

Aus der Medizinischen Klinik, Kardiologie, Angiologie, Pneumologie
der Medizinischen Fakultät der Charité - Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Die Wirkung von Adrenomedullin auf die Kontraktilität des Rattenherzens

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité -
Universitätsmedizin Berlin

von

Philipp Boyé
aus Gräfelfing

Dekan: Prof. Dr. med Martin Paul

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. V. Stangl

2. Prof. Dr. med. J.D. Schipke

3. Prof. Dr. med. B. Pieske

Datum der Promotion: 21.11.2005

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	6
1.1	Adrenomedullin	6
1.2	Molekulare Struktur und Vorkommen	6
1.3	Synthese und Sekretion	8
1.4	Rezeptoren und Wirkmechanismen	10
1.5	Biologische Wirkungen	14
1.6	Kardiale Wirkungen	16
1.7	Fragestellung	17
2	Material und Methoden	18
2.1	Chemikalien, Lösungen, Puffer	18
2.2	Versuchstiere	18
2.3	Einzelzellmessung an adulten Kardiomyozyten	19
2.3.1	Isolierung adulter Kardiomyozyten	19
2.3.2	Anheften und Färbung	23
2.3.3	Das konfokale Laserscan Mikroskop (CLSM)	23
2.3.4	Versuchsablauf	25
2.3.5	Auswertung der Meßdaten	25
2.4	Das isoliert perfundierte Herz nach Langendorff	27
2.4.1	Präparation und Versuchsaufbau	27
2.4.2	Versuchsablauf	28
2.5	Papillarmuskel	29
2.5.1	Eigenschaften des Papillarmuskels	29
2.5.2	Präparation und Versuchsaufbau	30
2.5.3	Versuchsablauf	31
2.6	Statistische Auswertung	32

3	Ergebnisse.....	33
3.1	Stimulierte adulte Kardiomyozyten.....	33
3.1.1	Die Wirkung von ADM auf die Zellverkürzung	33
3.1.2	Die Wirkung von ADM auf den Kalziumtransienten.....	35
3.2	Isoliert perfundiertes Herz nach Langendorff.....	37
3.3	Papillarmuskel	40
4	Diskussion.....	43
4.1	Beurteilung der eigenen Ergebnisse.....	43
4.2	Vergleich mit den Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen	47
4.3	Schlußfolgerung	51
5	Zusammenfassung	52
6	Literaturverzeichnis	53

Abkürzungen

ACTH	Adrenocortikotropin	mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
ADM	Adrenomedullin	Na ⁺	Natrium-Ionen
ANP	Atrial natriuretisches Peptid	NO	Nitrit-monooxid
ATP	Adenosintriphosphat	NOS	NO-Synthetase
BDM	Butanedion Monoxim	PAMP	Proadrenomedullin N-terminal 20 Peptid
BSA	Bovines Serum Albumin	PDGF	Platelet derived growth factor
Ca ²⁺	Kalzium-Ionen	RBF	Renaler Blutfluß
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat	rfu	„relativ fluorescence unit“
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat	RIA	Radio immunosorbend Assay
CGRP	Calcitonin-gene-related-peptide	TK	Tyrosinkinase
CLSM	Konfokale Laserscan Mikroskopie	TNF- α	Tumornekrosefaktor α
DAG	Diacylycerin	VIP	Vasoaktives intestinales peptid
DMSO	Dimethylsulphoxid	VSMC	Glatte Gefäßmuskelzellen
DNA	Desoxyribonukleinsäure	ZNS	Zentrales Nervensystem
EGF	Epidermal growth factor		
ET-1	Endothelin-1		
EX	Exon		
FCS	Fetales Kälber Serum		
FGF	Fibroblast growth factor		
ICC	Immunzytochemie		
IL-1 α	Interleukin-1 α		
IL-1 β	Interleukin-1 β		
IP ₃	Inositoltriphosphat		
ISH	In situ Hybridisierung		
K ⁺	Kalium-Ionen		
L-NAME	N-Nitro-L-Arginin Methylester		
L-NMMA	N-MonoMethyl-L-Arginin		
LPS	Lipopolysaccharide		
MAPK	Mitogen aktivierte Proteinkinase		

1 Einleitung

1.1 Adrenomedullin

1993 entdeckten Kitamura et al. in menschlichem Phäochromozytom-Gewebe ein neues Peptid mit stark gefäßerweiternden Eigenschaften. Da sie bei weiteren Untersuchungen herausfanden, daß dieses Peptid auch in gesundem Nebennierenmark enthalten ist, nannten sie es Adrenomedullin (ADM)[1]. Heute wissen wir, daß ADM in sehr vielen Geweben des menschlichen Körpers, insbesondere im Bereich des Herz-Kreislaufsystems, der Lunge und den Nieren, in mehr oder weniger hohen Konzentrationen synthetisiert wird [2]. Neben dem bereits von Kitamura et al. beschriebenen Effekt auf die glatte Gefäßmuskulatur wurden relativ kurz nach der Entdeckung weitere Wirkungen zum Beispiel auf den Wasser- und Elektrolythaushalt [3] sowie auf das Zellwachstum [4] bekannt. Die nun folgenden Abschnitte legen den aktuellen Stand der Forschung zu dieser neuen Substanz dar.

1.2 Molekulare Struktur und Vorkommen

Menschliches ADM besteht aus 52 Aminosäuren mit einer zusätzlichen Amid-Gruppe am C-terminalen Ende (siehe Abbildung 1.1)[1]. Eine Disulfid-Brücke zwischen den Aminosäuren an Stelle 16 und 21 führt zur Ausbildung eines charakteristischen 6-Aminosäureringes, den ADM mit den Peptiden Calcitonin-gene-related-peptide (CGRP) und Amylin gemeinsam hat. Ein direkter Vergleich der Aminosäuresequenzen zeigt, daß Homologien zwischen ADM, CGRP und Amylin bestehen (siehe Abbildung 1.1), weswegen ADM der Peptid-Superfamilie um CGRP zugeordnet wird [1].



Abbildung 1.1:

Vergleichende Darstellung der Aminosäuresequenzen von humanem ADM, CGRP und Amylin, gemeinsam vorkommende Aminosäure sind rot, die Amid-Gruppen am C-terminalen Ende blau eingezeichnet. Aminosäure 16 und 21 sind über eine Disulfid-Brücke miteinander verbunden (Klammer).

ADM ist entwicklungsgeschichtlich ein hochkonserviertes Protein. So unterscheidet sich ADM vom Schwein lediglich durch die Substitution einer Aminosäure an Stelle 40 von menschlichem ADM [5], die Unterschiede zu Rinder-, beziehungsweise Ratten-ADM betragen 4 und 6 Aminosäuren [6, 7]. Abbildung 1.2 stellt einen Vergleich der Aminosäuresequenzen unterschiedlicher Spezies dar.

Human	YRQSMNNFQGLRSFGCRFGTCTVQKLAHQIYQFTDKDKDNVAPRSKISPQGY—NH ₂
Ratte	YRQSMN--QGSRSTGCRFGTCTMQKLAHQIYQFTDKDKDGMAPRNKISPQGY—NH ₂
Schwein	YRQSMNNFQGLRSFGCRFGTCTVQKLAHQIYQFTDKDKDGVAPRSKISPQGY—NH ₂
Rind	YRQSLNNFQGLRSFGCRFGTCTVQKLAHQIYHF T DKDKDGSAPRSKISPQGY—NH ₂

Abbildung 1.2:

Vergleich der Aminosäuresequenzen von ADM in unterschiedlichen Spezies. Unterschiede in der Sequenz sind rot gekennzeichnet, fehlende Aminosäuren durch einen Strich markiert.

Bereits in ihrer ersten Veröffentlichung wiesen Kitamura et al. ADM im Blut sowie in Nebennierenmark und, wenn auch in deutlich geringerer Menge, in Nieren und Lungengewebe nach [1]. In der Folgezeit wurde eine Vielzahl von Geweben in unterschiedlichen Spezies auf ihren ADM-Gehalt, beziehungsweise die ADM-Gen-Expression, untersucht und weiteres Vorkommen des Peptids nachgewiesen (siehe Tabelle 1.1). Eine entscheidende Entdeckung stellte dabei der Nachweis von sehr hohen Expressions- und Sekretionsraten in Gefäßendothelzellen durch Sugo et al. dar [8]. Die mRNA-Expressionsraten in Endothelzellkulturen waren um das 20 bis 40-fache höher als im Nebennierenmark und lagen annähernd in der Größenordnung des Endothelin-1, so daß heute davon ausgegangen wird, daß ADM ein Sekretionsprodukt des Gefäßendothels ähnlich NO und Endothelin-1 ist. Dennoch bleibt zu bemerken, daß eine Vielzahl von Zellen, wenn auch in unterschiedlichem Ausmaß, ADM sezernieren. Der ADM-Gehalt eines Gewebes scheint somit einerseits von der Sekretionsrate der Zellen, andererseits aber auch vom Grad der Vaskularisation abzuhängen. In Tabelle 1.1 sind unterschiedliche Zelltypen die ADM sezernieren, bzw. in denen ADM-Gen-Expression nachgewiesen wurde, zusammengestellt.

Tabelle 1.1:

Dargestellt ist eine Auswahl von Zelltypen in denen ADM, bzw. ADM-Gen-Expression, nachgewiesen werden konnte. RIA = Radioimmunosorbent Assay; ICC = Immunocytochemie; ISH = in situ Hybridisierung

Zelltyp	Nachweismethode	Referenz
Kardiovaskuläres System		
Gefäßendothel (Ratte, Mensch)	RIA/mRNA-Analyse	[8]
Glatte Gefäßmuskulatur (Ratte)	mRNA-Analyse	[9]
Kardiomyozyten (Ratte)	mRNA-Analyse	[10],[11]
Endokrines System und Blutzellen		
Nebenniere, Zona glomerulosa (Ratte)	ICC/ISH	[12]
Nebennierenmark (Mensch)	RIA/mRNA-Analyse	[1]
Hypophyse (Mensch, Ratte)	mRNA	[13]
Makrophagen (Mensch, Maus)	RIA/mRNA-Analyse	[14],[15],[16]
Granulozyten, Lymphozyten (Mensch)	RIA	[16]
Niere		
Mesangium, Niere (Mensch)	RIA/mRNA-Analyse	[17]
Epithelzellen Glomerulum (Mensch)	RIA/mRNA-Analyse	[17]
Distaler Tubulus (Hund)	ICC	[3]
Respirationstrakt		
Bronchialepithel (Maus)	ISH	[18]
Glatte Bronchialmuskulatur (Mensch)	ICC	[19]
Alveolarmakrophagen (Mensch)	ICC	[19]

1.3 Synthese und Sekretion

ADM wird als Teil eines größeren Vorläuferproteins, Präproadrenomedullin, synthetisiert und durch posttranslationales Prozessieren in seine biologisch aktive Form überführt. Menschliches Präpro-ADM besitzt 185 Aminosäuren. In einem ersten Teilschritt entsteht unter Abspaltung eines 21 Aminosäuren langen Signalpeptids am N-terminalen Ende Proadrenomedullin (164 Aminosäuren). In einem zweiten Schritt entstehen ADM (52 Aminosäuren) und das biologisch ebenfalls aktive Proadrenomedullin-N-terminal-20-Peptid. (PAMP).

In Abbildung 1.3 ist der Syntheseweg graphisch dargestellt. Das ADM-Gen des Menschen besteht aus vier Exons und drei Introns und ist auf Chromosom 11 lokalisiert [20].

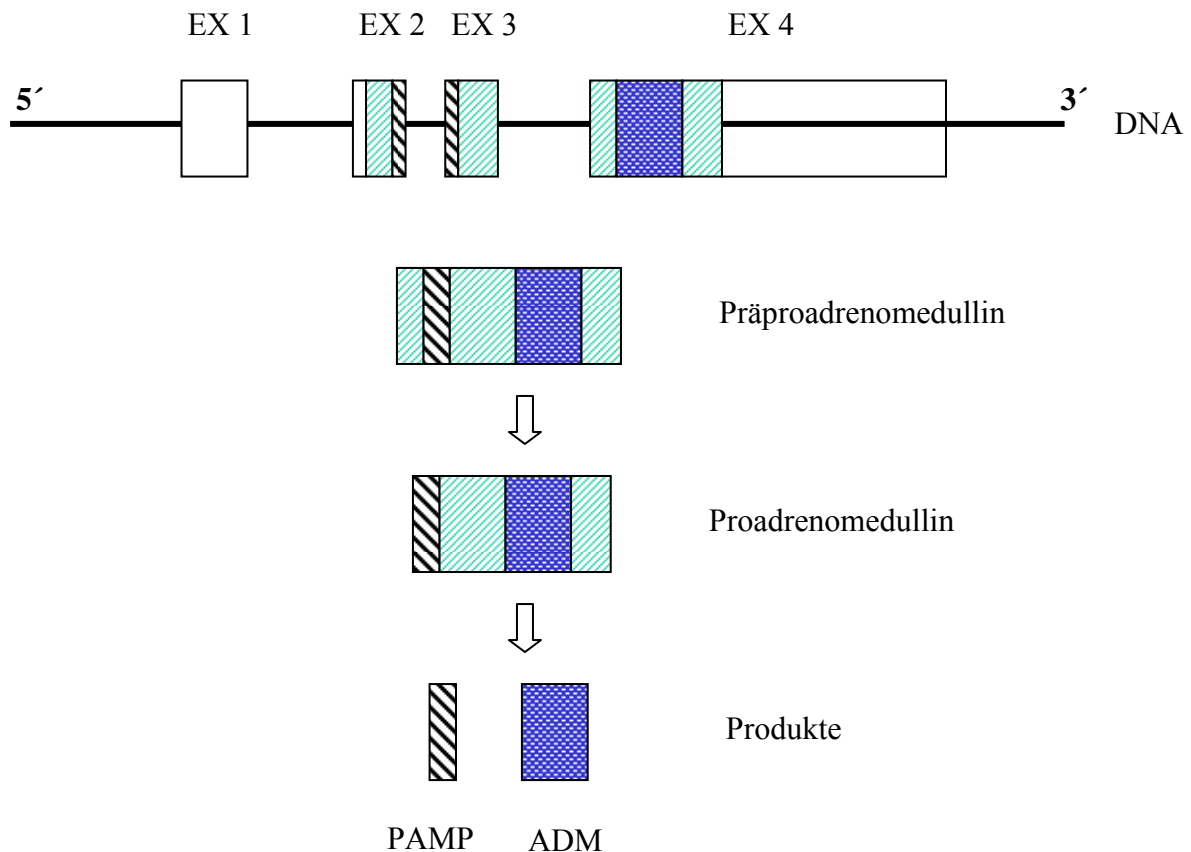


Abbildung 1.3:

Schematische Darstellung des ADM-Gens und der einzelnen Biosyntheseschritte bis zum fertigen ADM-Molekül. Durch posttranslationale Prozessierung entstehen aus Präproadrenomedullin in zwei Teilschritten die Produkte ADM und PAMP. Die für ADM kodierende DNA-Sequenz liegt im Bereich des 4. Exons. EX= Exon

Die Regulationsmechanismen der ADM-Synthese sind noch nicht eindeutig geklärt. Eine Vielzahl mechanischer und humoraler Stimuli scheinen Einfluß auf die Synthese und Sekretion zu haben. Die meisten Untersuchungen wurden an Zellkulturen aus Gefäßendothel und glatter Gefäßmuskulatur (VSMC) durchgeführt. Sugo et al. sahen in VSMC eine Suppression der ADM Gen-Expression durch Forskolin und 8-bromo-cAMP als Hinweis auf eine mögliche Beteiligung von intrazellulärem cAMP an der Expressionskontrolle von ADM. Thrombin, Interferon γ und VIP („vasoactive intestinal polypeptide“) führten ebenfalls zu einer Suppression der ADM Synthese, während Angiotensin, Endothelin-1, Bradykinin, Substanz P, Adrenalin, Phorbol-Ester und FCS die ADM Synthese anregten [21].

Andere Arbeitsgruppen untersuchten die Wirkung verschiedener Hormone. Mehrere Publikationen weisen auf einen positiven Effekt von Glukokortikoiden, Mineralokortikoiden und Thyroxin auf die ADM Expression und Sekretion in unterschiedlichen Geweben hin, während

für verschiedene Wachstumsfaktoren wie zum Beispiel EGF, FGF, PDGF und Geschlechtshormone wie Progesteron, Testosteron und Estradiol nur eine geringer oder gar kein Einfluß nachgewiesen werden konnte [22, 23, 24, 25]. Allgemein scheint es, daß cAMP vermittelte Effekte zu einer Abnahme, Phospholipase C/Protein Kinase C vermittelte Effekte zu einer Zunahme der ADM Expression und Sekretion führen [17, 26].

Eine wichtige Rolle bei der ADM-Sekretion spielen Zytokine. Horio et al. fanden eine Zunahme der Sekretion in Zellkulturen von Kardiomyozyten unter Interleukin-1 β (IL-1 β) und Tumor Nekrose Faktor α (TNF- α) [27, 28]. Andere Arbeitsgruppen beobachteten eine starke Zunahme der ADM Gen-Expression und Sekretion unter IL-1 α , IL-1 β , TNF- α , TNF- β und Lipopolysacchariden (LPS) in VSMC [24, 29]. Unterstützt werden diese Ergebnisse durch Untersuchungen an anästhesierten Ratten durch Shoji et al. Nach intravenöser Gabe von LPS stieg die Plasmakonzentration von ADM auf das bis zu 18-fache im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Gen-Expressionsraten in Leber, Lunge, Niere, Ileum und Aorta stiegen auf das 3-fache an [30]. Diese Beobachtungen weisen auf eine mögliche Rolle von ADM im Rahmen des Kreislaufversagens beim septischen Schock hin.

Neben den bereits genannten Faktoren scheinen auch mechanische und metabolische Faktoren die Expression und Sekretion von Adrenomedullin zu beeinflussen. Hofbauer et al. untersuchten zuvor hypoxisch behandelte Ratten und fanden einen Anstieg der ADM mRNA-Synthese in allen untersuchten Organsystemen, einschliesslich Herz, Lunge und Gehirn. Ähnliche Ergebnisse zeigen Untersuchungen an Zellkulturen aus humanem Koronarendothel [31]. Ando und Chun et al. wiesen eine gesteigerte ADM mRNA-Produktion in VSMC und Gefäßendothel unter oxidativer Stress nach [32, 33].

1.4 Rezeptoren und Wirkmechanismen

Auf Grund der strukturellen Ähnlichkeit von ADM und CGRP ging man zunächst davon aus, daß die Wirkungen von ADM über bereits bekannte CGRP-Rezeptoren vermittelt würden. Diese Annahme wurde durch die Beobachtung unterstützt, daß der CGRP-Rezeptor-Antagonist CGRP₈₋₂₇ einige Wirkungen von ADM blockiert. Nuci et al. zeigten, daß CGRP₈₋₂₇ die vasodilatierende Wirkung von ADM in mesenterialen Gefäßen blockiert [34]. Ähnliche Effekte wurden in Versuchen an zerebralen Gefäßen nachgewiesen [35, 36]. Auch wenn davon ausgegangen werden muß, daß einige der Wirkungen von ADM über CGRP Rezeptoren (insbesondere CGRP₁-Rezeptoren) vermittelt werden, so zeigen neuere Experimente dennoch,

daß ADM eigene Rezeptoren besitzt. Edwards et al. untersuchten die Effekte von ADM und CGRP auf verschiedene Zellen in der Niere. Sie beobachteten unterschiedliche Effekte von CGRP₈₋₂₇ auf die ADM vermittelten cAMP Anstiege in Glomerula und distalem Konvolut. In den Glomerula zeigte CGRP₈₋₂₇ keine Wirkung, im distalen Konvolut hingegen blieben die ADM vermittelten cAMP Anstiege unter Einwirkung von CGRP₈₋₂₇ aus. Aus diesem und anderen Experimenten schlossen sie auf die Existenz von zwei unterschiedlichen Rezeptortypen in der Vermittlung der ADM-Wirkung: ADM-assoziierte Rezeptoren mit hoher Affinität für ADM und geringer Affinität für CGRP und CGRP-assoziierte Rezeptoren mit hoher Affinität für CGRP und geringer Affinität für ADM [37].

