

**Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I
der Universität Würzburg
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. G. Ertl**

**Der Einfluss proinflammatorischer Cytokine (TNF- α und IL-1 β) auf die
Mechanik und Energetik in humanem Myokard**

Inaugural - Dissertation

**zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
der medizinischen Fakultät
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg
vorgelegt von**

Stefan Matthias Heuer

aus

Minden

Würzburg, November 2007

Referent: Priv.-Doz. Dr. med. A. Bonz

Koreferent: Prof. Dr. med G. Ertl

Dekan: Prof. Dr. med. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 21.05.2008

Der Promovend ist Arzt

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung

1.1 Tumornekrosefaktor- α	1
1.1.1 TNF- α Wirkung auf das Myokard	4
1.1.2 Effekt auf intracelluläre Ca-Konzentration	4
1.1.3 Signaltransduktion von TNF- α	5
1.2 Ceramide und Sphingomyelinase	6
1.3 Glutathion	7
1.4 Interleukin-1 β	7
1.4.1 Effekte von IL-1 β auf das kardiovaskuläre System	8
1.4.2 Signaltransduktion von IL-1 β	8
1.5 Fragestellung	9

2 Material und Methoden

2.1 Gewinnung von isolierten humanen Muskelstreifen	10
2.2 Versuchsaufbau für Messungen an isolierten Muskelstreifen	14
2.3 Effekte von Tumornekrosefaktor- α und Interleukin-1 β	16
2.4 Mechanische Messungen unter Glutathion	16
2.5 Messung der Sphingomyelinaseaktivität	17
2.6 Statistische Auswertung	19

3 Ergebnisse

3.1 Effekte von TNF- α auf die isometrische Kraftentwicklung	20
3.2 Effekte von IL 1- β auf die isometrische Kraft	22
3.3 Relaxationszeit	24
3.4 Einfluss beider Cytokine auf die myokardiale Energetik	26
3.5 Effekte von TNF- α und IL 1- β unter Glutathion	28
3.6 Sphingomyelinaseaktivität	30

4 Diskussion

4.1 Methodik	32
4.1.1 Mechanische Parameter	32
4.1.2 Kraft-Frequenz Beziehung	32
4.1.3 Atriales Myokard und ventrikuläres Myokard	33
4.1.4 Schädigung des Herzmuskelpräparates	33
4.1.5 In Vitro versus in Vivo Modell	34
4.1.6 Humanes Myokard	35
4.1.7 Limitationen	35
4.2 Ergebnisse	36
4.2.1 Kontraktionsökonomie	36
4.2.2 Glutathion	38
4.2.3 Aktivität der Sphingomyelinase	39
4.2.4 Therapieansätze	39

5. Zusammenfassung	42
---------------------------	-----------

Literaturverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

Danksagung

Lebenslauf

1. Einleitung

Inflammation wurde in den letzten Jahrzehnten eines der zentralen Themen in der Pathophysiologie der Herzerkrankung. In einem breiten Spektrum kardiologischer Erkrankungen wie Herzinsuffizienz^{1,2}, Myokardinfarkt^{3, 4}, Atherosklerosis⁵, Myokarditis⁶, Kardiomyopathie⁷, myokardiale Allotransplantatabstoßung⁸, sepsis-assoziierte kardiale Dysfunktion⁹ wurde die Bedeutung einer Vielzahl simultan und sequentiell auftretender Cytokine beschrieben. Erst mit der Entdeckung dieses ineinandergreifenden Systems an Mediatoren und Signalwegen wurde ein umfassenderes Verständnis und damit eine frühere Diagnose und Therapie ermöglicht. Die Serumspiegel von Cytokinen können so unter anderem bei der Herzinsuffizienz als Prognoseparameter dienen. Trotz vielversprechender experimenteller Studien und erfolgreicher klinischer Anwendung von TNF- α -Antagonisten in der rheumatoiden Arthritis zeigten mehrere randomisierte klinische Studien mit TNF- α -Antagonisten keinen therapeutischen Effekt in der chronischen Herzinsuffizienz^{10, 11}.

1.1 Tumornekrosefaktor- α

TNF- α ist ein pleiotropes proinflammatorisches Cytokin, das in vielen Zelltypen als Teil einer Reaktion auf Zellschädigung auftritt.

