-5

Robishaw JD, Foster KA (1989): Role of G proteins in the regulation of the cardiovascular system. *Annu Rev Physiol* 51, 229-244

Rosamond W, Flegal K, Friday G, Furie K, Go A, Greenlund K, Haase N, Ho M, Howard V, Kissela B, et al.(2007): Heart Disease and Stroke Statistics--2007 Update. A Report From the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation* 113(6), e69-171

Sackner-Bernstein JD, Mancini DM (1995): Rationale for treatment of patients with chronic heart failure with adrenergic blockade. *JAMA* 274(18), 1462-7

Schillinger W, Janssen PM, Emami S, Henderson SA, Ross RS, Teucher N, Zeitz O, Philipson KD, Prestle J, Hasenfuss G (2000): Impaired contractile performance of cultured rabbit ventricular myocytes after adenoviral gene transfer of Na(+)-Ca(2+) exchanger. *Circ Res* 87(7), 581-7

Schwinger RH, Böhm M, Koch A, Morano I, Ruegg JC, Erdmann E (1994a): Inotropic effect of the cardioprotective agent 2,3-butanedione monoxime in failing and nonfailing human myocardium. *J Pharmacol Exp Ther* 269(2), 778-86

Schwinger RH, Böhm M, Koch A, Schmidt U, Morano I, Eissner HJ, Uberfuhr P, Reichart B, Erdmann E (1994b): The failing human heart is unable to use the Frank-Starling mechanism. *Circ Res* 74(5), 959-69

Silver LH, Hemwall EL, Marino TA, Houser SR (1983): Isolation and morphology of calcium-tolerant feline ventricular myocytes. *Am J Physiol* 245(5 Pt 1), H891-6

Starling EH: Linacre lecture on the law of the heart. :Longmanns, London/ England 1918

Svensson EC, Marshall DJ, Woodard K, Lin H, Jiang F, Chu L, Leiden JM (1999): Efficient and stable transduction of cardiomyocytes after intramyocardial injection or intracoronary perfusion with recombinant adeno-associated virus vectors. *Circulation* 99, 201-205

Vahl CF, Timek T, Bonz A, Kochsiek N, Fuchs H, Schaffer L, Rosenberg M, Dillmann R, Hagl S (1997): Myocardial length-force relationship in end stage dilated cardiomyopathy and

normal human myocardium: analysis of intact and skinned left ventricular trabeculae obtained during 11 heart transplantations. *Basic Res Cardiol* 92(4), 261-70

Volz A, Piper HM, Siegmund B, Schwartz P (1991): Longevity of adult ventricular rat heart muscle cells in serum-free primary culture. *J Mol Cell Cardiol* 23(2), 161-73

Wei C-M, Lerman A, Rodeheffer RJ, McGregor CGA, Brandt RR, Wright S, Heublein DM, Kao PC, Edwards WD, Burnett JC (1994): Endothelin in human congestive heart failure. *Circulation* 89, 1580-1586

Weisser J, Martin J, Bisping E, Maier LS, Beyersdorf F, Hasenfuss G, Pieske B (2001): Influence of mild hypothermia on myocardial contractility and circulatory function. *Basic Res Cardiol* 96(2), 198-205

Weisser-Thomas J, Piacentino V 3rd, Gaughan JP, Margulies K, Houser SR (2003): Calcium entry via Na/Ca exchange during the action potential directly contributes to contraction of failing human ventricular myocytes. *Cardiovasc Res* 57(4), 974-85

Williams ML, Hata JA, Schroder J, Rampersaud E, Petrofski J, Jakoi A, Milano CA, Koch WJ (2004): Targeted beta-adrenergic receptor kinase (betaARK1) inhibition by gene transfer in failing human hearts. *Circulation* 109(13), 1590-93

Yatani A, Brown AM (1989) : Rapid β -adrenergic modulation of cardiac calcium channel currents by a fast G protein pathway. *Science* 245, 71-74

Danksagung

Meinem Doktorvater Prof. Dr. med. B. Pieske danke ich für die Überlassung des Themas und seine nicht endenwollende Energie, mit der er uns Studenten für das experimentelle Arbeiten begeisterte.

Mein Dank gilt auch meiner Betreuerin, Frau Dr. med. J. Weisser-Thomas, für die Anleitung im Labor, für die sorgfältigen Korrekturen, aber auch für ihre klinische Arbeit, mir der sie mir ein Vorbild ist, und für die freundschaftliche Zusammenarbeit.

Weiterhin bin ich zu Dank verpflichtet Prof. Dr. med. G. Hasenfuß und Mitarbeitern, mit dessen Arbeitsgruppe eine enge Kooperation bestand. Hier sind besonders hervorzuheben Dr. J. Prestle, der die verwendeten Viren freundlich zur Verfügung stellte, Prof. P.M.L. Janssen, der die Computerprogramme zur Messung und Auswertung der Myozytenkontraktion schrieb, und Dr. P. van Nguyen, der in technischen und methodischen Schwierigkeiten stets einen Rat wusste.

Herrn Prof. Dr. S. Houser danke ich für wegweisende Ratschläge zur Methodik der Myozytenisolation.

Zudem danke ich der Abteilung für medizinische Statistik in Göttingen (Leitung Prof. Brunner), insbesondere Herrn S. Domhoff für die geduldige Beratung bei der statistischen Auswertung.

Meinen studentischen Kollegen danke ich für Kollegialität und Freundschaft.

Das evangelische Studienwerk Villigst e.V. unterstützte mich mit einem Stipendium, wofür ich herzlich dankbar bin.

Meine Eltern unterstützten mich in jeder Weise, wovon hier nur die finanzielle Hilfe und die Rechtschreibkorrekturen erwähnt werden dürfen. Ich danke Euch von Herzen.

Mein Freund Olaf Seehase brachte mir die Grundzüge der Computerbedienung bei. Ich danke ihm für Liebe, Geduld und Humor.