Eguchi et al. wiesen in Rezeptor Bindungs-Assays mit radioaktiv markiertem ADM (¹²⁵I-ADM) die Präsenz von Rezeptoren mit einer 23 mal höheren Affinität für ADM im Vergleich zu CGRP nach [38]. Ishizaka et al. kamen zu ähnlichen Ergebnissen [39]. Diese Untersuchungen legten das Vorhandensein eigener ADM Rezeptoren nah. Spezifische Bindungsstellen für ¹²⁵I-ADM konnten in unterschiedlichen Geweben der Ratte, zum Beispiel in Herz, Lunge, Leber, Milz und Skelettmuskel nachgewiesen werden [40].

Erstmals entdeckten Kapas et al. 1995 einen cDNA Klon, der für einen ADM Rezeptor kodiert. Dieser entsprach einem bekannten „Orphan Rezeptor“, der bereits in der Lunge nachgewiesen worden war [41]. Er zeigte eine hohe Affinität für ¹²⁵I-ADM (EC₅₀ = 7nM) und war über ein Cholera-Toxin-sensitives G Protein an die „second messenger“ Adenylylzyklase und Phospholipase C gekoppelt [42]. Samson et al. beschrieben einen zweiten ADM Rezeptor in der Hypophyse, der unabhängig von der Adenylylzyklase die Sekretion von Adrenocortikotropin (ACTH) inhibiert [43].

Die Entdeckung von ADM geht auf seine Fähigkeit intrazelluläres cAMP zu erhöhen zurück [1]. Seitdem sind eine Vielzahl von Veröffentlichungen erschienen, die cAMP als einen „second messenger“ der ADM Wirkung bestätigen [4, 37, 38, 39, 44].

Die von ADM induzierte Vasodilatation wird über mindestens zwei Signaltransduktionswege vermittelt. Einerseits wirkt ADM direkt auf die glatte Gefäßmuskulatur und führt zu einer Erhöhung der intrazellulären cAMP Konzentration, andererseits stimuliert es die NO-Produktion in Endothelzellen. Shimekake et al. untersuchten die Signaltransduktionswege in Endothelzellen aus Rinder-Aorten. ADM aktivierte die Adenylylzyklase und führte zu einem Anstieg der zytosolischen Ca²⁺ Konzentration, beides über Cholera-toxin-sensitives G-Proteine. Der Anstieg der Ca²⁺ Konzentration resultierte initial aus einer vermehrten IP₃-Bildung durch Aktivierung der Phospholipase C und wurde im weiteren Verlauf durch die Öffnung von Ca²⁺-Kanäle in der

Zellmembran unterstützt. Die gestiegene Ca^{2+} Konzentration induzierte eine vermehrte Produktion von NO [42].

Einen weiteren Hinweis für die Beteiligung von NO an der ADM induzierten Vasodilatation lieferte die Beobachtung, daß N-Nitro-L-Arginin Methylester (L-NAME), ein spezifischer Blocker der NO-Synthetase (NOS), die blutdrucksenkende Wirkung von ADM vermindert [45]. Die ADM vermittelte Vasodilatation von kontrahierten Aorta- und Pumonalararterien-Segmenten läßt sich ebenfalls durch die Gabe von L-NAME und durch die Entfernung des Endothels vermindern [46].

Die vasodilatierende Wirkung von ADM könnte teilweise auch durch Interaktion mit K^+ -Kanälen bedingt sein. In Koronararterien interagiert ADM mit Adenosin-Rezeptoren und führt zur Aktivierung des ATP-sensitiven K^+ -Kanals [47]. Glibenclamid, ein Inhibitor dieses Kanals, blockiert die vasodilatierende Wirkung von ADM in zerebralen Arteriolen der Ratte. Andererseits führt die Blockade von K^+ -Kanälen zu keiner signifikanten Abschwächung der vasodilatierenden Effekte von ADM in retinalen Gefäßen des Kaninchens [48].

Neben den bereits genannten Wirkmechanismen sind noch weitere beschrieben. ADM scheint die Zell-Proliferation in PDGF stimulierten mesangialen Zellen über eine Blockade der mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK) zu inhibieren [4]. In VSMC stimuliert es cAMP-unabhängig die Zellproliferation, wahrscheinlich über die Aktivierung von Tyrosinkinasen und MAPK [49]. Ähnliche Mechanismen werden für die suppressive Wirkung auf die ACTH-Sekretion vermutet [43].

Abbildung 1.4 zeigt eine schematische Darstellung der bis heute bekannten zellulären Signaltransduktionswege.

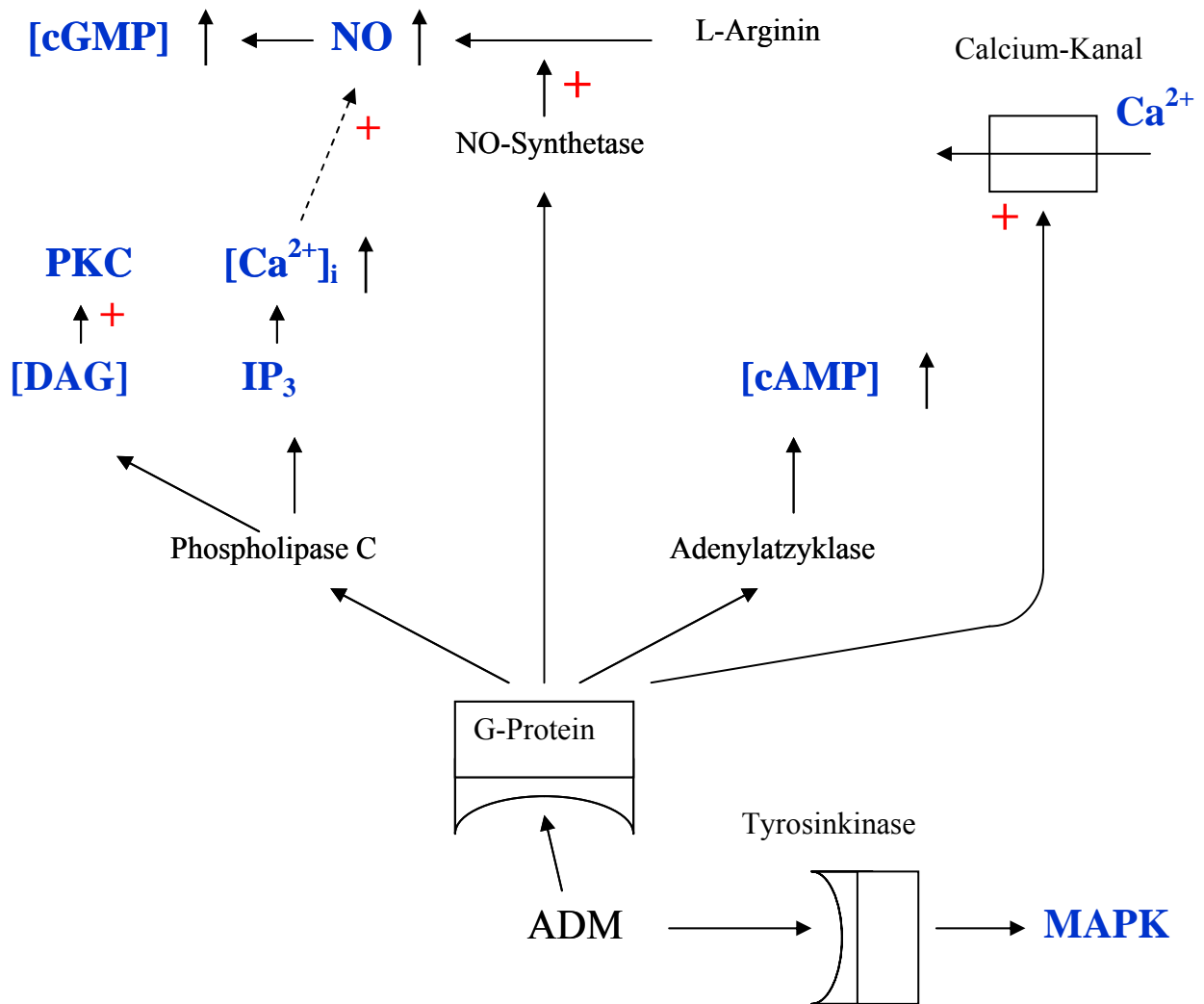


Abbildung 1.4:

Schematische Darstellung der bisher beschriebenen zellulären Signaltransduktionswege des ADM. Beschreibung siehe Text. DAG = Diacylglycerin; IP₃ = Inositoltriphosphat; cAMP = zyklisches Adenosinmonophosphat; NO = Stickstoffmonoxid; cGMP = Zyklisches Guanosinmonophosphat; MAPK = Mitogen-aktivierte Proteinkinase; [Ca²⁺] = Zytoplasmatische Kalziumkonzentration.

1.5 Biologische Wirkungen

Vasodilatation und Natriurese sind die beiden am meisten untersuchten Wirkungen von ADM. Sie sind in einer Vielzahl unterschiedlicher Spezies, inklusive des Menschen, nachgewiesen worden und deuten auf eine Rolle von ADM in Regulation des Wasser und Elektrolythaushalts hin. Daneben sind eine Reihe weiterer Wirkungen beschrieben worden, auf die in vorhergehenden Abschnitten teilweise bereits hingewiesen wurde. In Abbildung 1.5 sind die wichtigsten noch einmal zusammengefasst dargestellt.

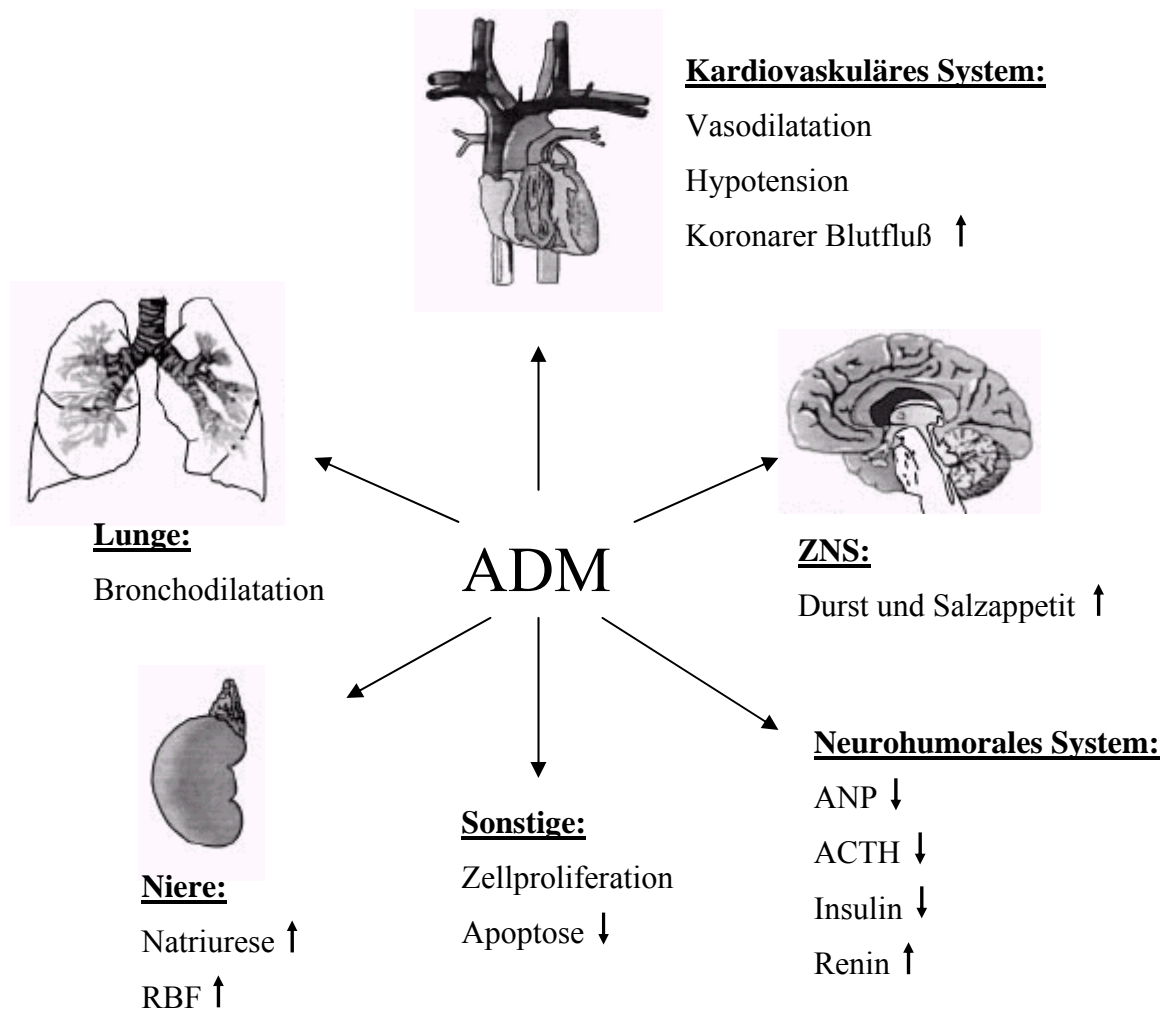


Abbildung 1.5:

Die Wirkung von ADM in verschiedenen Organsystemen. ANP = atriales natriuretisches Peptid, RBF = renaler Blutfluß, ZNS = zentrales Nervensystem, ACTH = Adrenocorticotropin.

Wirkung auf die Gefäße:

Die vasodilatierende Wirkung von ADM ist in verschiedenen Gefäßmodellen in vitro belegt [1, 34, 35, 42, 44, 45, 46, 48]. Daneben existieren eine Reihe von Untersuchungen in vivo. Intrakoronare Injektion von ADM in anästhesierten Hunden induziert eine Erhöhung des koronaren Blutflusses [47]. In Schafen verursacht die intravenöse Applikation von ADM eine dosisabhängige Reduzierung des mittleren arteriellen Blutdrucks [50]. Ähnliche Ergebnisse sind für den Menschen beschrieben [51]. Die Vasodilatation scheint gewebespezifisch zu sein. He et al. untersuchten die Wirkung von intravenös appliziertem ADM in wachen Ratten und stellten regionale Unterschiede in der Durchblutungsregulation fest. Die Durchblutung von Lunge, Herz, Milz, Nieren, Nebenniere und Dünndarm wurde gesteigert, während sie in Haut und Gehirn unverändert blieb und in der Skelettmuskulatur und den Gonaden sogar vermindert wurde. Die Vasodilatation war also hauptsächlich in Geweben erhöht, in denen das ADM-Gen hohe Expressionsraten aufweist [52]. Dies legt eine Funktion von ADM in der lokalen Durchblutungskontrolle nah.

Wirkung auf die Nieren:

Jougasaki et al. untersuchten die Wirkung von ADM auf die Nierenfunktion in Hunden. Die intrarenale Applikation von ADM führte zu einer Erhöhung der glomerulären Filtrationsrate und einer verminderten Na⁺ Resorption im distalen Tubulus [3]. Es resultierte eine verstärkte Diurese und Natriurese. Diese Ergebnisse wurden von einer Vielzahl anderer Arbeitsgruppen bestätigt [53, 54, 55, 56, 57]. In der Regulation der Natriurese wird ADM eine ähnliche Rolle wie ANP zugeschrieben. Die Effekte scheinen über eine Beeinflussung der NOS und des Prostaglandin-Systems vermittelt zu werden [58, 59].

Wirkung auf das zentrale Nervensystem:

Neben den bereits beschriebenen neurohumoralen Wirkungen von ADM, insbesondere auf die basale ACTH Ausschüttung [43], greift ADM auch über die Regulation von Durst und Salzappetit in den Wasser- und Elektrolythaushalts ein. Intrazerebroventrikuläre Injektion von ADM bewirkt eine dosisabhängige Inhibition von Durst und Salzappetit in der Ratte [60, 61]. Im Gegensatz zu den bisher beschriebenen hypotensiven Effekten, induziert die intrazerebrovaskuläre Injektion von ADM eine Steigerung des systemischen Blutdrucks in der Ratte [62, 63].

1.6 Kardiale Wirkungen

Die Wirkung von ADM auf das Kontraktionsverhalten des Herzens wurde von einigen Arbeitsgruppen untersucht. Perres et al. beobachteten 1993 einen gering negativ inotropen Effekt nach einer Bolusapplikation von ADM in isolierten Rattenherzen. Die Wirkung setzte bereits nach 25 Sekunden ein und dauerte bis zu 5 Minuten [64]. An menschlichen Myozyten konnten Mukherjee et al. ebenfalls einen negativ inotropen Effekt von ADM nachweisen, zusätzlich zeigte sich unter Vorbehandlung mit ADM eine geringere Ansprechbarkeit der Myozyten auf Isoproterenol, ein positiv inotrop wirkendes Katecholamin [65]. Ikenouchi et al. sahen negativ inotrope Effekte auf isolierte adulte Kardiomyozyten des Kaninchens bedingt durch eine Abnahme der zytosolischen Ca^{2+} Konzentration und des Ca^{2+} Einstroms in die Zelle. Diese Wirkung schien über eine NO induzierte Zunahme der intrazellulären cGMP Konzentration vermittelt zu sein [66].

Im Gegensatz dazu wiesen Szokodi et al. positiv inotrope Effekte von ADM in isolierten Rattenherzen über einen cAMP unabhängigen Mechanismus nach [67]. Ihara et al. berichteten ebenfalls über positiv inotrope Wirkungen von ADM, allerdings schienen diese cAMP vermittelt zu sein [68]. In einer neueren Arbeit von Mitra et al. an adulten Kardiomyozyten der Ratte zeigte sich ein zweiphasiger Wirkungsverlauf von ADM. Innerhalb von 30 min trat zunächst ein positiv inotroper Effekt auf, der nach längerer Inkubationszeit (> eine Stunde) in eine negativ inotrope Wirkung überging. Beide Effekte waren durch Gabe eines spezifischen ADM-Antagonisten (ADM-22-52) inhibierbar [69].

Saetrum et al. untersuchte die Wirkung von CGRP, Amylin und Adrenomedullin an humanen myokardialen Trabekeln. Während CGRP und Amylin positiv inotrop wirkten, konnte unter ADM-Einfluß keine Änderung des Kontraktionsverhaltens festgestellt werden [70].

1.7 Fragestellung

Im Gegensatz zu den vasodilatatorischen und natriuretische Eigenschaften ist die Wirkung von ADM auf das Kontraktionsverhalten des Herzens bis heute nicht eindeutig geklärt. Es bestehen unterschiedliche Angaben sowohl in Bezug auf die Beeinflussung der Inotropie, als auch über Dauer, Ausmaß und Mechanismen der Wirkung von ADM am Herzen.

Bei der Beurteilung der Wirkung einer Substanz auf die kontraktilen Parameter des Herzens gibt es unterschiedliche experimentelle Ansätze, die alle in mehr oder weniger starkem Maße von Außenfaktoren, beispielsweise der koronaren Durchblutung, beeinflusst werden.