1975 wurde TNF- α erstmalig von Carswell im Serum von mit Lipopolysacchariden (LPS) behandelten Mäusen nachgewiesen, und erhielt den Namen aufgrund nekrotisierender Effekte bei malignen Tumoren¹². Eine Dekade später wurde ein Protein, aus Lipopolysaccharid-behandelten Makrophagen isoliert und Kachektin benannt, da es die Lipoproteinlipase inhibiert und daher als mutmaßlich an der Kachexie beteiligt angesehen wurde.¹³ Tracey et al erkannten, dass Kachektin und TNF- α identisch sind.¹⁴ LPS aktivieren über den TLR4/CD14 Rezeptor gemeinsam mit TNF- α - Rezeptoren NF- κ B, ein Transkriptionsfaktor für TNF- α und andere Cytokine. Nach Translation ist der TNF- α zunächst zellmembranständig, bis es durch die Protease TACE als 17 kD Polypeptid freigesetzt wird. In der löslichen Form liegt

es als 51 kD Homotrimer vor, welches teilweise an löslichen TNF-Rezeptoren gebunden ist.

Neben einer Vielzahl von inflammatorischen Reizen wie Lipopolysaccharide, virale, fungale, parasitäre Antigene und Interleukin-1 β sind auch myokardiale Ischämie¹⁵, Ischämie/Reperfusion^{16,17}, koronarer Mikroembolisation¹⁸ und hämodynamische Drucküberbelastung (pressure overload)¹⁹ als Auslöser einer TNF- α mRNA Induktion bekannt. Unter Ischämie/Reperusionsbedingungen wird TNF- α innerhalb von Minuten von Makrophagen, Monozyten und Mastzellen freigesetzt^{4, 20}. Die Sekretion innerhalb der Infarktzone ist etwa 8 bis 10-fach erhöht und überwiegend den mononukleären Zellen attribuiert^{21, 22}. Im kontralateralen nicht im Ischämiegebiet liegenden Myokard ist die ca. 4 bis 5-fach erhöhte TNF- α -Sekretion geringer ausgeprägt. Hier exprimieren vor allem die Myozyten²¹. Dass neben den inflammatorischen Zellen auch die Myozyten selbst an der Sekretion beteiligt sind ist sowohl für die Endotoxin²³ getriggerte Auslösung, als auch für ischämische Reize¹⁵, Mikroembolisation²⁴ und auch für Minderperfusion peripheren Gewebes²⁵ (im Schock) nachgewiesen.

Die erste Beschreibung der Bedeutung von TNF- α im kardiovaskulären System erfolgte von Levine und Kollegen, die erhöhte Serumlevel in Herzinsuffizienzpatienten nachwiesen.²

Im akuten Myokardinfarkt steigen vier Stunden nach Beginn der Brustschmerzen die Serumkonzentrationen von TNF- α abhängig von der Killip-Klassifikation (Einteilung anhand klinischer Parameter der Herzinsuffizienz) der Patienten an²⁶. Die Serumkonzentrationen fallen nach 2 bis 10 Tagen auf Kontrollpatientenniveau²⁶.

Zudem korrelieren die in Myokardpatienten postinfartiell gemessenen Serumkonzentrationen von TNF- α mit der weiterbestehenden Ischämiebelastung des Myokards. Serumkonzentrationen von TNF- α normalisieren sich bei Patienten ohne Ischämiezeichen (in der Dobutamin-Streßechokardiographie) schneller als bei Patienten ohne positiven Ischämienachweis²⁷.

Eine erhöhte Expression von TNF- α mRNA und Protein ist in zunehmenden Verständnis der Pathophysiologie der Atherosklerose und Herzinsuffizienz

auch als Reaktion auf koronare Mikroembolisation nachgewiesen worden¹⁸. TNF wurde dabei übereinstimmend mit Ischämie/Reperusionsstudien sowohl in den infiltrierten Leukozyten als auch in den nicht-apoptotischen Myocyten der Infarktgrenzzonen lokalisiert²⁴. Es wurde weiterhin dargestellt, dass die multiple Mikroembolisation im Hundemodell klinische Zeichen der Herzinsuffizienz, kardiale Hypertrophie, disseminierter myokardialer Fibrose mit Apoptoseinduktion in den umgebenden Regionen, erhöhte Noradrenalinausschüttung, verringerte Expression und Aktivität der Sarkoplasmatischen Calcium-ATPase (SERCA), und verminderte mitochondriale Respiration verursacht^{28,29}. Die durch Mikroembolisation ausgelösten disseminierten Mikroinfarkte sind durch Monocyten/Makrophageninvasion gekennzeichnet³⁰, ohne dass die zur Mikroembolisation verwandten Mikrosphären eine chemotaktische Aktivität aufweisen³⁰.