In der vorliegenden Arbeit soll mit Hilfe von drei unterschiedlichen experimentellen Ansätzen ein Beitrag zur Klärung der Wirkung von ADM auf das Kontraktionsverhalten des Herzens geleistet werden.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien, Lösungen, Puffer

Tabelle 1 enthält eine Übersicht der in dieser Doktorarbeit verwendeten Lösungen und Puffer. Wenn nicht ausdrücklich anders vermerkt, stammten die erwähnten Chemikalien von der Firma Sigma-Aldrich (Deisenhofen, Deutschland)

Tabelle 2.1:

Konfokales Laserscan Mikroskop	
Versuchspuffer	117 mM NaCl; 2,8 mM KCl; 0,6 mM MgSO ₄ ; 1,2 mM KH ₂ PO ₄ ; 10 mM Hepes; 20 mM Glucose; 1,2 mM CaCl ₂ ; pH 7,3
Perfusionspuffer	110 mM NaCl; 2,6 mM KCl; 1,2 mM MgSO ₄ ; 1,2 mM KH ₂ PO ₄ ; 25 mM Hepes; 11 mM Glucose; pH 7,4
CaCl ₂ – Stammlösung	100 mM CaCl ₂
Laminin – Stammlösung	2,2 mg/ml Laminin (Harbor Bio-Products, Northwood, MA, USA) in 50 mM Tris-Puffer, 150 mM NaCl,
Färbung – Stammlösung Fluo-3-AM (Acetonmethylester)	10mM Fluo-3-AM (1 mg) in 855 µl DMSO-Pluronic (DMSO: Merck, Darmstadt, Deutschland)
DMSO–Pluronic (Dimethylsulphoxid)	275 mg Pluronic in 1ml DMSO (DMSO: Merck, Darmstadt, Deutschland)
Enzym – Lösung	16,0 mg Kollagenase (254 U/mg; Worthington Biochemical Corp., Lakewood, NJ, USA), 174 mg BSA (säurefrei), 20 ml Perfusionspuffer, 22,5µl CaCl ₂ - Stammlösung
Isoliert perfundiertes Langendorff Herz	
Perfusionspuffer	127,1 mM NaCl; 4,7 mM KCl; 1,1 mM MgSO ₄ ; 1,19 mM KH ₂ PO ₄ ; 24,9 NaHCO ₃ , 10 mM Hepes; 8,93 mM Glucose; 1,26 mM CaCl ₂ ; pH 7,4
Isolierter Papillarmuskel	
Versuchspuffer	116 mM NaCl; 25 mM NaHCO ₃ ; 1,0 mM CaCl ₂ ; 4,0 mM KCl; 1,2 mM KH ₂ PO ₄ ; 1,2 Mm MgSO ₄ ; 6,0 mM Hepes; 10 mM Glukose pH 7,4
Präparationspuffer	Versuchspuffer + 20 mM BDM (Butanedion Monoxim)

2.2 Versuchstiere

Alle Versuche wurden mit 180-200g schweren weiblichen Albino-Wistar Ratten aus der Zucht des Tierstalls der Charité durchgeführt.

2.3 Einzelzellmessung an adulten Kardiomyozyten

Die konfokale Laserscan Mikroskopie (CLSM) bietet unter anderem die Möglichkeit, das Kontraktionsverhalten und die intrazelluläre Kalziumkonzentration adulter Kardiomyozyten unter verschiedenen Bedingungen zu untersuchen. Zu diesem Zweck müssen die Zellen isoliert, durch eine Trägersubstanz am Boden einer Versuchskammer fixiert und mit einem Kalziumfarbstoff beladen werden.

Im folgenden Abschnitt wird auf die einzelnen Teilschritte sowie die daran anschließende Messung und Auswertung der Parameter näher eingegangen.

2.3.1 Isolierung adulter Kardiomyozyten

Die Isolierung der Myozyten erfolgt mittels einer modifizierten Langendorff-Apparatur, die bereits in ähnlicher Form von Powell und Piper beschrieben wurde [71, 72].

Sie dient der Perfusion des Herzens über die Aorta, um zum einen die Versorgung mit den nötigen Nährstoffen zu gewährleisten, zum anderen die für die enzymatische Isolation notwendigen Kollagenasen zu infundieren.

Das Herz wird zu diesem Zweck an einen Kreislauf angeschlossen und während des Versuchsablaufs in einem verschließbaren Auffangbecher, einer Art "Klimakammer", aufbewahrt. Sie gewährleistet, über einen parallel geschalteten Heiz-Pump-Kreislauf, eine konstante Umgebungstemperatur von 37° C. Zur regelrechten Sauerstoffversorgung des Herzens wird Perfusionspuffer in einem Vorratsgefäß mit Carbogen (95 % O₂, 5% CO₂) äquilibriert und gleichzeitig erwärmt. Die Begasung startet eine halbe Stunde vor Versuchsbeginn. Der pH-Wert des Puffers wird zuvor bei Raumtemperatur auf 7,4 eingestellt. Ausgehend vom Vorratsgefäß gelangt der Perfusionspuffer über eine erwärmte Säule zum Herz. Sie erfüllt im wesentlichen zwei Funktionen:

Durch die Höhendifferenz wird ein Druck von 90 cm Wassersäule erzeugt, der über eine Schraubklemme den gewünschten Flußbedingungen angepaßt werden kann. Zweitens beugt eine integrierte Blasenfalle der Gefahr von Luftembolien vor.

Nach Perfusion des Herzens wird der Perfusionspuffer in einem Auffangbecher, der gleichzeitig als Klimakammer dient, gesammelt und über eine Rollerpumpe in das Vorratsgefäß rezirkuliert. Die Isolationsapparatur ist in Abbildung 2.1 dargestellt.

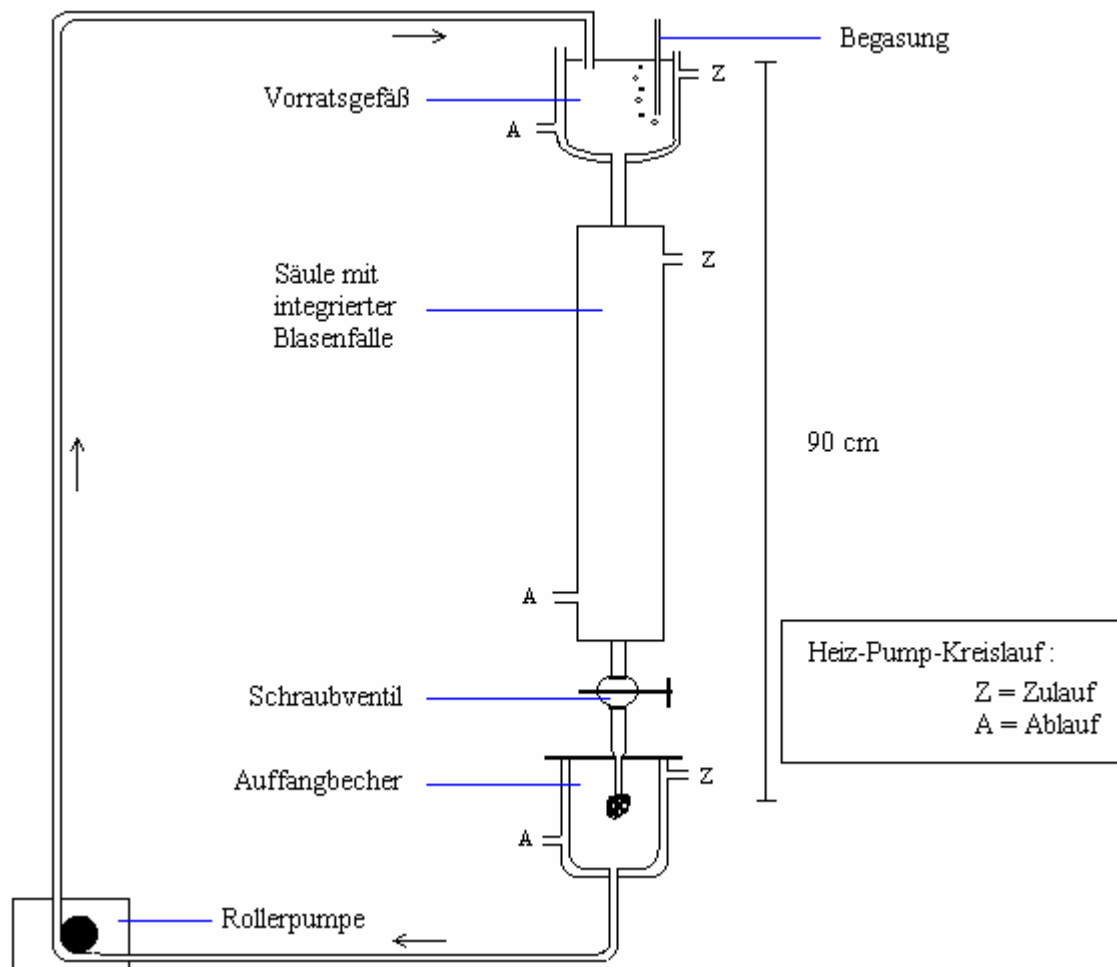


Abbildung 2.1: Modifizierte Langendorff-Apparatur nach Powell und Piper.

Vorbereitung

Vor Beginn der Isolation wird das gesamte System zunächst mit zirka einem Liter destilliertem Wasser gespült, anschließend mit Perfusionspuffer gefüllt und begast. Gleichzeitig wird der Heiz-Pump-Kreislauf angeschaltet um die Anlage auf 37° Celsius zu erwärmen. Unmittelbar vor Versuchsbeginn werden die zur Isolation verwendeten Enzyme in einem separaten Becherglas gelöst (16 mg Enzym, 174 mg BSA und 22,5 µl CaCl-Stammlösung auf 20 ml Perfusionspuffer).

Entnahme der Herzen

Das Herz stammt von 49-56 Tage alten weiblichen Albino Wistar Ratten mit einem Gewicht zwischen 180-200 g. Zur Isolierung werden die Tiere mit 5 ml intraperitonealer Injektion von Thiopental-Na⁺ narkotisiert. Der Bewußtseinszustand wird durch das Setzen von Schmerzreizen überprüft und bei fehlender Reaktion der Brustkorb durch einen medianen Schnitt entlang des

Brustbeins eröffnet. Da eine regelrechte Sauerstoffversorgung des Herzens nun nicht mehr gewährleistet ist, ist jetzt eine möglichst schnelle Präparation notwendig. Das Herz wird freipräpariert, entnommen und in eine vorbereitete Petrischale mit 4° Celsius kalter NaCl Lösung (0.9%) überführt. Dieses Vorgehen gewährleistet zum einen eine rasche Druckentlastung des Herzens, zum anderen eine möglichst schnelle Absenkung von Stoffwechselaktivität und Sauerstoffverbrauch des Herzmuskels. Nach wenigen Schlägen stellt das Herz seine mechanische Aktivität ein und kann zur weiteren Präparation in eine zweite, identisch vorbereitete Petrischale, überführt werden. Dort erfolgt dann die Feinpräparation mit Entfernung von eventuell noch vorhandenen Lungen- oder Luftröhrenresten, so daß lediglich das Herz mit seinen zu- und abführenden Gefäßen und dem darüber liegenden Thymus übrigbleibt. Wenn man nun das Herz mit der Vorderseite nach oben dreht und die beiden Thymuslappen durch Zug mit zwei Pinzetten nach lateral voneinander trennt und entfernt, erhält man einen guten Überblick auf den darunter liegenden Gefäßstrang, Aorta links und Arteria pulmonalis rechts. Für den weiteren Versuchsablauf ist es von entscheidender Bedeutung die Aorta so frei zu präparieren, daß der Aortenbogen und die davon abgehenden Gefäße gut sichtbar sind.

Kanülierung der Aorta

Ist die Präparation der Aorta beendet, wird das Herz aus der gekühlten NaCl-Lösung genommen und an die modifizierte Langendorff-Apparatur (siehe Abbildung 1) angeschlossen. Zu diesem Zweck wird eine Kanüle in die Aorta vorgeschoben, zwischen Abgang der Koronararterien und dem ersten Abgang aus dem Aortenbogen platziert und durch eine Ligatur fixiert. Bei diesem Vorgang ist vor allem auf zwei Dinge zu achten. Erstens ist die Lage der Kanüle von entscheidender Bedeutung. Liegt sie noch oberhalb des ersten Abgangs aus der Aorta, geht Nährlösung über diesen Weg verloren, liegt sie zu tief, werden die Eingänge in die das Herz versorgenden Koronararterien verlegt, oder die Aortenklappe penetriert. Zweitens muß man darauf achten, daß die Kanüle unter Fluß von Nährlösung vorgeschoben wird, um die Gefahr von Luftembolien zu minimieren. Der gesamte Ablauf von Eröffnung des Brustkorbs bis zum Beginn der retrograden Perfusion sollte nicht länger als drei Minuten betragen.

Ist das Herz ausreichend fixiert, so wird zunächst für drei Minuten mit reinem Perfusionspuffer perfundiert (1 Tropfen pro Sekunde), um zum einen restliche Blutbestandteile auszuwaschen, und zum anderen den extrazellulären Kalziumgehalt zu senken. Gegen Ende dieser "Auswaschphase" wird der Auffangbecher unter das Herz geschoben, mit einem Deckel verschlossen und so das System auf Reperfusion umgestellt.

Enzymatische Isolation

Um die Myozyten aus ihrem Gewebeverband zu lösen wird die vorbereitete Enzymlösung zugesetzt, das System mit Perfusionspuffer auf ein Endvolumen von 75 ml aufgefüllt und für 27 Minuten rezirkuliert (1 Tropfen pro Minute). Während dieser Zeit sollte das Herz, als Zeichen für gleichmäßige Perfusion, eine homogene blaßrosa Färbung aufweisen.

Danach wird das Herz abgenommen und mit 10 ml Perfusionslösung in eine Petrischale gegeben. Mit Hilfe zweier Skalpelle werden zunächst die Vorhöfe auf Höhe der Klappenebene abgetrennt und dann das Myokardgewebe in zirka 1 mm³ große Stücke geschnitten. Die entstandene Zellsuspension wird zusammen mit der restlichen Perfusionslösung aus der Anlage in ein erwärmtes Becherglas gegeben und für weitere 15 Minuten mit Carbogen begast. Neben der konstanten Sauerstoffversorgung wird die Lösung durch die Begasung "aufgewirbelt" und so die enzymatische Isolation mechanisch unterstützt. Um die Zellsuspension von größeren Gewebstückchen zu befreien, wird der Inhalt des Becherglases am Ende dieser "Nachverdauung" über ein 2 µm Nylonsieb in 2 Zentrifugenröhrchen filtriert.

Waschen und Auftrennen der Zellen

Die relativ großen Myozyten müssen noch von Zellen anderer Herkunft, beispielsweise Fibroblasten, getrennt und in ein kalziumhaltiges Medium überführt werden. In drei Schritten werden die Zellen bei jeweils 300 Umdrehungen pro Minute für drei Minuten zentrifugiert, der Überstand abgossen und das übrigbleibende Pellet in 15 ml Perfusionspuffer steigender Kalziumkonzentration resuspendiert (1. Schritt Perfusionspuffer mit 200 µM Ca²⁺; 2. Schritt Perfusionspuffer mit 500 µM Ca²⁺; 3. Schritt Versuchspuffer 1,2 mM Ca²⁺).

Zellzählung

Zur Beurteilung der Ausbeute werden die Zellen in einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer gezählt (5 unterschiedliche Felder), wobei Gesamtzellzahl, die Zahl der intakten Zellen und das Verhältnis beider zueinander bestimmt wird. Zur Beurteilung werden morphologische Kriterien angewendet, als intakt gelten Zellen mit der für Kardiomyozyten typischen länglichen Form und Querstreifung im Gegensatz zu abgerundeten, toten Zellen. Durchschnittlich ergab sich eine Gesamtzellzahl von 1,5 Millionen mit einer Ausbeute von 20-35 % intakter Kardiomyozyten.

2.3.2 Anheften und Färbung

Um die Zellen unter dem CLSM auf Kontraktionsverhalten und intrazellulären Kalziumgehalt zu untersuchen, müssen sie am Boden einer Versuchskammer fixiert und mit einem Kalziumfarbstoff beladen werden.

Als Versuchskammer dienen 4-Well-Objekträger mit Borosilikatglasböden (1,8 cm² Grundfläche) und 1,5 ml Volumen Inhalt pro Well (Firma Nalgene Nunc International Corp., Naperville, IL, USA). Zur Vorbereitung werden die Kammern eine Stunde lang mit 10 µg/cm² Laminin beschichtet und dann die Zellsuspension zugegeben. Pro Kammer werden zirka 5000 Zellen eingesetzt. Nach einer Stunde "Anheftungszeit" wird die überstehende Flüssigkeit abgesaugt, durch Färbelösung ersetzt und für weiter 45 Minuten auf einem Schwenktisch (30/min) inkubiert.

Als Farbstoff kommt Fluo-3-AM zur Anwendung. Es handelt sich um einen lipophilen Acetonmethylester, der zum Monitoring des zeitlichen Verlaufs intrazellulärer Kalziumkonzentrationen (Kalziumtransienten) bereits etabliert ist [73]. Seine lipophile chemische Struktur ermöglicht eine rasche Diffusion in die Zelle, wo er durch zelluläre Esterasen in zwei polare Produkte gespalten und so am Wiederaustritt gehindert wird. Da Fluo-3-AM eine lichtempfindliche Substanz ist, muß die Inkubation im Dunkeln durchgeführt werden. Nach Ablauf der Färbezeit wird die Lösung aus den Kammern abgesaugt und durch 500 ml Versuchspuffer (VP) ersetzt. Die Zellen können nach weiteren 30 Minuten Inkubationszeit für Versuche verwandt werden.

2.3.3 Das konfokale Laserscan Mikroskop (CLSM)

Das Prinzip eines CLSM ist in Abbildung 2.2 dargestellt. Durch die direkt vor dem Detektor gelegene Lochblende wird Licht, das außerhalb der eingestellten Fokusebene emittiert wird, "ausgeblendet". Zur Erzeugung eines Bildes tastet der Laser das Objekt Punkt für Punkt ab. Das emittierte Licht wird nach Passage des Objektivs an einem dichromatischen Teilerspiegel aufgetrennt, so daß nur Strahlen ab einer definierten Wellenlänge den Detektor erreichen.

In der vorliegenden Arbeit kam ein konfokales Laserscan Mikroskop der Firma Noran (Odyssee XL) zur Anwendung. Es verfügt unter anderem über einen Argon-Ionen Laser, der auf eine Wellenlänge von 488 nm eingestellt werden kann. Trifft Licht dieser Wellenlänge auf die mit Fluo-3-AM markierten Zellen, so wird der Farbstoff zur Emission von Licht mit einer Wellenlänge von 526 nm angeregt. In Gegenwart von Kalzium erhöht sich die Intensität der Emission um den Faktor 80 [74]. Der in den Strahlengang eingebrachte Teilerspiegel sorgt dafür, daß nur Licht mit einer Wellenlänge größer 515 nm den Detektor erreicht. Informationen

außerhalb der eingestellten Fokusebene werden über die Lochblende "herausgefiltert". Das eingehende Signal wird nach Intensitätswerten mit Hilfe eines Photomultipliers digitalisiert und auf einer Indy Workstation (Silicon Graphics) gespeichert (640 x 114 Pixel; Pixeldurchmesser 0,26 μm).