Die nach Mikroembolisation auftretende kontraktile Dysfunktion kann durch eine alleinige intracoronare oder intravenöse Applikation von TNF- α initiiert werden²⁴. Darüberhinaus kann durch Applikation von TNF- α -Antikörpern vor Mikroembolisation die kardiale Dysfunktion vermindert werden²⁴.

Analog zum Mikroembolisationsmodell konnte eine erhöhte TNF- α -Sekretion sogar nach elektiver perkutaner Koronarintervention bei Patienten mit stabiler Angina pectoris aufgezeigt werden³¹.

Im Tiermodell gemessene TNF- α -mRNA und -proteinwerte im Myokard sind vom 1. bis 35. Tag nach Infarkt erhöht, während im selben Tiermodell keine erhöhten Serumkonzentrationen beobachtet wurden untermauert die Bedeutung der lokalen (autokrinen/parakrinen) TNF- α Wirkung auf die Kardiomyozyten.²¹

Das Spektrum der gemessenen pathologisch erhöhten Serumkonzentrationen schwankt beträchtlich. Dibbs et al ermittelten Werte im Bereich von 7 pg/ml für stabile NYHA III Patienten, Kosmala et al am 2.postinfarkt Tag im Bereich von 35 pg/ml, Li et al 4 Stunden nach Beginn von Brustschmerzen bei MI-Patienten von 2 ng/ml und Matsumori et al bei hypertrophischer Kardiomyopathie³² über 1 ng/ml. Die Serumkonzentrationen der löslichen TNF-Rezeptoren steigen im Sinne einer „receptor shedding“³³ Reaktion parallel zu den TNF- α

Konzentrationen an. Die in Herzinsuffizienz und Kardiomyopathie 1,5 bis 3-fach erhöhten³⁴ Konzentrationen der löslichen Rezeptoren sind, wie Ferrari¹ et al und Rauchhaus et al³⁵ darstellen konnten, sind bessere Prognosefaktoren der kurz- und langfristigen Herzinsuffizienz als TNF- α selbst, möglicherweise aufgrund der insgesamt geringeren Variabilität der Rezeptorkonzentrationen³⁶.

1.1.1 TNF- α Wirkung auf das Myokard

Die erste Beschreibung von kardiodepressiven Effekten erfolgte 1986 von Tracey et al im Nachweis von Hypotension, metabolischer Acidose und Tod bei Ratten innerhalb von Minuten bis Stunden³⁷.

In TNF- α überexprimierenden Mäusemodellen wurde eine direkte Korrelation mit verminderter Kontraktilität und reduzierter Ejektionsfraktion aufgezeigt. Die untersuchten Herzen wiesen eine deutlich geringere Ejektionsfraktion bei globaler ventrikulärer und atrialer Dilatation und Fibrose auf^{38,39}.

Die Beeinflussung der kardialen Pumpfunktion kann eingeteilt werden in einen akuten und einen langfristigen Effekt, sowie in eine direkt auf die kontraktile Funktion der Myozyten einwirkende Veränderung und eine Induktion von Apoptose, Fibrose und ventrikulärer Dilatation im Sinne des Remodelling nach Myokardinfarkt, das wiederum die Pumpfunktion des Herzens verändert.

Die überwiegende Zahl der In-Vitro Studien (isolierte Kardiomyocyten, Muskelstreifen, isolierte Herzmodelle) protokollieren einen unmittelbar negativ inotropen Effekt⁴⁰⁻⁴³. Während einige Studien einen frühen stimulatorischen oder keinen unmittelbaren inotropen Effekt beschreiben⁴⁴⁻⁴⁶.

1.1.2 Effekt auf intracelluläre Ca-Konzentration

TNF- α verändert das intrazelluläre Calcium-Handling, was von vielen Autoren als entscheidender Mechanismus der inotropen Effekte angesehen wird^{40,47,48}.

In adulten Säugetierkardiomyozyten vermindern TNF- α Dosen von 10 bis 25ng/ml rasch die Aktionspotentialdauer, den maximalen Ca-Transienten und den Ca-Ausstrom, ohne die diastolische Konzentration oder den Ca-Einstrom zu verändern^{49,47}. Damit übereinstimmende Ergebnisse wurden auch an

isolierten Herzen berichtet⁴⁷. Krown und Kollegen beschrieben bei hohen Konzentrationen $\geq 500\text{ng/ml}$ sowohl eine Verminderung des I_{Ca} -Transienten als auch der maximalen Ca-Konzentration in Rattenkardiomyozyten⁴⁸.