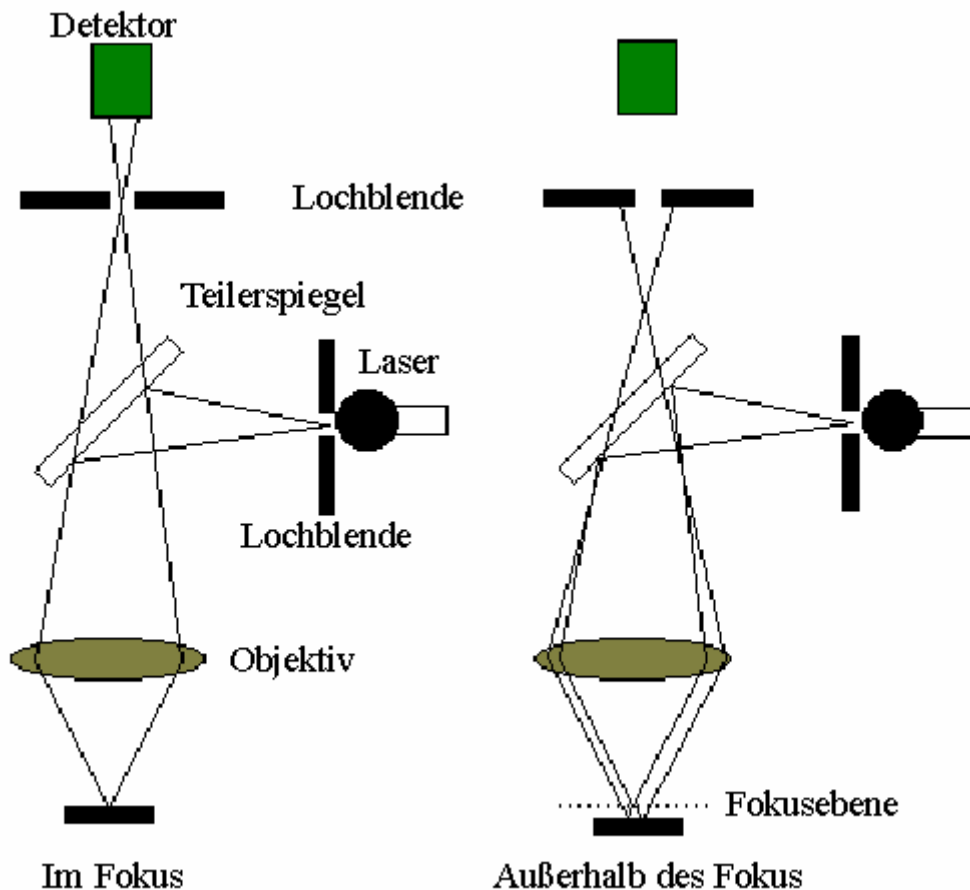


Abbildung 2.2:

Das konfokale Prinzip. Eine zur Fokusebene konjugiert (konfokal) angeordnete Lochblende sorgt dafür, daß sämtliches Licht, welches nicht aus der eingestellten Ebene stammt, auch nicht vom Detektor erfaßt werden kann. Somit werden Überlagerungsphänomene aus Ebenen ober- und unterhalb des Fokus vermieden.

Das Mikroskop verfügt über eine akusto-optische Strahlenablenkung, die eine vergleichsweise hohe Abtastungsgeschwindigkeit des Lasers ermöglicht. Mit einer Bildfrequenzrate von 120 Bildern pro Sekunde erhält man also eine sehr hohe zeitliche Auflösung, die für die Beurteilung des Kalziumtransienten nativer Myozyten von Vorteil ist. Die digitalisierten Meßdaten wurden mit einem eigens für das Labor entwickelten Makro des Programms Objekt Image ausgewertet [75].

2.3.4 Versuchsablauf

Alle Versuche werden bei Raumtemperatur (23°C) durchgeführt, um den Verlust von Fluo-3-AM aus dem Intrazellularraum möglichst gering zu halten [76]. Die vorbereitete Versuchskammer wird mit zwei Elektroden sowie einem Zu- und einem Ablauf für Versuchspuffer versehen. Die Zellen werden mit Hilfe einer Rollerpumpe kontinuierlich mit Versuchspuffer (2 ml/min) umspült und durch elektrische Stimulation (Frequenz 1 Hz; Impulsdauer 5 ms; Spannung 4-8 mV) zur Kontraktion gebracht. Nun wird der Objektträger in den Strahlengang des Mikroskops eingebracht und fixiert. Zunächst betrachtet man die Zellen mit Hilfe konventioneller Lichtmikroskopie (Nicon Diaphot TDM Mikroskop), positioniert dann eine geeignete Zelle im Strahlengang des Lasers und koppelt das CLSM ein. Zur Beurteilung des Kalziumtransienten wird die relative Änderung der Fluo-3-AM Fluoreszenz (relative fluorescence unit, rfu) registriert und kontinuierlich auf einem Bildschirm angezeigt. Als Meßdaten werden Zyklen à 4 Sekunden (entspricht 4 Kontraktionen) aufgezeichnet und auf der Indy Workstation gespeichert. Nach Erhebung eines Ausgangswertes wird die Stabilität der Zelle nach 120 Sekunden überprüft und dann ADM (Konzentration 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9}) oder Kontrolle (Versuchspuffer) über den Zulauf gegeben. Um frühe und späte Effekte des Adrenomedullins zu erfassen, werden Messungen 1, 3, 6, 10, 15 und 20 Minuten nach Beginn der Adrenomedullin-Gabe durchgeführt. Als Positiv-Kontrolle werden Isoprenalin, Endothelin-1 und als Negativ-Kontrolle Verapamil verwendet.

2.3.5 Auswertung der Meßdaten

Die Auswertung der Meßdaten erfolgt mit Hilfe eines Macintosh® G3 (Apple Computer, Cupertino, CA, USA) und des Programms Object-Image 1.62. Die 120 Einzelbilder eines Kontraktionszyklus werden in y-Richtung linearisiert und zu einem Profilbild zusammengesetzt. Anschließend wird durch Elimination von „Ausreißern“ das Bild geglättet und durch Extraktion von eventuell vorhandenen Unschärfen eine weitere Verbesserung des Kontrastes erreicht. Es resultiert eine scharfe Abbildung des Kontraktionsablaufs der Zelle als Profilbild (siehe Abbildung 2.3, Schritte 1-3). In der darauffolgenden Auswertung werden zunächst die Zellgrenzen bestimmt, die Verkürzung der Zelle errechnet und beides in das Profilbild eingezeichnet. Die Intensitätswerte der Fluoreszenz werden in vertikaler Richtung summiert und ebenfalls graphisch dargestellt, sie entsprechen dem zeitlichen Verlauf der Kalziumverteilung (Abbildung 2.3 Schritt 4 und 5). Aus den entstandenen Kurven errechnet das Programm die „Kardinalpunkte“ von Kontraktion und Kalziumtransient (Maximalwert, Minimalwert, fünfzigprozentige Kontraktion und Relaxation). Die erhobenen Daten lassen die Berechnung

unterschiedlicher Parameter zu, in dieser Arbeit werden diastolischer und systolischer Kalziumwert, der Kalziumtransient (alles in rfu), sowie die absolute Zellverkürzung (in μm) verwendet. Der Auswertungsprozess ist in Abbildung 2.3 dargestellt.

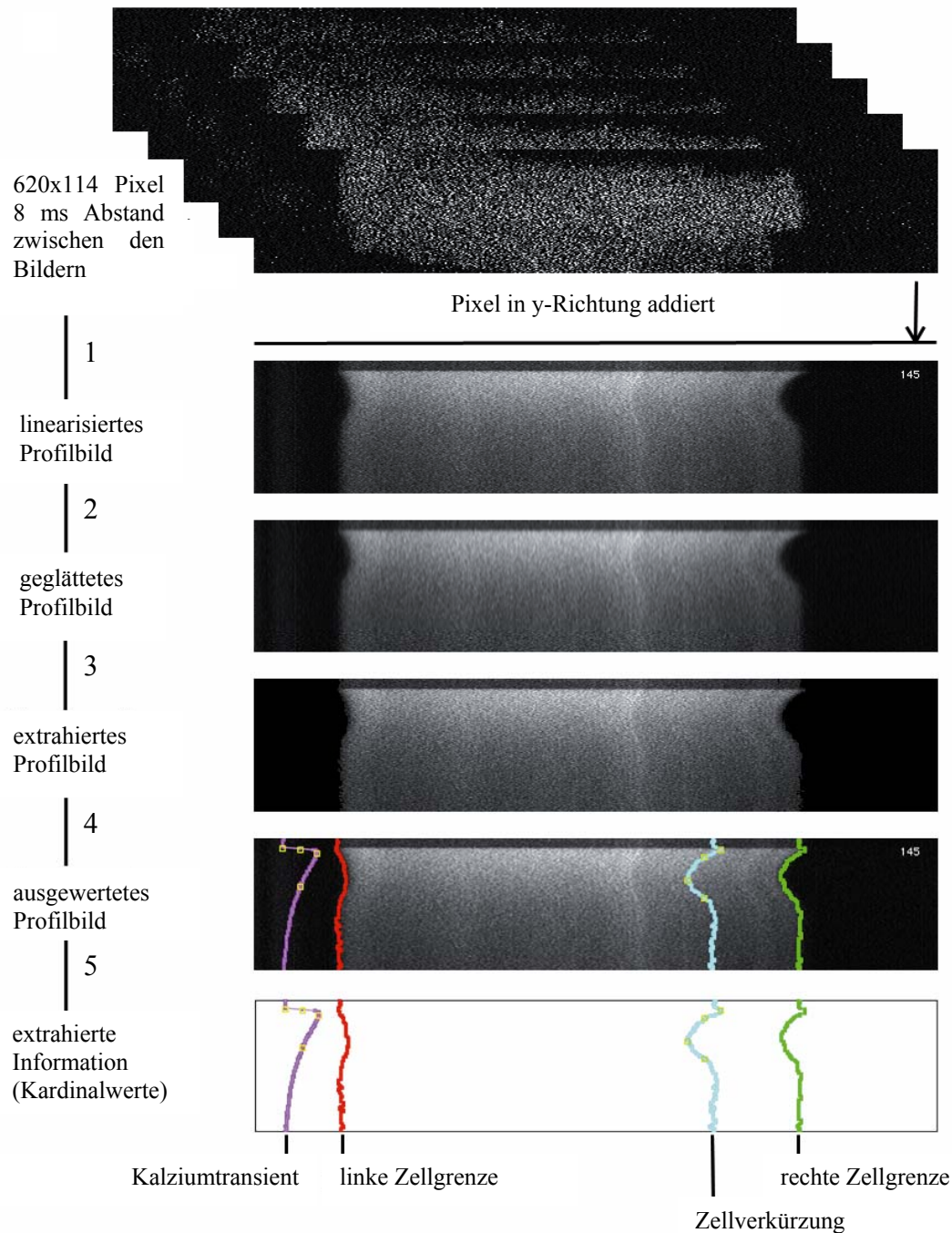


Abbildung 2.3:

Computergesteuerte Auswertung eines Kontraktionszyklus mit Hilfe des Programms Object Image: Die Einzelbilder werden in y-Richtung linearisiert und als Profilbild dargestellt (erster Schritt). Die „Kardinalpunkte“ der Auswertung sind als gelbe Quadrate eingezeichnet (untere zwei Abbildungen).

2.4 Das isoliert perfundierte Herz nach Langendorff

Die Langendorff-Apparatur ist eine bereits seit Ende des 19. Jahrhunderts verwendete und anerkannte Methode zum Studium der Physiologie des Herzens [77]. Sie wurde von zahlreichen Autoren verbessert und modifiziert [78, 79, 80], so daß sie heute als eine Standardmethode zur Erfassung von Mechanik, Koronarfluß und Stoffwechsel des Herzens unter verschiedensten Versuchsbedingungen gilt.

2.4.1 Präparation und Versuchsaufbau

Das Prinzip der Präparation, Kanülierung und retrograden Perfusion wurde bereits unter 2.3.1 beschrieben. Im Unterschied zur dort erwähnten Methode, bei der die enzymatische Isolation der Kardiomyozyten im Vordergrund stand, kommt es bei Messungen am isoliert perfundierten Herzen auf eine möglichst genaue Kontrolle und Dokumentation der physiologischen Parameter des Herzens wie beispielsweise des linksventrikulären Druckes oder des Koronarflusses an. Abbildung 2.4 zeigt eine schematische Darstellung des für diese Arbeit verwendeten Versuchsaufbaus.

Die Koronargefäße des Herzens werden retrograd über eine in der Aorta platzierte Kanüle mit Perfusionspuffer perfundiert (siehe Abschnitt 2.3.1), wobei der Versuchsaufbau zwei unterschiedliche Modi erlaubt: Bei geschlossenem Ventil (V in Abb. 2.4) kann der koronare Fluß mit Hilfe einer Pumpe (P in Abb. 2.4) exakt eingestellt werden, das Herz wird flußkonstant perfundiert. Ist das Ventil V geöffnet (P geschlossen) kann druckkonstant perfundiert werden.

Der koronare Fluß (KF) wird mit Hilfe eines Ultraschall Flußmessers (Transsonic, Fürstfeldbruck, Germany), der Perfusionsdruck (PD) über einen Druckaufnehmer an der Perfusionskanüle kontinuierlich registriert (in der Abbildung nicht dargestellt). Temperatur (T), pH-Wert und Sauerstoffpartialdruck (pO_2) werden über Durchflußelektroden (M in Abb. 2.4) ermittelt (Chemiware A/S, Dänemark).

Um Ventrikelfunktion und Kontraktionskraft des Herzens beurteilen zu können, wird der linke Vorhof punktiert, ein mit Perfusionspuffer gefüllter Ballonkatheter über die Mitralklappe in die linke Herzkammer eingebracht und auf einen enddiastolischen Druck zwischen 2,5 und 5 mmHg eingestellt (in der Abbildung nicht dargestellt). Mit Hilfe eines Druckaufnehmers kann so der linksventrikuläre Druck kontinuierlich aufgezeichnet werden. Durch elektronische Nachbearbeitung können so aus dem Verlauf der Druckkurve unter anderem Herzfrequenz und die minimale und maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit (dP/dt_{\min} , dP/dt_{\max}) ermittelt werden. Die Registrierung der physiologischen Parameter umfasst also PD, KF, Herzfrequenz, linksventrikulären Druck (LVP), maximale und minimale linksventrikuläre

Druckanstiegsgeschwindigkeit ($LVdP/dt_{max}$ und $LVdP/dt_{min}$), Temperatur, pO_2 und pH-Wert. Alle Parameter werden elektronisch gespeichert und auf einem Monitor kontinuierlich dargestellt.

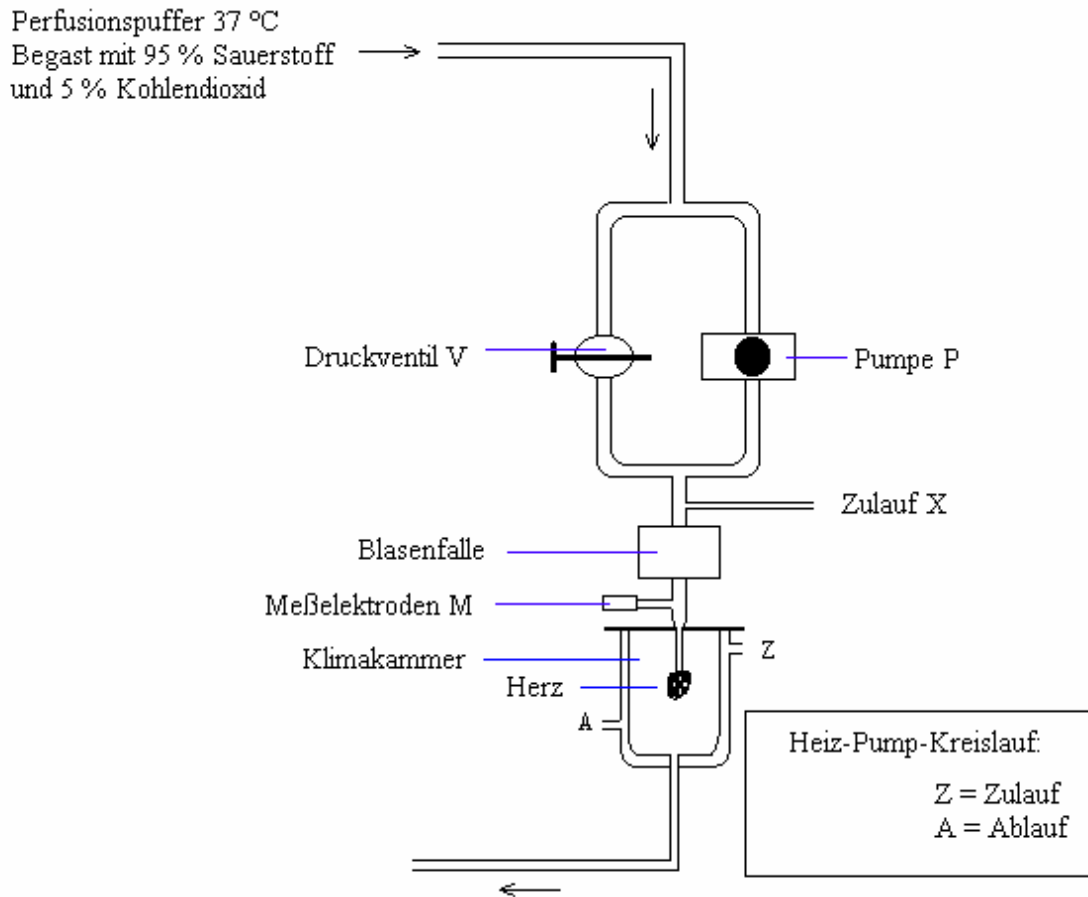


Abbildung 2.4: Schematische Zeichnung des für diese Arbeit verwendeten Versuchsaufbaus.

Mittels V und P lassen sich die Koronargefäße wahlweise Druck- oder Volumenkonstant perfundieren. Über M werden Temperatur, pO_2 und pH-Wert bestimmt. X ermöglicht die Zugabe von Substanzen oder Pharmaka mit Hilfe eines Perfusors. Heiz-Pump-Kreislauf vergleiche 2.3.1.

2.4.2 Versuchsablauf

Aus hämodynamischer Sicht ist der druckkonstanten Perfusion der Koronararterien der Vorzug zu geben [81]. Allerdings ist eine genaue Dosierung von zugegebenen Pharmaka nur bei gleichbleibendem Fluß möglich. Aus diesem Grund wird nach einer kurzen druckkonstanten Periode (80 cm H₂O) auf flußkonstante Perfusion umgestellt, wobei sich der Fluß nach dem zuvor gemessenen koronaren Fluß richtet (meistens zwischen 7-8 ml/min).

Nach Erreichen konstanter Ausgangsbedingungen wird ADM (Konzentration: 10^{-9} , 10^{-8}) oder Kontrolle (Versuchspuffer) mit Hilfe eines Perfusors (Precider; Infors AG, Basel) direkt in die Perfusionskanüle appliziert. Die Zugabe erfolgt konstant bis zum Ende des Experiments, das zugeführte Volumen entspricht maximal 1 % des Koronarflusses.

2.5 Papillarmuskel

2.5.1 Eigenschaften des Papillarmuskels

Das Papillarmuskelpräparat wird in der Herzphysiologie zur Untersuchung der passiven und aktiven Eigenschaften von Herzmuskelgewebe verwendet. Im Gegensatz zum komplexen Aufbau der Ventrikelwand liegen die Muskelfasern im Bereich des Papillarmuskels annähernd parallel und ermöglichen somit eine sehr gute Beurteilbarkeit der kontraktilen Parameter des Myokards [82, 83].