Goldhaber et al protokollierten bei isolierten Kaninchenkardiomyozyten dagegen bei einer hohen Dosis ($10,000\text{U/ml}$ entsprechen 100ng/ml ⁵⁰) unveränderte Ca-Transienten bei verringerter Kontraktion und postulieren daher eine verringerte Ca-Sensitivität der Myofilamente⁴³. Die wenigen Studien in denen ein früher stimulatorische Effekt auf die Kontraktilität festgestellt wurde verwandten niedrige Dosen und beschrieben eine $\text{TNF-}\alpha$ vermittelte Verstärkung des Ca-Transienten und eine Beschleunigung der diastolischen intrazellulären Ca-Konzentrationsabnahme^{44, 46}. Eine Studie von Amadou et al beschreibt eine dosisabhängige Veränderung des Ca-Transienten und der Kontraktilität durch $\text{TNF-}\alpha$. Bei einer Konzentration von 10 ng/ml steigert $\text{TNF-}\alpha$ bei isolierten Rattencardiomyocyten die Ca-Transienten-Amplitude und das fractional shortening. Bei einer höheren Konzentration von $\geq 50\text{ng/ml}$ zeigte sich eine Reduktion des maximalen Transienten und des fractional shortening⁴⁴.

1.1.3 Signaltransduktion von $\text{TNF-}\alpha$

Torre-Amione et al konnten zwei Rezeptoren TNF-R1 (p55) und TNF-R2 (p75)⁵¹ im humanen adulten Myokard nachweisen. Der TNF-R1 wird stärker exprimiert und vermittelt die meisten $\text{TNF-}\alpha$ -Effekte insbesondere die negativ inotropen⁵². Die inhibierenden Effekte auf die elektromechanische Koppelung der Kontraktion wird ebenso ausschließlich über den TNF-R1 vermittelt^{48,52}.

TNF-R1 Knock-out Mäuse zeigen ein ausgeprägtes Immundefizit aber eine absolute Resistenz gegenüber den letalen Effekten von LPS ⁵³. Da keine signifikante Homologien zwischen den intrazellulären Domänen bestehen, wird von zwei gänzlich unterschiedlichen Signalwegen ausgegangen⁵⁴.

1.2 Ceramide und Sphingomyelinase

Bei TNF- α wurde als erstes Cytokin die Induktion einer Ceramidproduktion entdeckt^{55,56}. Dies geschieht über den TNF-R1 mittels Aktivierung von Sphingomyelinasen (SMasen). SMasen katalysieren die Hydrolyse von Sphingomyelin in Ceramid und Phosphorylcholin. Es werden zwei Typen der SMase unterschieden, die membrangebundene neutrale Mg-abhängige und die lysosomale saure⁵⁷ SMase. TNF-R1 bewirkt eine Aktivierung der membrangebundenen neutralen SMasen^{58,59} und besitzt eine intrazelluläre Sequenz die das Adaptorprotein FAN aktiviert, welches wiederum als Aktivator einer lysosomalen sauren SMase bekannt ist^{60,61}. Die Aktivität der neutralen SMase ist zudem von der Glutathionkonzentration abhängig^{62,63,64} und führt zu einer Aktivitätssteigerung der endothelialen NO-Synthase⁶⁵.

Durch die neutrale SMase produziertes Ceramid aktiviert proline-directed serine/threonine Proteinkinasen und Phospholipase A2. Im Unterschied dazu aktiviert die saure SMase den NF- κ B. Es ist kein Crosstalk zwischen den Transduktionswegen der neutralen und sauren SMase ersichtlich⁵⁹. Wiegmann et al postulieren daher eine topologieabhängige Ceramidwirkung⁵⁹.

Die Modulation der Inotropie⁴⁰ und Kontraktionsökonomie⁴² erfolgt über Sphingosin, welches durch Ceramidasen katalysiert aus der Hydrolyse von Ceramid entsteht⁶⁶. Der negativ inotrope Effekt von exogenem Ceramid wird durch den Ceramidaseinhibitor N-oleyletanolamin (NOE), der die Produktion von Sphingosin verhindert, vermindert⁶⁷.

Weiterhin wird die durch Mikroembolisation hervorgerufene TNF- α und Sphingosinkonzentrationserhöhung durch eine Präinkubation mit dem NO-Synthaseinhibitor N[G]-Nitro-L-Arginin-Methylester (L-NAME) verhindert und die kontraktile Dysfunktion vermindert⁶⁸. N-oleylethanolamin (NOE) ein Ceramidaseinhibitor vermindert die kontraktile Dysfunktion nach Embolisation bei erhaltener TNF- α -Induktion aber ausbleibender Sphingosinproduktion. Somit wird für die Mikroembolisation von Thielmann et al ein Signalweg mit NO in der Signalkaskade oberhalb und Sphingosin unterhalb von TNF- α formuliert⁶⁸.

1.3 Glutathion

Glutathion ist ein endogenes Sulfhydryl-Tripeptid und dient der Glutathionperoxidase bei der Reduktion von Peroxiden als Substrat. Dadurch wird die Konzentration freier Radikale vermindert. Das oxidierte Glutathion (Glutathiondisulfid/GSSG) wird daraufhin wieder in einer Reaktion mit NADPH reduziert oder aus der Zelle transportiert. Der Ausstrom von GSSG bzw. die Konzentration in oder außerhalb der Zellen dient als Indikator von Oxidationsstress⁶⁹.

Der Glutathiondonator S-Methylglutathion (GSM) hebt in isolierten Rattenkardiomyocyten die hemmende Wirkung von TNF (25ng/ml) auf den Ca-Transienten auf. Eine Umkehrung eines negativen Effektes auf Inotropie und Ca-Transienten in einen positiven bei 25ng/ml TNF durch N-Acetylcysteingabe (Glutathiondonator) wiesen Cailleret et al in Ratten nach⁴⁶. Eine ähnliche Umkehr der inotropen Effektes konnte auch mit S-Methylglutathion in Kardiomyozyten gezeigt werden⁴⁶.

Unabhängig vom reduzierten/oxidierten Glutathion Verhältnis (GSH/GSSG), wird bei zellulärer Glutathionverminderung die neutrale Sphingomyelinase aktiviert^{62,63,64}.

1.4 Interleukin-1 β

Die ersten Beschreibungen einer erhöhten Interleukin-1 β (IL-1 β) Expression erfolgte für die dilatative Cardiomyopathie⁷⁰. Es wurde dann auch bei Myokardinfarkt⁷¹, KHK⁷², Herzinsuffizienz⁷², viraler Myokarditis⁷³, nach Herztransplantation⁷⁴ und Sepsis (in Kombination mit TNF- α)⁹ beschrieben. Mehrere In-Vitro Untersuchungen zeigten eine dosiabhängige Hemmung der Kontraktilität⁴¹. Zudem ist ein synergistischer Effekt mit TNF- α nachgewiesen⁴¹. Deten et al wiesen eine starke IL-1 β mRNA Expressionsinduktion beginnend eine Stunde nach Ligatur im Rattenmyokardinfarktmodell nach. Die Induktion ist am deutlichsten im Infarktbereich, aber auch im rechts und linksventrikulären nichtinfarzierten Gewebe über 4-fach erhöht. Die Induktion hat ein Maximum nach 12 h und ist ab dem dritten postinfarkt Tag nicht mehr signifikant³. Dabei

sind Myocyten nur zu einem geringen Anteil an der Sekretion beteiligt⁷⁵. Kurze Ischämieepisodes und low-flow Ischämieperfusion lösen ausschließlich in kardialen Fibroblasten eine IL-1 β Induktion aus⁷⁶.

1.4.1 Effekte von IL-1 β auf das kardiovaskuläre System

IL-1 β zeigt In-vivo und In-vitro an isoliertem Myozyten wie an isolierten Herzen einen raschen negativen inotropen und chronotropen Effekt^{77,78}.

Intrakoronare Injektion von 1 μ g/kg IL-1 β induziert bei Hunden eine LV-Dysfunktion^{78, 79}. Die kontraktile Effekte von IL-1 β werden unter anderem durch die Inhibition der β -adrenergen Regulation auf den Calciumeinstrom I_{Ca} bestimmt⁸⁰. Stimulation der β -Rezeptoren erhöht die Phosphorylation von Phospholamban, ein regulatorisches Protein des Sarkoplasmatischen Retikulums (SR). Dies erhöht die Aktivität der Sarkoplasmatischen Retikulum-ATPase (SERCA), was zu einer erhöhten Ca-Aufnahme des SR und zu einem schnellerem cytoplasmatischem Ca-Abfall führt⁸¹. Diese Veränderungen bewirken neben anderen die positiv inotropen Effekte sowie die verkürzte Relaxation im Säugetierherz durch β -Rezeptoragonisten⁸².