Der Muskel wird während des gesamten Versuchsablaufs von einer Nährlösung umspült und durch Diffusion mit Nährstoffen versorgt. Um die optimale Versorgung auch zentraler Anteile des Muskels zu gewährleisten stellt sich die Frage, welcher Präparatdurchmesser zur Vermeidung von Nekrosen nicht überschritten werden sollte. In der Literatur finden sich hierzu unterschiedliche Angaben. Cranefield und Greenspan [84] sehen eine ausreichende Versorgung bei einem Durchmesser von kleiner als 0,64 mm gewährleistet, während Blinks und Koch-Weser [85] eine Obergrenze von 1,1 mm angeben. Gülch und Ebrecht [86] beobachten eine Zunahme der Spannungsentwicklung mit kleiner werdendem Durchmesser bis 0,3 mm. Allgemein läßt sich sagen, daß man bei abnehmendem Durchmesser eine bessere Versorgung des Präparats mit Nährstoffen erreicht, allerdings sowohl Präparation als auch Handhabung erschwert werden. Viele Untersucher gehen deswegen einen Kompromiß zwischen optimaler Versorgung und Praktikabilität bei der Versuchsdurchführung ein. Präparate mit einem Durchmesser bis 0,8 mm gelten als ausreichend, wenn durch Absenken von Versuchstemperatur und Reizfrequenz der Energieverbrauch des Papillarmuskels reduziert wird [82, 87, 88].

Neben dem geeigneten Durchmesser sollte bei der Präparation auch auf eine ausreichende Länge des Präparates geachtet werden. Durch Dissektion und Befestigung des Muskels in der Versuchsapparatur kommt es unweigerlich zu einer Traumatisierung der Muskelenden, welche sich mit steigender Länge weniger nachteilig auswirkt [86, 89].

Die für diese Arbeit verwendeten Präparate wiesen eine Länge von $3,70 \pm 0,50$ mm und einen Durchmesser von $0,37 \pm 0,12$ mm auf.

2.5.2 Präparation und Versuchsaufbau

Das Herz wird analog zur Beschreibung in Abschnitt 2.3.1 entnommen und durch Kanülierung der Aorta retrograd mit begastem Versuchspuffer (95% O₂; 5% CO₂) perfundiert. Nach fünf Minuten wird die Lösung durch Präparationspuffer (entspricht Versuchspuffer mit Zusatz von 20 mM Butanedion Monoxim, vgl. Tab. 2.1) ersetzt und für weitere 10 Minuten perfundiert. Butanedion Monoxim (BDM) inhibiert den Brückenmechanismus zwischen Aktin- und Myosinfilamenten in Muskelgewebe. In Konzentrationen oberhalb von 5 mM führt es zusätzlich zu einer Abnahme des Ca²⁺-Einstroms in die Zelle (elektromechanischen Entkopplung) [90]. Es resultiert ein Herzstillstand. Dies bietet zwei Vorteile, zum einen ist eine saubere Präparation am schlagenden Herzen sehr schwierig, zum zweiten werden durch die Senkung des Sauerstoffverbrauchs und der Stoffwechselaktivität die Schäden durch Traumatisierung des Muskelgewebes vermindert.

Nachdem das Herz seine Aktivität eingestellt hat, erfolgt die weitere Präparation auf einer mit Präparationspuffer gefüllten und mit Carbogen (95% O₂; 5% CO₂) begasteten Petrischale mit Silikonboden. Das Herz wird mit Hilfe dünner Nadeln fixiert und die Vorhöfe werden abgetrennt. Danach wird die linke Herzkammer eröffnet und die Papillarmuskeln werden in ihrem Verlauf dargestellt. Da ein kompletter Papillarmuskel den geforderten Durchmesser von kleiner 0,8 mm weit überschreitet, wird er mit Hilfe einer Mikroschere längs geschnitten, so daß man ein ausreichend dünnes Stück erhält.

Mit Hilfe von zwei Mikroklemmen wird das gewonnene Präparat der Länge nach in die Versuchskammer eingespannt. Abbildung 2.5 zeigt eine schematische Zeichnung des für diese Arbeit verwendeten Aufbaus. Auf der linken Seite befindet sich eine Stellschraube, mit der der Abstand zwischen beiden Klemmen verändert und somit die Vordehnung des Muskels reguliert werden kann. Auf der rechten Seite befindet sich ein Kraftaufnehmer für die Registrierung der Kontraktionsparameter. Nachdem das Präparat eingespannt worden ist, läßt sich die Versuchskammer mit Hilfe eines verschiebbaren Glaskolbens verschließen, so daß der Papillarmuskel kontinuierlich mit Versuchspuffer (Fluß: 1 ml/min) umspült wird.

Die Kraftentwicklung von Herzmuskelgewebe ist direkt abhängig von der Vordehnung L (Frank-Starling-Mechanismus). Dies beruht zum einen auf Überlappungsphänomenen der Aktin- und Myosin-Filamente, zum zweiten auf einer Erhöhung der Kalziumempfindlichkeit der kontraktilen Strukturen [91]. Vor Beginn der Versuche wird der Papillarmuskel zunächst für 45 Minuten bei niedriger Vordehnung mit Versuchspuffer umspült und so das Butanedion Monoxim (BDM) aus dem Muskelgewebe entfernt. Danach wird über 20 Minuten die Vordehnung (L) langsam gesteigert bis der Muskel seine maximale Kraftentwicklung (L_{\max}) zeigt und dann auf

50% dieser Länge eingestellt. Es folgt eine Äquilibrierungsphase von mindestens 30 Minuten, bis alle kontraktile Parameter konstant sind.

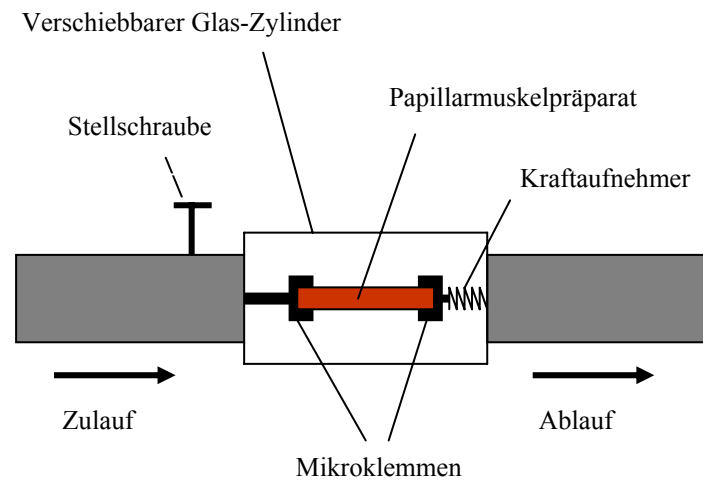


Abbildung 2.5:

Schematische Darstellung der Versuchskammer. Der Versuchspuffer wurde zuvor mit Carbogen (95 % O₂, 5 % CO₂) begast und während des gesamten Versuchsablauf auf eine konstante Temperatur von 28°C eingestellt. Der Durchmesser des Glas-Zylinders beträgt 45 mm, die Flußgeschwindigkeit 1 ml/min. Die elektrische Stimulation erfolgt über eine an der linken Klemme angebrachte Elektrode (biphasischer Rechtecksimpuls, 5ms, 5V).

2.5.3 Versuchsablauf

Alle Versuche werden mit einer Stimulationsfrequenz von 30 Impulsen pro Minute durchgeführt. Die Messung der kontraktile Parameter erfolgt über einen Kraftaufnehmer (Muscle Research System, Scientific Instruments, Heidelberg), der den zeitlichen Verlauf der Spannungsentwicklung am Papillarmuskel registriert und elektronisch verarbeitet. Es werden Vordehnung (L), maximale Kraftentwicklung (F_{max}), maximale Kraftanstiegs- und Kraftabfallgeschwindigkeit (dT/dt_{max}, dT/dt_{min}), sowie die Zeitspanne bis zur maximalen Kraftentwicklung (TpT) und zur 50 % Relaxation (RT₅₀) berechnet und kontinuierlich auf einem Monitor dargestellt.

Die Präparate werden randomisiert einer der folgenden Gruppen zugeordnet:

Gruppe 1: Kontrollen (n=6)

Der Papillarmuskel wird über 2 Stunden kontinuierlich stimuliert, um den zeitlichen Verlauf der kontraktile Parameter zu dokumentieren.

Danach wird Isoprenalin in steigender Dosis zugegeben:

Dosissteigerung alle 5 min (0,1 nM; 1 nM; 10 nM; 100 nM; 1 μ M; 10 μ M).

Gruppe 2: Adrenomedullin (n=6)

Stimulation unter Zugabe von Adrenomedullin in ansteigender Dosierung.

Dosissteigerung alle 40 Minuten (0,1 nM; 1 nM; 10 nM).

Danach Dosis-Wirkungskurve für Isoprenalin (siehe Gruppe 1).

Gruppe 3: Adrenomedullin und L-NOARG (n=6)

Kontinuierliche Gabe von 100 μ M L-NOARG über den gesamten Versuchsablauf.

Versuchsablauf entsprechend der Gruppe 2.

Gruppe 4: L-NOARG (n=6)

Kontinuierliche Zugabe von 100 μ M L-NOARG über den gesamten Versuchsablauf.

Versuchsablauf entsprechend der Gruppe 1.

Gruppe 5: Endothelin-1 (n=6)

Stimulation unter Zugabe von Endothelin-1 in ansteigender Dosierung.

Dosiserhöhung alle 40 Minuten um den Faktor 10 (0,1 nM; 1 nM; 10 nM).

Danach Dosis-Wirkungskurve für Isoprenalin (siehe Gruppe 1).

2.6 Statistische Auswertung

Alle Daten sind, wenn nicht anders vermerkt, als Mittelwert \pm Standardfehler angegeben. Für die Auswertung wurde die Statistik-Software SPSS verwendet. Die Signifikanztestung erfolgte mit Oneway ANOVA, alle Werte von $p < 0,05$ wurden als signifikant gewertet.

3 Ergebnisse

3.1 Stimulierte adulte Kardiomyozyten

Die Isolation der Rattenkardiomyozyten erbrachte im Mittel eine Zellausbeute von $1,5 \times 10^6$ Zellen pro Herz. Dabei lag der Anteil der für die Messung geeigneten, also nicht abgerundeten oder verformten, Zellen bei 20-35 %.

Unter Stimulation erreichten die Kardiomyozyten basal eine Kontraktionsamplitude von $7,3 \pm 0,4$ % (Mittelwert \pm Standardabweichung). Die Fluo-3-AM Fluoreszenz stieg im Mittel von $23,1 \pm 1,9$ diastolisch auf $59,1 \pm 5,4$ rfu systolisch an.

Die Effekte von ADM wurden gemessen, sobald stabile Ausgangsbedingungen erreicht waren. Als stabil wurden Zellen angesehen, die über einen Kontrollzeitraum von zwei Minuten keine Änderungen des diastolischen Fluoreszenzwertes und des Kalziumtransienten aufwiesen.

Danach wurden die Kardiomyozyten 20 Minuten mit ADM-Lösung umspült, Meßdaten wurden 1, 3, 5, 10, 15 und 20 Minuten nach Start der Perfusion an ein und der selben Zelle erhoben. ADM wurde in den Konzentrationen 1, 10, 100 nM getestet.

3.1.1 Die Wirkung von ADM auf die Zellverkürzung

ADM hatte keinen statistisch signifikanten Einfluß auf die Kontraktion der Zelle im Vergleich zur Kontrollgruppe ($p > 0,05$). In Abbildung 3.1. ist die Zellverkürzung in Abhängigkeit von der ADM-Konzentration graphisch dargestellt. Tabelle 3.1 fasst die Ergebnisse zusammen. Die angegebenen Werte beziehen sich auf die prozentuale Verkürzung der Zelle im Vergleich zum Ausgangswert.

Tabelle 3.1: Wirkung von ADM auf die Zellverkürzung in Prozent vom Ausgangswert.

	1 min	3 min	6 min	10 min	15 min	20 min
ADM (100 nM)	100,4 \pm 0,6	100,0 \pm 0,6	99,6 \pm 0,4	100,3 \pm 0,5	99,8 \pm 0,7	101,1 \pm 0,4
ADM (10 nM)	99,6 \pm 0,5	100,0 \pm 1,7	100,3 \pm 0,2	100,5 \pm 0,9	101,1 \pm 0,4	100,5 \pm 2,1
ADM (1 nM)	100,8 \pm 0,8	100,6 \pm 0,1	100,5 \pm 0,3	100,0 \pm 0,4	100,4 \pm 0,6	100,0 \pm 0,1
Kontrolle	98,8 \pm 0,7	99,7 \pm 0,4	100,5 \pm 0,4	101,3 \pm 0,1	101,4 \pm 0,5	101,5 \pm 1,2

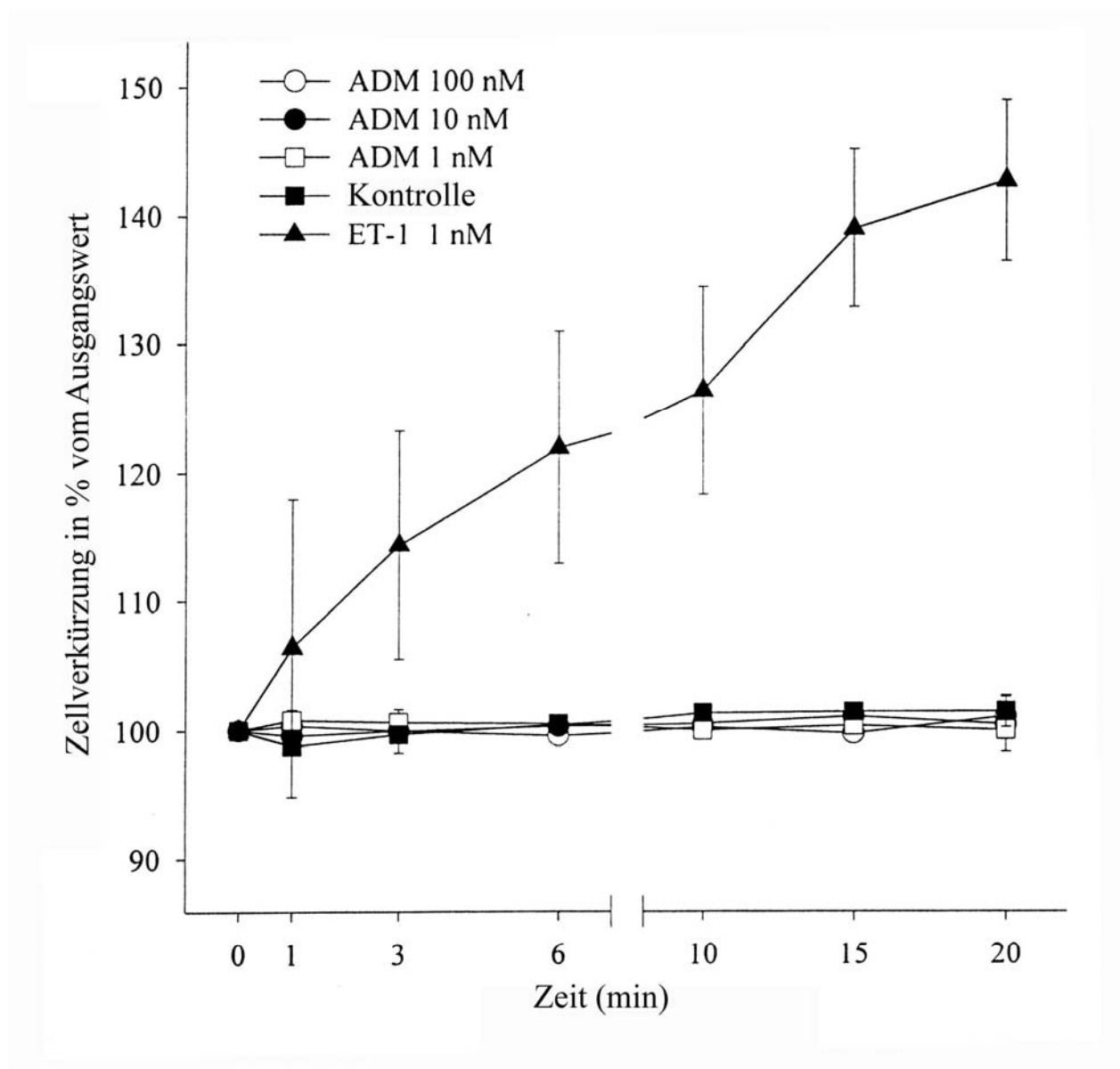


Abbildung 3.1:

Wirkung von ADM auf die Zellverkürzung. Daten sind als Mittelwert \pm Standardfehler (SEM) von 6 Experimenten pro Gruppe angegeben. Endothelin wurde mit 3 Experimenten als Positivkontrolle verwendet.

Endothelin-1 wurde als Positivkontrolle (1 nM) verwendet, da es, wie auch für ADM beschrieben, eine langsam einsetzende positiv inotrope Wirkung auf Kardiomyozyten hat [92]. Endothelin-1 verursachte einen deutlichen Anstieg der systolischen Zellverkürzung der Zellen.

3.1.2 Die Wirkung von ADM auf den Kalziumtransienten

Die zytosolische Kalziumkonzentration wurde in rfu (relative fluorescence units) bestimmt. Dabei entspricht der Kalziumtransient der Differenz zwischen systolischem und diastolischem rfu-Wert.

Steigende Konzentrationen von ADM hatten keinen statistisch signifikanten Einfluß auf den Kalziumtransienten der Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe ($p > 0,05$). Im Gegensatz dazu, verursachten Endothelin-1 einen deutlichen Anstieg auf $122,0 \pm 5,1\%$. Tabelle 3.3. fasst die gemessenen Werte zusammen, in Abbildung 3.2 ist die Abhängigkeit des Kalziumtransienten der Kardiomyozyten von der Adrenomedullin Konzentration noch mal graphisch dargestellt.

Da der Kalziumtransient nur eine relative Änderung der rfu-Werte von Fluo-3-AM erfasst, sind in Tabelle 3.2 die Abhängigkeit des diastolischen Kalziumgehalts von steigenden ADM-Konzentrationen zusammengefasst. Auch hier konnte kein statistisch signifikanter Einfluß nachgewiesen werden.

Tabelle 3.2:

Wirkung von Adrenomedullin auf den diastolischen Kalziumgehalt der Zellen in Prozent vom Ausgangswert unter Ruhebedingungen; Werte sind als Mittelwert \pm SEM angegeben; n= Anzahl der Experimente.

	1 min	3 min	6 min	10 min	15 min	20 min
ADM 100nM n= 6	102,4 \pm 0,6	104,5 \pm 0,9	103,4 \pm 1,6	97,2 \pm 2,6	97,0 \pm 2,7	97,0 \pm 2,9
ADM 10 nM n=6	103,7 \pm 1,5	100,6 \pm 2,4	103,1 \pm 1,6	100,9 \pm 1,8	102,7 \pm 2,2	103,0 \pm 2,8
ADM 1nM n=6	100,2 \pm 0,7	102,6 \pm 2,0	101,0 \pm 0,9	100,8 \pm 2,2	105,2 \pm 2,7	100,1 \pm 2,6
Kontrolle n=6	99,7 \pm 1,3	102,7 \pm 1,7	102,8 \pm 2,5	103,7 \pm 2,0	105,8 \pm 3,2	101,6 \pm 2,9

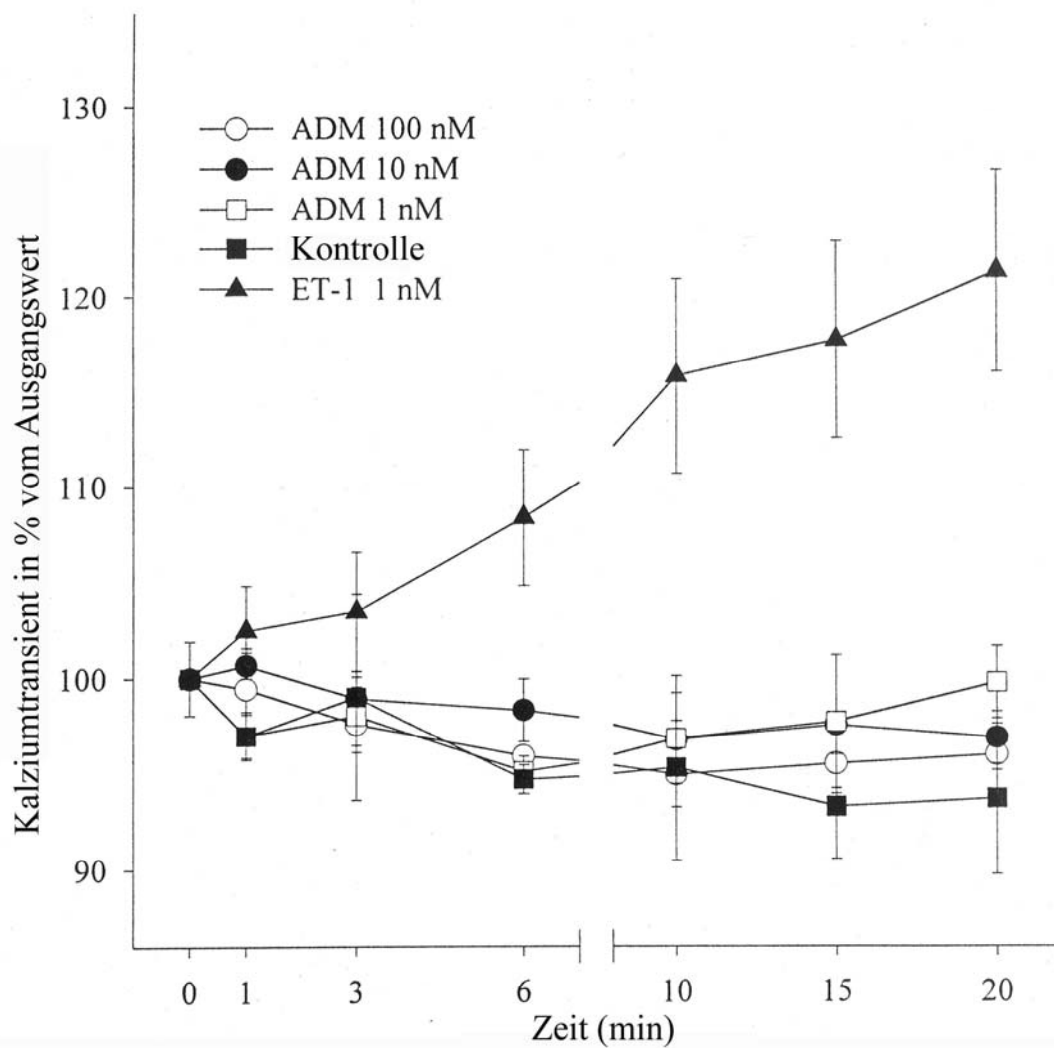


Abbildung 3.2: Prozentuale Veränderung des Kalziumtransienten (Fluo-3-AM Fluoreszenz) im Vergleich zum Ausgangswert. Daten sind als Mittelwert \pm SEM von 6 Experimenten pro Gruppe angegeben. Endothelin wurde mit 3 Experimenten als Positivkontrolle verwendet.

Tabelle 3.3: Die Wirkung von Adrenomedullin auf den Kalziumtransienten in Prozent vom Ausgangswert unter Ruhebedingungen. Mittelwert \pm SEM.

	1 min	3 min	6 min	10 min	15 min	20 min
ADM 100 nM	99,5 \pm 2,2	97,6 \pm 1,5	95,9 \pm 0,4	94,9 \pm 1,7	95,5 \pm 1,6	96,0 \pm 0,8
ADM 10 nM	100,7 \pm 0,7	99,0 \pm 1,1	98,3 \pm 1,7	96,8 \pm 1,0	97,5 \pm 0,1	96,9 \pm 1,4
ADM 1nM	97,0 \pm 1,3	98,0 \pm 1,6	95,1 \pm 0,8	96,8 \pm 2,4	97,7 \pm 3,5	99,7 \pm 1,9
Kontrolle	97,0 \pm 1,1	99,0 \pm 5,4	94,7 \pm 0,7	95,3 \pm 4,8	93,3 \pm 2,7	93,7 \pm 3,9

3.2 Isoliert perfundiertes Herz nach Langendorff

Während des gesamten Versuchsablauf wurden die Herzen flußkonstant perfundiert. Die kontraktile Parameter, Herzfrequenz und koronarer Perfusionsdruck (PD) waren zu Beginn der Messungen in beiden Gruppen gleich (siehe Tabelle 3.4).

Adrenomedullin wurde in zwei unterschiedlichen Konzentrationen (1 und 10 nM) appliziert und führte zu einem Abfall des koronaren Perfusionsdrucks um 28 bzw. 50 %. Bei flußkonstanter Perfusion entspricht dies einer Vasodilatation der Koronararterien [91]. Die Wirkung trat innerhalb von Sekunden ein und erreichte ihr Maximum nach 15 bis 20 Minuten. In Abbildung 3.3 ist die Wirkung von Adrenomedullin auf den PD im Vergleich zur Kontrollgruppe dargestellt. In der Kontrollgruppe trat keine signifikante Änderung des PD über den Versuchszeitraum auf.

Parallel zum Verlauf des PD verringerte sich der linksventrikuläre Druck (siehe Abbildung 3.4). Da eine Abnahme des koronaren Perfusionsdrucks am isoliert präparierten Herzen normalerweise mit einer Abnahme der linksventrikulären kontraktile Parameter einhergeht (Gregg Phänomen) [93], ist eine Beurteilung des Effekts von Adrenomedullin auf die kontraktile Parameter unter diesen Voraussetzungen nicht möglich.

Tabelle 3.4: Kontraktile Parameter, koronarer Perfusionsdruck und Herzfrequenz zu Beginn der Messung. LVP = linksventrikulärer Druck; LVP dP/dt_{max} = maximale linksventrikuläre Druckerhöhungsgeschwindigkeit; PD = koronarer Perfusionsdruck; n = Anzahl der Experimente.

	PD in cm H ₂ O	LVP	LVP dP/dt_{max}	Herzfrequenz
ADM 1nM (n = 9)	79 ± 3	80 ± 6	3294 ± 243	311 ± 10
ADM 10 nM (n = 7)	84 ± 2	78 ± 5	3149 ± 138	304 ± 9

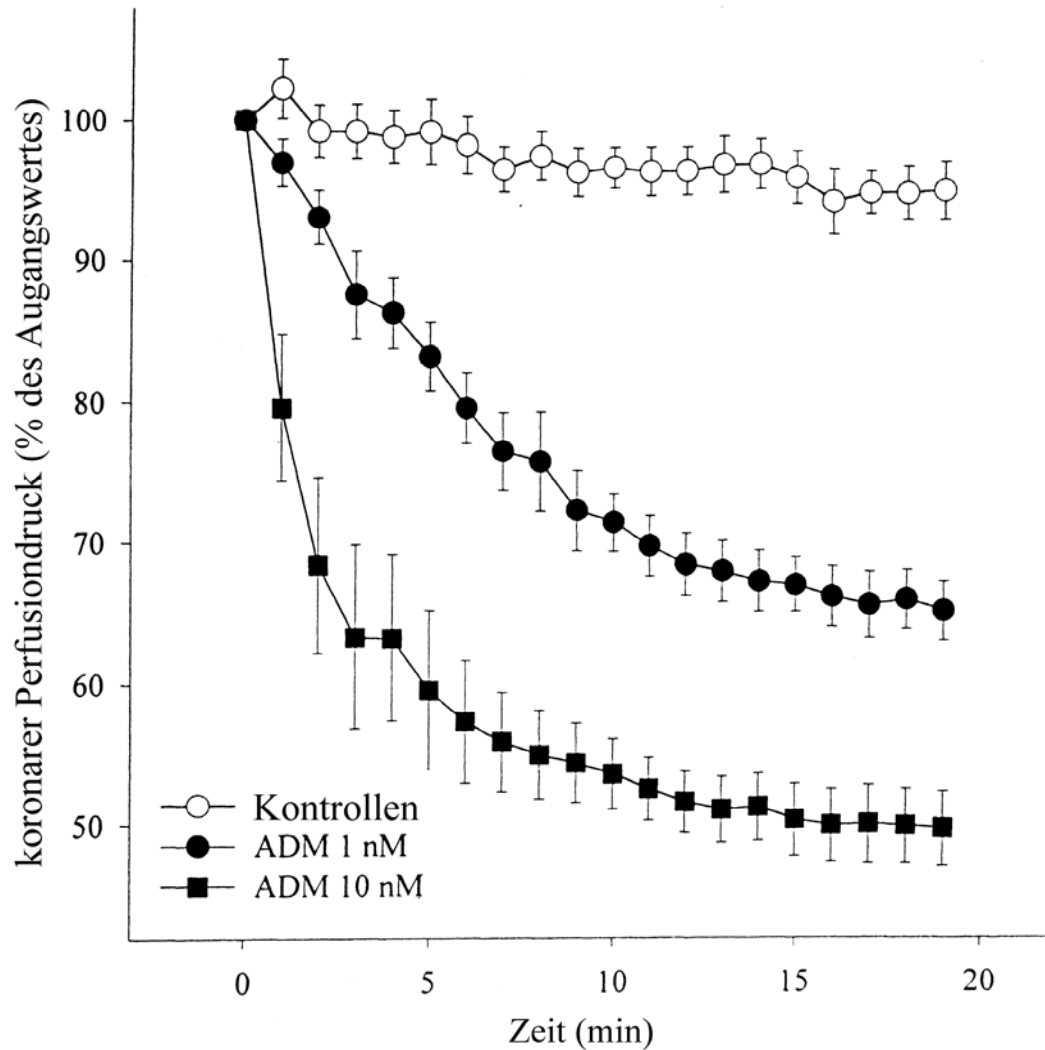


Abbildung 3.3:

Wirkung von Adrenomedullin auf den koronaren Perfusionsdruck (PD) an isolierten, adulten Rattenherzen. Dargestellt ist die prozentuale Veränderung des PD im Vergleich zum Ausgangswert. Die Herzen wurde mit einem konstanten Fluß von $7,3 \pm 0,3$ ml/min über einen Zeitraum von 20 min perfundiert. Die Werte sind als Mittelwert \pm SEM angegeben.

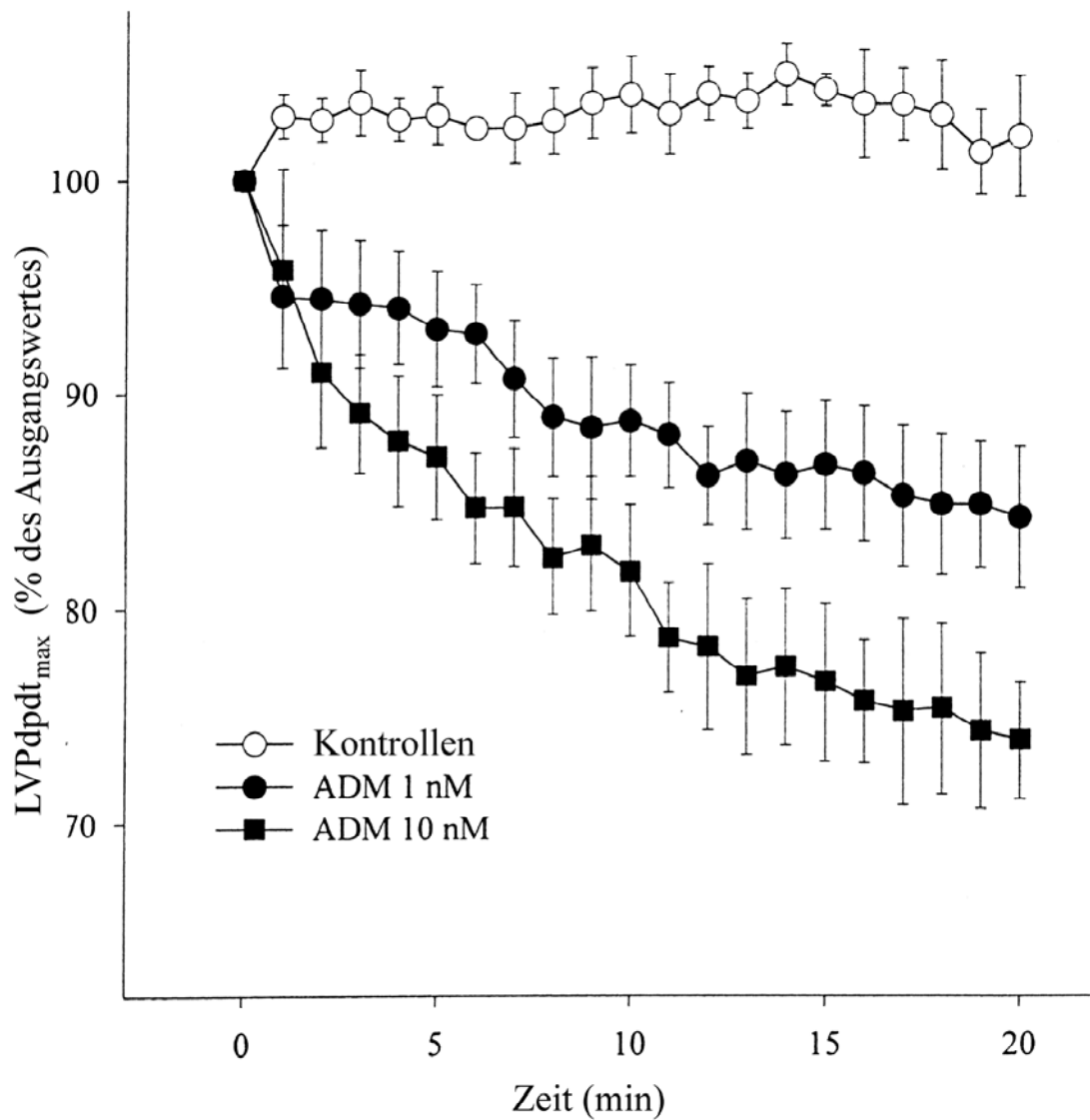


Abbildung 3.4:

Verlauf der linksventrikulären Druckanstiegsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der Adrenomedullin Konzentration. Dargestellt ist die prozentuale Veränderung im Vergleich zum Ausgangswert. Die Werte sind als Mittelwert \pm SEM angegeben.

3.3 Papillarmuskel

Die Versuche wurden nach Erreichen konstanter Ausgangsbedingungen begonnen. Tabelle 3.5 zeigt, daß die kontraktile Parameter der einzelnen Gruppen zu Beginn der Messungen vergleichbar waren. Adrenomedullin wurde in steigender Dosierung von 0,1 nM, 1 nM und 10 nM mit jeweils 40 Minuten Abstand zugegeben und zeigte keinen Einfluß auf die Kraftentwicklung des Papillarmuskels. Da für ADM eine NO vermittelte negativ inotrope Wirkung auf isolierte Kardiomyozyten des Kaninchens beschrieben wurde, untersuchten wir in einer weiteren Versuchsreihe die Wirkung einer gleichzeitige Gabe des NOS Inhibitors L-NOARG in einer Konzentration von 100 µM und Adrenomedullin [66]. Es zeigte sich ebenfalls keine signifikante Änderung der kontraktile Parameter. In Abbildung 3.5 ist die prozentuale Veränderung der maximal erreichten Kraftentwicklung des Papillarmuskels (F_{\max}) im Vergleich zum Ausgangswert dargestellt.

Tabelle 3.5: Kontraktile Parameter zu Beginn der Messungen. Die Werte sind als Mittelwert \pm SEM von sechs Experimenten pro Gruppe angegeben.

	F_{\max} (mN/mm ²)	dT/dt_{\max} (mN/mm ² /s)	dT/dt_{\min} (mN/mm ² /s)	TpT (ms)	RT ₅₀ (ms)
Kontrolle	40 \pm 2	866 \pm 43	501 \pm 25	75 \pm 3	40 \pm 2
ADM	41 \pm 3	853 \pm 32	510 \pm 20	74 \pm 3	42 \pm 3
L-NOARG	38 \pm 2	826 \pm 45	485 \pm 29	75 \pm 5	43 \pm 3
ADM+L-NOARG	39 \pm 1	847 \pm 50	490 \pm 25	76 \pm 4	41 \pm 1
Endothelin-1	42 \pm 3	856 \pm 53	499 \pm 21	75 \pm 4	41 \pm 2

Endothelin-1, das analog zu den Versuchen am isolierten Kardiomyozyten als Positivkontrolle verwendet wurde, verursachte in den Konzentrationen 1 nM und 10 nM einen signifikanten Anstieg von F_{\max} auf 161 \pm 10% und 227 \pm 9% im Vergleich zum Ausgangswert (siehe Abbildung 3.5.). Die maximale Kraftanstiegsgeschwindigkeit stieg auf 165 \pm 10% und 215 \pm 11%, die minimale Kraftanstiegsgeschwindigkeit erreichte Werte von 119 \pm 4% und 153 \pm 8%. Zusätzlich dazu stieg die Zeitspanne bis zur 50 % Relaxation (RT₅₀) auf 135 \pm 8% und 167 \pm 7%. Ein Einfluß auf die Zeitspanne bis zu maximalen Kraftentwicklung (TpT) konnte nur in der höchsten Endothelin-1 Konzentration nachgewiesen werden, sie sank auf 89 \pm 2% des Ausgangswerts. Tabelle 3.6 zeigt die gemessenen Werte.

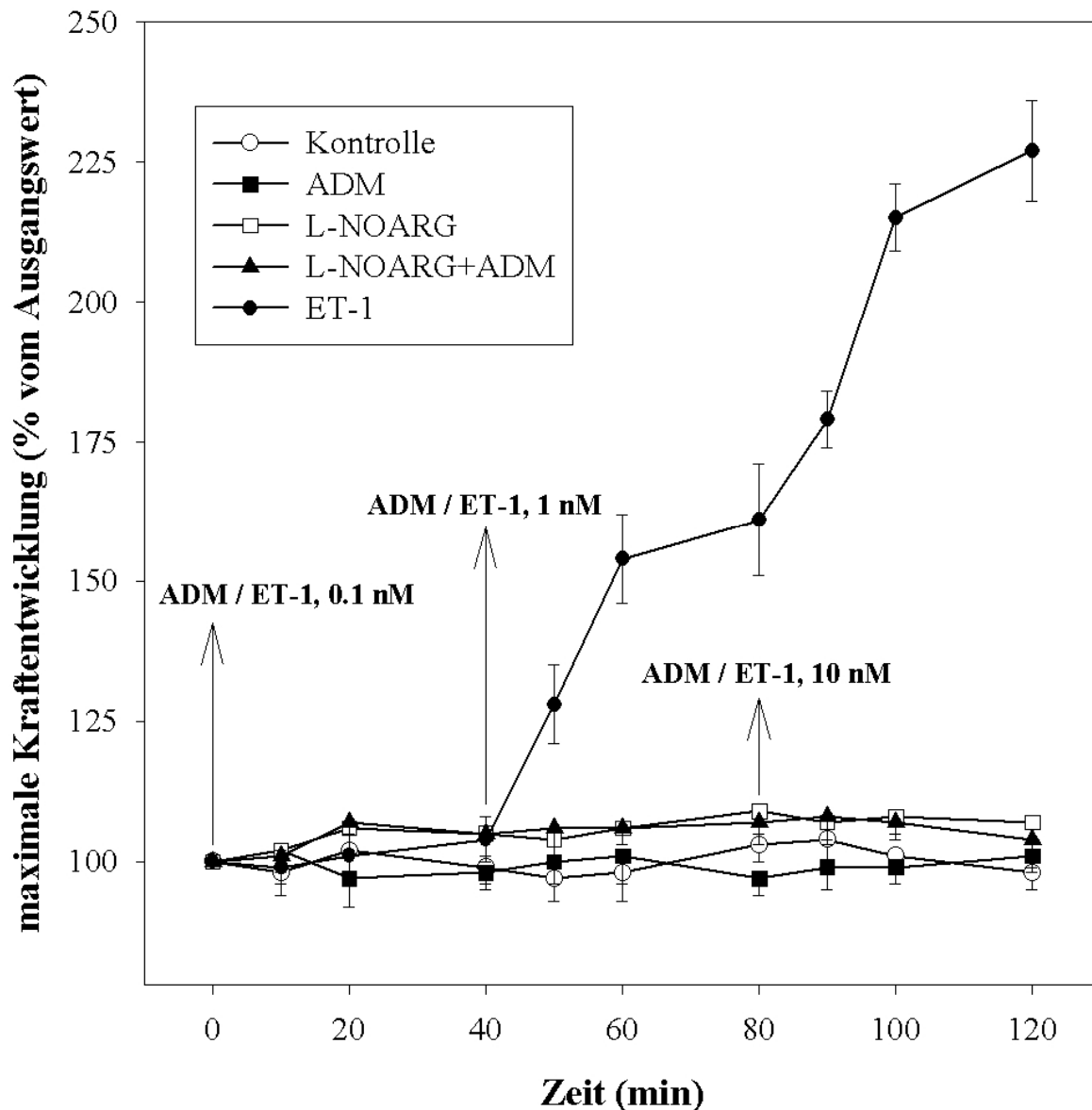


Abbildung 3.5: Dargestellt ist die Wirkung der einzelnen Substanzen auf die maximale Kraftentwicklung des Papillarmuskels (F_{\max}). Die Konzentrationen von ADM und Endothelin-1 wurden in Abständen von jeweils 40 Minuten von 0,1 nM über 1 nM auf 10 nM angehoben.

Tabelle 3.6: Die Wirkung von Endothelin-1 auf die kontraktile Parameter des Papillarmuskels.

Endothelin-1 Konzentration	F_{\max} (mN/mm ²)	dT/dt_{\max} (mN/mm ² /s)	dT/dt_{\min} (mN/mm ² /s)	RT ₅₀ (ms)
1 nM	161 ± 10%	165 ± 10%	119 ± 4%	135 ± 8%
10 nM	227 ± 9%	215 ± 11%	153 ± 8%	167 ± 7

Am Ende der Experimente wurde die erhaltene Empfindlichkeit des Papillarmuskels auf positiv inotrope Substanzen durch die Gabe steigender Konzentrationen von Isoprenalin getestet. Die Isoprenalin-Konzentration wurde in 5-minütigen Abständen von 10^{-10} M bis auf eine Endkonzentration von 10^{-5} M angehoben. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede der maximal erreichten Kraftentwicklung zwischen den einzelnen Gruppen. Abbildung 3.6 stellt die prozentuale Veränderung von F_{\max} im Vergleich zum Ausgangswert in Abhängigkeit der Isoprenalin Konzentration dar.

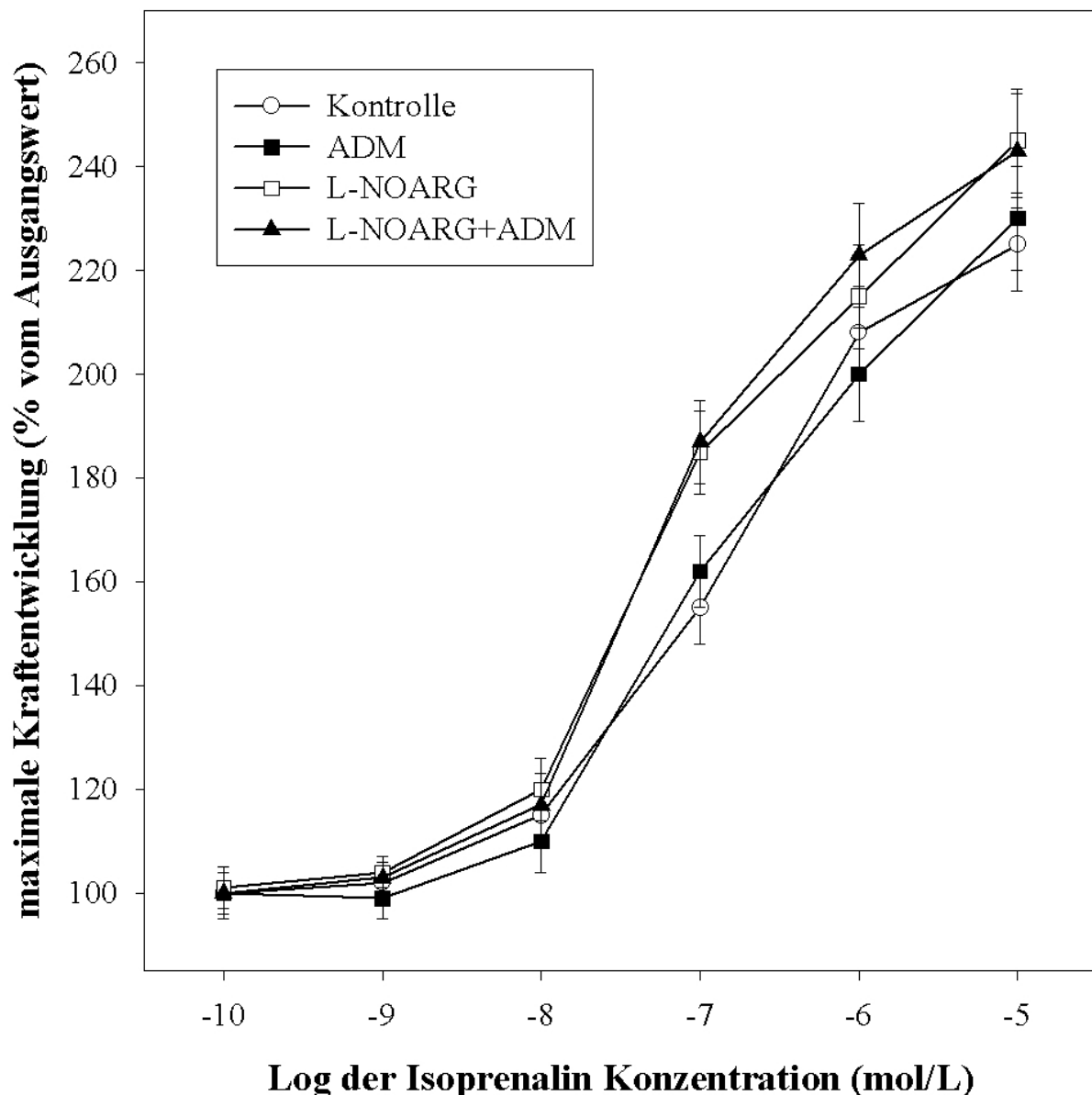


Abbildung 3.6: Abschließende Testung der Ansprechbarkeit des Papillarmuskels auf Isoprenalin in steigenden Dosierungen. Die Isoprenalin-Konzentration wurde alle 5 Minuten um den Faktor 10 erhöht. Ausgangsdosis war 10^{-10} M.

4 Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Wirkung von Adrenomedullin auf die Kontraktilität des Rattenherzens zu untersuchen. Die Ergebnisse zeigen erstmals in drei unterschiedlichen physiologischen Meßsystemen, daß ADM keinen Einfluß auf die kontraktile Parameter des Rattenherzens hat.

Am isoliert perfundierten Herz nach Langendorff verursachte die intrakoronare Applikation von Adrenomedullin einen relativ rasch einsetzenden, langandauernden Abfall des koronaren Perfusionsdrucks und bestätigte so die biologische Wirksamkeit des Peptids. Dieser vasodilatative Effekt ging mit einer Abnahme der kontraktile Parameter des linken Ventrikels einher. Da eine Reduktion des koronaren Perfusionsdrucks am isolierten, flußkonstant perfundierten Herzen normalerweise mit einer Abnahme der kontraktile Parameter einhergeht (Gregg Phänomen) [93], ist eine Beurteilung des Effektes von ADM auf die Kontraktilität unter diesen Voraussetzungen nicht möglich. Es zeigte sich jedoch keine von der koronaren Perfusion unabhängige Wirkung von ADM auf die Kontraktilität.

Am isolierten Papillarmuskelpräparat hatte weder die Gabe von ADM allein, noch die gleichzeitige Applikation von ADM und L-NOARG, einem spezifischen NOS-Inhibitor, einen Einfluß auf die erhobenen Parameter. Endothelin-1 und Isoprenalin wurden als Positivkontrollen verwandt und führten zu einer deutlichen Zunahme der Kontraktilität.

Neben der Registrierung von kontraktile Parametern ermöglicht der Farbstoff Fluo-3-AM in adulten Kardiomyozyten die Beurteilung des zeitlichen Verlaufs der zytosolischen Kalziumkonzentration. Dieser ist eng mit dem Kontraktionszyklus der Myozyten verbunden, da Kalzium als Schlüsselion der myokardialen Kontraktilität gilt [91]. ADM zeigte in den in dieser Arbeit verwendeten Konzentrationen weder einen Einfluß auf die zytosolischen Kalziumkonzentration, noch auf die gleichzeitig registrierte Zellverkürzung.

4.1 Beurteilung der eigenen Ergebnisse

Um die Ergebnisse einer Versuchsreihe richtig zu beurteilen, ist es zwingend erforderlich die Limitationen der verwendeten Methoden in Betracht zu ziehen. In dieser Arbeit wurden sowohl langjährig etablierte Verfahren, wie das isoliert perfundierte Herz nach Langendorff, als auch relativ neue Verfahren, wie die konfokale Laserscan Mikroskopie mit gleichzeitiger Registrierung der zellulären Kalziumkonzentration und der Zellverkürzung, verwendet. Dies geschah unter der Vorstellung, durch unterschiedliche methodische Ansätze die Schwachstellen der einzelnen Methoden, soweit möglich, auszugleichen.

Isoliert perfundiertes Herz

Das isoliert perfundierte Herz nach Langendorff ist eine seit über hundert Jahren verwendete Methode in der Erforschung der Physiologie des Herzens. Es ist ein für Myokard und Herzmuskelzellen vergleichsweise schonendes Verfahren, da sowohl mechanische als auch enzymatische Isolationsverfahren entfallen, wie sie beispielsweise in den beiden anderen in dieser Arbeit verwendeten Methoden zu Anwendung kommen. Die Zellen verbleiben in ihrem ursprünglichen Gewebeverband, das Organ bleibt in seiner Struktur erhalten. Für die Beurteilung der Kontraktilität bringt dies jedoch auch einige Nachteile mit sich. So kann die biologische Wirkung einer Substanz auf mehreren unterschiedlichen Wegen vermittelt sein. Da in einem Gewebeverband stets unterschiedliche Zellen vorkommen, beim Herz beispielsweise neben Kardiomyozyten auch Fibroblasten und Gefäßendothelzellen, können unterschiedliche Effektoren für die Wirkung verantwortlich sein. Des Weiteren kann die Kontraktilität auch sekundär, beispielsweise durch Änderung des koronaren Perfusionsdrucks oder der Herzfrequenz, beeinflusst werden [91].

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen eine deutliche, konzentrationsabhängige Abnahme der kontraktiven Parameter des isolierten Langendorff Herzens unter Einfluß von Adrenomedullin, bei paralleler Abnahme des koronaren Perfusionsdrucks. Die Wirkung auf die Kontraktilität könnte somit sowohl primär durch Beeinflussung der Kontraktilität der Myozyten, als auch sekundär durch die Verminderung der Durchblutung bedingt sein, da jede Veränderung des koronaren Perfusionsdrucks am isolierten, flußkonstant perfundierten Herz die myokardiale Funktion beeinträchtigt (Gregg Phänomen) [93]. Die erhobenen Daten lassen somit keine eindeutigen Aussagen über die Wirkung von Adrenomedullin auf die Kontraktilität des Herzmuskels zu.

Papillarmuskelpräparat

Das Papillarmuskelpräparat wird während des Versuchsablaufs durch Diffusion von außen mit Nährstoffen versorgt. Es erlaubt, im Gegensatz zum isolierten Langendorff Herz, eine von der koronaren Perfusion weitgehend unabhängige Beurteilung der kontraktiven Parameter. Adrenomedullin beeinflusste weder die Kraftentwicklung noch die gleichzeitig erhobenen Zeitparameter, wie zum Beispiel die Kraftanstiegsgeschwindigkeit, oder die Dauer bis zur maximalen Kraftentwicklung.

Ikenouchi et al. berichteten über negativ inotrope Eigenschaften von Adrenomedullin auf isolierte adulte Kardiomyozyten des Kaninchens. Diese Effekte waren durch die gleichzeitige Gabe eines NO-Synthase-Inhibitors blockierbar, so daß eine Rolle von NO in der Vermittlung des

negativ inotropen Effektes vermutet wurde [66]. Unter der Annahme, daß die Aktivierung der NO-Synthase einen möglichen positiv inotropen Wirkmechanismus von Adrenomedullin verdecken könnte, wurde das Papillarmuskelpräparat in einer weiteren Versuchsreihe mit Perfusionspuffer umspült, der sowohl Adrenomedullin als auch L-NOARG, ein spezifischer Inhibitor der NO-Synthase, enthielt. Bei einem verdeckten Mechanismus wäre die positiv inotrope Wirkung unter diesen Voraussetzungen zu Tage getreten. Aber auch die kombinierte Gabe des NO-Synthase-Inhibitors L-NOARG und Adrenomedullin führte zu keiner Änderung von Inotropie und Zeitparametern.

Endothelin-1 ist wie Adrenomedullin ein Sekretionsprodukt des Endothels. Es wurde in der vorliegenden Arbeit als Positivkontrolle eingesetzt, da es, vergleichbar mit dem beschriebenen Wirkprofil von ADM, eine langsam einsetzende positiv inotrope Wirkung auf Papillarmuskelpräparate hat [94]. Endothelin-1 verursachte einen deutlichen Anstieg der Kraftentwicklung des Papillarmuskelpräparats im Vergleich zur Kontrollgruppe. Diese Ergebnisse dokumentieren die vorhandene Empfindlichkeit des Meßsystems für positiv inotrope Substanzen.

Als weitere Positivkontrolle wurde in allen Versuchsgruppen am Ende der Messungen die Empfindlichkeit der verwendeten Papillarmuskelpräparate auf steigende Konzentrationen von Isoprenalin getestet. Unabhängig von den jeweiligen Gruppen zeigte sich bereits bei niedrigen Konzentrationen ein deutlicher Anstieg der Kraftentwicklung. Die Präparate waren also auch am Ende der jeweiligen Versuchsreihen noch empfindlich.

Wie bereits eingangs beschrieben, erlaubt das Papillarmuskelpräparat eine von der Koronarperfusion unabhängige Beurteilung des Kontraktionsverhaltens, da es durch Diffusion von außen mit Nährstoffen versorgt wird. Dies hat in den letzten Jahren zu einer deutlichen Zunahme der Anwendung dieser Methode geführt, insbesondere auch aufgrund der besonders günstigen, parallelen Anordnung der Myofilamente im Vergleich zu anderen Herzmuskelpräparaten. Dennoch stellen sich mehrere Probleme in der Arbeit mit dieser Methode dar. Zum einen handelt es sich, ähnlich wie beim Ganzherz-Modell um ein „Gewebe“, das natürlich aus mehreren unterschiedlichen Zellen zusammengesetzt ist. Eine gegenseitige Beeinflussung sowie eine eindeutige Zuordnung des Wirkortes einer Substanz gelingt demnach nicht. Weiterhin sind Präparation, insbesondere die Wahl eines geeigneten Durchmessers des Präparates, und Befestigung in der Versuchsapparatur schwierig und setzen sehr exaktes Arbeiten voraus.

Der Vergleich von Daten, die an so sensiblen biologischen Systemen wie dem Papillarmuskel gewonnen wurden, ist oft schwierig, da neben methodischen Unterschieden sehr viele äußere

Störfaktoren die Ergebnisse beeinflussen können. Jedoch kann so zumindest eine grobe Validierung der Methode erfolgen. Die in dieser Arbeit verwendeten Papillarmuskelpräparate zeigen bezüglich Kontraktilität und Ansprechbarkeit auf positiv inotrope Substanzen wie Isoprenalin und Endothelin, ähnliche Daten wie sie in der Literatur durch anderer Arbeitsgruppen bereits beschrieben wurden [95, 96, 97]. Da die Gabe von Adrenomedullin, sowie die Kombination Adrenomedullin und L-NOARG, keinen Einfluß auf die kontraktile Parameter des Papillarmuskels hatten, liegt der Schluß nahe, daß Adrenomedullin keinen direkten Einfluß auf die myokardiale Kontraktilität des Rattenherzens hat.

Isolierte adulte Kardiomyozyten

Mit Hilfe der konfokalen Laserscan Mikroskopie läßt sich neben der Kontraktilität, gemessen als Zellverkürzung zwischen Diastole und Systole, der Verlauf der intrazellulären Kalziumkonzentration bestimmen. Diese ist von entscheidender Bedeutung für die myokardiale Kraftentwicklung und kann als weiterer Parameter der Kontraktilität gewertet werden. In der vorliegenden Arbeit ließ sich kein Einfluß von ADM auf die Kontraktionsamplitude, den diastolischen Kalziumgehalt der Zelle oder den Kalziumtransienten, also die Differenz zwischen diastolischer und systolischer Kalziumkonzentration, nachweisen.

Endothelin-1 wurde, analog zu den Versuchen am Papillarmuskelpräparat, als Positivkontrolle eingesetzt und führte zu einer dosisabhängigen Steigerung der Kontraktilität und des Kalziumtransienten.

Die Beurteilung der Wirkung von Substanzen auf den einzelnen Myozyten, also den eigentlichen „Motor der Herzarbeit“, ist eine sehr spezifische Methode, die eine Beeinflussung durch Störfaktoren, wie sie für die beiden anderen Methoden bereits beschrieben wurden, weitgehend ausschließt. Allerdings stellen sowohl das Isolationsverfahren mit enzymatischer Spaltung der interzellulären Brücken durch Kollagenasen, als auch die Beladung mit einem Kalziumfarbstoff und die Detektion der Fluoreszenz mit Hilfe eines Lasers, eine erhebliche Belastung für die Zelle dar. So könnte man argumentieren, daß durch die Einwirkung von Kollagenasen die zelluläre Membran geschädigt und mögliche Angriffspunkte oder Rezeptoren in Mitleidenschaft gezogen wurden. Diese Möglichkeit läßt sich nicht mit Sicherheit ausschließen, die gute Ansprechbarkeit des Meßsystems auf Endothelin-1 dokumentiert jedoch eine vorhandene Empfindlichkeit für positiv inotrope Substanzen.

Neben der beschriebenen Positiv-Kontrolle wurden in regelmäßigen Abständen Evaluierungen des Meßsystems durch Testung der Ansprechbarkeit auf Isoprenalin und Nitrendipin, ein negativ

inotrop wirkender Antagonist an kardialen Ca^{2+} -Kanälen, durchgeführt. Einige dieser Versuchsreihen sind in den Arbeit von Bramlage et al. sowie Hunger aus dem Jahr 2001 veröffentlicht [98, 99]. Sie dokumentieren ebenfalls eine mit der Fachliteratur vergleichbare Empfindlichkeit des von uns verwendeten Meßsystems.

4.2 Vergleich mit den Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen

Die ersten Untersuchungen der Wirkung von Adrenomedullin am isolierten Herzen der Ratte führten Perret et al. im Jahr 1993 durch [64]. Nach Gabe eines Adrenomedullin-Bolus zeigte sich innerhalb von Sekunden eine signifikante Abnahme des systolischen Spitzendrucks. Dieser Effekt erreichte schnell seinen Höhepunkt und dauerte einige Minuten an. Da Vorlast, Nachlast, koronararterieller Blutfluß und Auswurfleistung des linken Ventrikels während des Versuchsablaufs konstant waren, schlossen die Autoren auf eine negativ inotrope Wirkung von Adrenomedullin, neben der damals schon bekannten vasodilatativen Wirkung.

In einer zweiten Versuchsreihe wurde die Wirkung einer Bolusgabe von ADM auf den arteriellen Blutdruck an anästhesierten Ratten untersucht. Es zeigte sich eine schnell einsetzende, deutliche Abnahme, die ihren Höhepunkt nach 30 s erreichte und für eine Stunde andauerte.

Im Vergleich mit den Ergebnissen dieser Arbeit fällt auf, daß Perret et al. keine Änderung des koronaren Blutflusses unter Gabe von Adrenomedullin feststellten. Diese Wirkung gilt allerdings heute als weitgehend gesichert, da mehrere Arbeitsgruppen zu ähnlichen Ergebnissen wie diese Arbeit kamen [44, 47, 50]. Die Gründe für die Diskrepanz sind nicht eindeutig, allerdings kommen methodische Unterschiede in Betracht. So arbeiteten Perret et al. mit druckkonstant perfundierten Herzen und die Gabe von Adrenomedullin erfolgt nur einmalig als Bolus, ohne Rezirkulation und in vergleichsweise hoher Dosis [64].

Ikenouchi et al. berichteten 1997 ebenfalls über einen negativ inotropen Effekt von Adrenomedullin. An isolierten Kardiomyozyten des Kaninchens konnten sie eine Abnahme der Zellverkürzung sowie des Kalziumtransienten nachweisen. Passend dazu zeigte sich in einer weiteren Versuchsreihe ein verminderter Kalziumeinstrom über L-Typ Kalziumkanäle der Zellmembran. Diese Effekte schienen über cGMP vermittelt zu sein, da unter ADM-Einfluß intrazellulär erhöhte cGMP Konzentrationen bei unverändertem cAMP-Gehalt festgestellt wurden. Die Autoren schlossen daraus auf einen NO-vermittelten, negativ inotropen Effekt von ADM [66]. Diese Hypothese wurde weiter untermauert durch die Blockierbarkeit der Effekte mit L-NMMA, einem spezifischen Inhibitor der NOS. Die beobachtete Zunahme an intrazellulärem cGMP konnte jedoch von anderen Arbeitsgruppen wie z.B. Nishikimi et al. nicht nachvollzogen

werden [100]. Mukherjee et al. untersuchten den Einfluß von ADM auf isolierte, humane Kardiomyozyten. Sie konnten eine verminderte Verkürzungsgeschwindigkeit sowie eine reduzierte Ansprechbarkeit auf Isoproterenol, ein positiv inotrop wirkendes Katecholamin zeigen. [65].

Eine Bewertung der Unterschiede zwischen der vorliegenden Arbeit und den oben genannten Veröffentlichungen ist schwierig. Zum einen können Spezies-spezifische Unterschiede zwischen Kardiomyozyten von Ratte, Kaninchen und Mensch nicht sicher ausgeschlossen werden. Mukherjee et al. verwendeten weiterhin Zellen, die Patienten während koronarer Bypass-Operation per Biopsie entnommen wurden. Es könnten sich daher um bereits vorgeschädigte Zellen im Rahmen einer ischämischen Kardiomyopathie handeln, da chronische Hypoxie zu einer Abnahme der myokardialen Kontraktilität führt [101, 102]. Saetrum Opgaard et al. untersuchten die Wirkung von ADM, CGRP und Amylin an intakten menschlichen Trabekeln aus dem linken Ventrikel. Wie in Abschnitt 1.2. bereits erwähnt, sind diese Proteine strukturverwandt und werden in der Literatur der Peptid-Superfamilie um CGRP zugeordnet. Für CGRP und Amylin konnten Saetrum Opgaard et al. einen positiv inotropen Effekt nachweisen, während ADM keinen Einfluß auf das Kontraktionsverhalten der myokardialen Trabekel zeigte [70]. Diese Ergebnisse unterstützen die in dieser Arbeit vorgestellten Resultate, eine Klärung der unterschiedlichen Ergebnisse zu Perret, Mukherjee und Ikenouchi et al. ist allerdings mit letzter Sicherheit nicht möglich.

In einer von Mitra et al. kürzlich veröffentlichten Arbeit zeigte sich ein zweiphasiger Wirkungsverlauf von ADM an adulten Kardiomyozyten der Ratte. Im Gegensatz zu den eben genannten Arbeiten trat in den ersten 30 Minuten nach Gabe von ADM zunächst ein Anstieg der Kontraktilität ein, begleitet von einer Erhöhung des Kalziumtransienten. Nach einer Inkubationsdauer größer 60 min kam es jedoch zu einem Abfall beider Parameter im Vergleich zur Kontroll-Gruppe [69]. Beide Effekte waren sowohl unter Vorbehandlung mit ADM-(22-52), einem ADM-Antagonisten, als auch Indomethacin, einem Zyklooxygenase-Inhibitor, nicht mehr nachweisbar. Im Unterschied zur Arbeit von Ikenouchi et al. konnte neben dem deutlich späteren Auftreten des negativ inotropen Effektes keine Inhibition durch Gabe eines spezifischen NOS-Antagonisten (L-NAME) nachgewiesen werden [103]. Die Autoren gingen daher von einer NO-unabhängigen negativ inotropen Wirkung des ADM aus. Der früh einsetzende positiv inotrope Effekt schien cAMP vermittelt zu sein. In einer weiteren Versuchsreihe wurde der Einfluß von ADM im Rahmen des septischen Kreislaufversagens untersucht. Durch intravenöse Injektion von Lipopolysaccharid (LPS) in anästhesierte Ratten wurde eine Sepsis induziert und nach ca.

vier Stunden die Myozyten isoliert. Im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigte sich eine deutliche Reduktion der kontraktilen Parameter, die durch Gabe des ADM-Inhibitors ADM-(22-52) gebessert werden konnte, so daß die Autoren auf eine ADM-vermittelte Abnahme der myokardialen Kontraktilität im Rahmen des septischen Kreislaufversagens schlossen.

Die verwendete Methodik dieser umfassenden Arbeit ist vergleichbar mit den in dieser Arbeit angewandten Messungen von Kalziumtransienten und Kontraktilität. Jedoch fallen bei näherer Betrachtung einige wesentliche Unterschiede auf. Neben der Zusammensetzungen der angewandten Puffer sowie der Verwendung eines anderen Ca^{2+} -Farbstoffes zur Erfassung des Kalziumtransienten fallen unterschiedliche Ausgangswerte im Kontraktionsverhalten der isolierten Kardiomyozyten auf. So zeigen die Zellen bei Mittra et al. eine mittlere Zellverkürzung von 12% unter Ruhebedingungen. Die in dieser Arbeit verwendeten Zellen liegen mit durchschnittlich 7,3% deutlich niedriger und sind vergleichbar mit Angaben in der Literatur [76, 104, 105, 106, 107]. Ob dieser Unterschied Ausdruck einer vermehrten Stimulation der von Mittra verwendeten Myozyten im Rahmen des Isolationsverfahrens ist, oder die in dieser Arbeit verwendeten Myozyten eine verminderte Kontraktilität aufwiesen, läßt sich nicht eindeutig klären. Allerdings könnte dies der Grund für die divergenten Ergebnisse sein.

In einer Reihe von Studien wurden positiv inotrope Effekte von ADM in unterschiedlichen Modellen für myokardiales Kontraktionsverhalten beschrieben. Die systemische Gabe von ADM in anästhesierten Ratten [108] und Schafen [50] führte zu einem deutlichen Anstieg des Schlag- und Herzzeitvolumens. Allerdings muß bei diesem Ansatz die gut belegte, vasodilatierende Wirkung des ADM in Betracht gezogen werden, da ein Abfall des systemischen Gefäßwiderstandes, also der Nachlast des linken Ventrikels, in vivo zwangsläufig eine Steigerung von Schlagvolumen und Herzfrequenz zur Folge hat [91]. Eine Schlußfolgerung auf die myokardiale Kontraktilität ist mit diesem Ansatz daher aus methodischen Gründen nicht sicher möglich.

Szokodi et al. führten 1997 und 1998 Untersuchungen an isolierten Rattenherzen durch und sahen eine Zunahme der kontraktilen Parameter 5 Minuten nach ADM-Exposition und einer maximalen Wirkung nach ca. 30 Minuten [67, 109]. Die beobachtete Wirkung schien durch direkte Aktivierung von L-Typ Ca^{2+} -Kanälen, sowie Thapsigargin- und Ryanodin-sensitive Ca^{2+} Depots ohne Beteiligung von cAMP vermittelt zu sein. Um eine mögliche Beeinflussung der Ergebnisse durch Änderung der Schlagfrequenz auszuschließen, wurden die Herzen mit von außen angebrachten Elektroden in einer festen Frequenz stimuliert. Vor Beginn der Messungen wurde zunächst der koronare Blutfluß von durchschnittlich 7 ml/min auf 5 ml/min reduziert, um

eine maximale Dilatation des koronaren Gefäßbettes zu erreichen und so dem Einfluß einer ADM-vermittelten Vasodilatation auf die kontraktilen Parameter des linken Ventrikels zu minimieren. Szokodi et al. sahen unter dem Einfluß von ADM zwar noch eine Änderung des koronaren Perfusionsdrucks, die jedoch nicht statistisch signifikant war [67]. Dennoch bleibt die Abhängigkeit der myokardialen Kontraktilität von den hämodynamischen Parametern der Koronarperfusion eine Schwäche der Methode. In der vorliegenden Arbeit kamen neben der von Szokodi et al. angewandten Langendorff-Perfusion zwei Methoden zur Anwendung, die eine Beurteilung der myokardialen Funktion unabhängig von hämodynamischen Effekten des ADM erlauben. Beide zeigten keinen Einfluß von ADM auf die kontraktilen Parameter.

In einer Arbeit von Ihara et al. wurde die Wirkung von ADM an isolierten Papillarmuskelpräparaten der Ratte getestet. Es zeigte sich ein dosisabhängiger Anstieg der maximalen Kraftentwicklung im Vergleich zur Kontrollgruppe, der durch Gabe des CGRP-Rezeptor-Antagonisten CGRP-(8-37) inhibierbar war. Der Effekt ging mit einer Erhöhung der zytosolischen cAMP-Konzentration einher [68]. Die Autoren schlossen daher, im Gegensatz zu Szokodi et al., auf einen cAMP-vermittelten positiv inotropen Effekt von ADM auf die myokardiale Kontraktilität.

Die Ursache für die unterschiedlichen Ergebnisse im Vergleich zur vorliegenden Arbeit sind unklar und schwer zu interpretieren. Eine mögliche Erklärung liegt in der anderen Zusammensetzung des verwandten Perfusionspuffers, da Ihara et al. deutlich höhere Ca^{2+} -Konzentrationen verwendeten (2,5 versus 1,0 mM CaCl_2). Ca^{2+} -Ionen sind für die myokardiale Kraftentwicklung von entscheidender Bedeutung, da ihr Einstrom in das Zytosol des Myozyten die Kontraktion auslöst [91]. Obwohl in der vorliegenden Arbeit eine geringere Ca^{2+} -Konzentration verwendet wurde, zeigten die Papillarmuskel-Präparate im Vergleich zu Ihara et al. eine ca. 30% höhere maximale Kraftentwicklung in Ruhe [68].

Im Gegensatz zu Ihara et al. konnten Saetrum Opgaard et al. an einem vergleichbaren Versuchsaufbau mit humanen Trabekeln keinen Effekt von ADM auf die Kontraktilität nachweisen und bestätigten somit die in dieser Arbeit vorliegenden Ergebnisse.

Da Ikenouchi et al. einen früh einsetzenden, NO-vermittelten, negativ inotropen Effekt von ADM auf isolierte Kardiomyozyten sahen, könnte man argumentieren, daß der von Ihara et al. gesehene positiv inotrope Effekt durch einen gleichzeitig einsetzenden, negativ inotropen Effekt maskiert wird. In der vorliegenden Arbeit zeigte aber auch die gleichzeitige Gabe von ADM und L-NOARG, einem spezifischen Inhibitor der NOS, keine Wirkung auf kontraktilen Parameter des Papillarmuskel-Präparats.

4.3 Schlußfolgerung

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die Ursachen für die teilweise divergenten Ergebnisse zwischen der vorliegenden Arbeit und den in der Literatur beschriebenen Effekten von ADM auf die Kontraktilität des Myokards nicht sicher zu klären sind. Die Hauptgründe liegen aber wohl in Unterschieden zwischen den verwendeten biologischen Systemen sowie der angewandten Methodik.

Es bleibt festzuhalten, daß mit den in dieser Arbeit vorgelegten Ergebnissen erstmals in drei unterschiedlichen experimentellen Modellen für myokardiale Kontraktilität die Wirkung von ADM getestet wurde. Alle verwendeten Methoden sind etabliert und durch Literaturvergleich oder Testung auf verschiedene positiv und negativ inotrope Substanzen validiert [95, 96, 97, 98, 99]. Unabhängig von einander konnte in keinem Modell ein Effekt von ADM auf die kontraktilen Parameter nachgewiesen werden. Es liegt daher der Schluß nahe, daß ADM keinen Einfluß auf die Kontraktilität des Rattenherzens hat.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals mit Hilfe von drei unterschiedlichen experimentellen Modellen der Einfluß von Adrenomedullin (ADM) auf die myokardiale Kontraktilität des Rattenherzens untersucht. Die Methodik umfaßte die Verwendung des isolierten Herzen nach Langendorff, des isolierten Papillarmuskelpräparats und der konfokalen Laserscan Mikroskopie bei adulten Kardiomyozyten. In keinem der Ansätze konnte ein direkter Effekt von ADM auf die Kontraktilität nachgewiesen werden.

An isolierten adulten Kardiomyozyten hatte ADM weder Einfluß auf die systolische Zellverkürzung noch auf den gleichzeitig registrierten zytosolischen Kalziumgehalt. Auch an isolierten Papillarmuskeln verursachte ADM keine Änderung der maximalen Kraftentwicklung oder Kraftanstiegsgeschwindigkeit. Endothelin-1 wurde sowohl am Papillarmuskelpräparat als auch an isolierten, adulten Kardiomyozyten als Positiv-Kontrolle verwendet und verursachte in beiden Versuchsaufbauten einen deutlichen Anstieg der kontraktilen Parameter.

Als dritte Methode wurde das isoliert perfundierte Herz nach Langendorff verwendet. Unter Gabe von ADM zeigte sich ein Abfall des koronaren Perfusionsdrucks, entsprechend den bereits bekannten vasodilatierenden Eigenschaften des Peptids. Dieser Effekt war zwar begleitet von einer Abnahme der kontraktilen Parameter der Herzen, allerdings ist am isoliert und flußkonstant perfundierten Herz eine Abnahme des koronaren Perfusionsdrucks aufgrund des Gregg-Phänomes mit einer Abnahme der Kontraktilität vergesellschaftet.

Aus den Ergebnissen dieser Arbeit kann daher der Schluß gezogen werden, das Adrenomedullin keinen Einfluß auf die Kontraktilität des Rattenherz hat.

6 Literaturverzeichnis

- [1] Kitamura, K; Kangawa, K; Kawamoto, M; Ichiki, Y; Nakamura, S; Matsuo, H und Eto, T (1993): Adrenomedullin: A novel hypotensive peptide isolated from human pheochromocytoma, *Biochem Biophys Res Commun* 192, Seite 553-60.
- [2] Hinson, J.P.; Kapas, S und Smith, D.M. (2000): Adrenomedullin, a Multifunctional Regulatory Peptide, *Endocr Rev* 21 [2], Seite 138-67.
- [3] Jougasaki, M; Wei, C.M.; Aarhus, L.L. und Heubelin, D.M. (1995): Renal localization and actions of adrenomedullin: a natriuretic peptide, *Am J Physiol* 268 [4 Pt 2], Seite F657-63.
- [4] Chini, E.N.; Choi E; Grande, J.P.; Burnett, J.C. und Dousa, T.P. (1995): Adrenomedullin suppresses mitogenesis in rat mesangial cells via cAMP pathway, *Biochem Biophys Res Commun* 215 [3], Seite 868-73.
- [5] Kitamura, K; Kangawa, K; Kojima, M und Ichiki, Y (1994): Complete amino acid sequence of porcine adrenomedullin and cloning of cDNA encoding its precursor, *FEBS Lett* 338, Seite 306-10.
- [6] Sakata, J; Shimokubo, T; Kitamura, K und Nakamura, S (1993): Molecular cloning and biological activities of rat adrenomedullin, a hypotensive peptide, *Biochem Biophys Res Commun* 195, Seite 921-27.
- [7] Barker, S; Wood, E; Clark, A.J.L. und Corder, R (1998): Cloning of bovine proadrenomedullin and inhibition of its basal expression in the vascular endothelial cells by staurosporine, *Life Sci* 62, Seite 1407-15.
- [8] Sugo, S.; Minamino, N.; Kangawa, K.; Miyamoto, K. und Kitamura, K. (1994): Endothelial cells actively synthesize and secrete Adrenomedullin, *Biochem Biophys Res Commun* 201 [3], Seite 1160-66.
- [9] Sugo, S; Minamino, N; Shoji, H; Kangawa, K; Kitamura, K; Eto, T und Matsuo, H (1994): Production and secretion of adrenomedullin from vascular smooth muscle cells: augmented production by tumor necrosis factor-alpha, *Biochem Biophys Res Commun* 230 [1], Seite 719-26.
- [10] Tsuruda, T; Kato, J; Kitamura, K; Kuwasako, K und Imamura, T (1998): Adrenomedullin: a possible autocrine or paracrine inhibitor of hypertrophy of cardiomyocytes, *Hypertension* 31, Seite 505-10.
- [11] Nshimori, T; Tsujino, M; Sato, K; Imai, T; Marumo, F und Hirata, Y (1997): Dexamethasone-induced Up-regulation of Adrenomedullin and Atrial Natriuretic Peptide Genes in Cultured Rat Ventricular Myocytes, *J Mol Cell Cardiol* 29, Seite 2125-30.
- [12] Kapas, S; Martinez, A; Cuttitta, F und Hinson, JP (1998): Local production and action of adrenomedullin in the rat adrenal zona glomerulosa, *J Endocrinol* 156 [3], Seite 477-84.
- [13] Eto, Tanenao (2001): A review of the biological properties and clinical implications of adrenomedullin and proadrenomedullin N-terminal 20 peptide (PAMP), hypotensive and vasodilating peptides, *Peptides* 22, Seite 1693-11.
- [14] Zaks-Zilberman, M; Salkowski, CA; Elsasser, T; Cuttitta, F und Vogel, S (1998): Induction of adrenomedullin mRNA and protein by lipopolysaccharide and paclitaxel (Taxol) in murine macrophages, *Infect Immun* 66 [10], Seite 4669-75.
- [15] Kubo, A; N, Minamino.; Isumi, Y; Katafuchi, T; Kangawa, K und Matsuo, H (1998): Production of Adrenomedullin in Macrophage Cell Line and Peritoneal Macrophage, *J Biol Chem* 273 [27], Seite 16730-38.
- [16] Kubo, A; Minamino, N; Isumi, Y; Kangawa, K; Dohi, K und Matsuo, H (1998): Adrenomedullin production is correlated with differentiation in human leukemia cell lines and peripheral blood monocytes, *FEBS Lett* 426 [233-37].