1.4.2 Signaltransduktion von IL-1 β

Zwei IL-Rezeptoren wurden bisher kloniert und charakterisiert⁸³. Beide tragen drei extrazelluläre Ig-ähnliche Domänen zur Ligandenbindung. Der IL-Rezeptor Typ II (IL-R_{II}) besitzt weniger als 30 intrazelluläre Aminosäuren. Er löst keine intrazellulären Signale aus und wird als kompetitiver Inhibitor der IL-1-Wirkung gesehen⁸⁴. Somit dient ausschließlich der IL-Rezeptor Typ I (IL-R_I) der Signaltransduktion⁸⁵.

Drei verschiedene Liganden binden an den IL-R_I: IL-1 α , IL-1 β und IL-1ra.

IL-1ra (receptor antagonist) vermittelt keine Signalübermittlung. Zwischen IL-1 α und IL-1 β bestehen keine bekannten relevanten Unterschiede in der Signaltransduktion. Da IL-1 β häufiger induziert und nachgewiesen ist, wird in dieser Untersuchung wie von vielen anderen Gruppen nur IL-1 β untersucht^{86,87}.

An isolierten Kardiomyozyten wurde die Stimulierung der Ceramidproduktion durch IL-1 β innerhalb einer Minute beobachtet. Nach zwei Minuten Inkubation mit IL-1 β (5ng/ml) stieg der Ceramidspiegel um 140 % und blieb für 10 Minuten in dieser Höhe^{88, 89}. Nach Gabe des aktiven Ceramidanalogen C₂-Ceramid (N-Acetyl-D-Erythrosphingosin) verringerte sich wie bei IL-1 β Applikation der Calciumeinstrom I_{Ca} über den L-Type Calciumkanal dosisabhängig um bis zu 44%. Dieser Effekt war reversibel. Weiterhin zeigte sich, dass sowohl IL-1 β als auch C₂-Ceramid die maximale Wirkung auf den L-type Calciumkanal einzeln induzieren können und durch Applikation der jeweils anderen Substanz kein zusätzlicher Effekt messbar ist. Daher postulieren Schreuer et al, dass die Signaltransduktion beider Substanzen (C₂-Ceramid und IL-1 β) über einen gemeinsamen Mechanismus erfolgt⁸⁸.

1.5 Fragestellung

Die TNF- α -Antagonisierung zeigt in Tiermodellen der Herzinsuffizienz sowie in klinischen Studien bei rheumatoider Arthritis gute Erfolge.

Klinische Studien zum Einsatz von TNF- α Antagonisten (Infliximab, ein monoklonale Antikörper und Etanercept ein TNF- α Rezeptorfusionsprotein) bei chronischer Herzinsuffizienz zeigten aber keine klinischen Erfolge und mussten teilweise bei höherer Sterblichkeit im Therapiearm vorzeitig beendet werden.

Ein Ziel dieser Arbeit ist es Ursachen dieser Inkongruenz von klinischen Studien mit den zahlreichen In-Vitro- und Tiermodellen zu finden. Dazu erfolgt neben der Untersuchung der rein mechanischen Effekte eine Messung der Kontraktionsökonomie mittels Sauerstoffverbrauchsmessungen. Diese Messungen wurden erstmals an humanem Myokard durchgeführt um speziesspezifische Phänomene auszuschließen. Es erfolgte die Untersuchung der gleichen Parameter in IL-1 β -Versuchsreihen, das ebenfalls in den beschriebenen Krankheitsbildern nachgewiesen wurde.

Weiterhin wurden Versuchsreihen zur Untersuchung des Signalweges (Sphingomyelinase) und möglicher alternativer Interventionsansätze (Glutathion) unternommen.

2.0 Material und Methoden

2.1 Gewinnung von isolierten humanen Muskelstreifen

Alle verwendeten Myokardstreifenpräparate wurden aus menschlichem Vorhofgewebe präpariert. Dieses Gewebe wurden bei elektiven operativen Eingriffen, die eine extrakorporale Zirkulation erfordern, gewonnen. Die Entnahme erfolgt bei Inzision des rechten Atrium um den abführenden Katheter der extrakorporalen Zirkulation einzubringen. Ausgenommen wurden AV-Klappeneingriffen, bei denen von stark verändertem atrialem Gewebe ausgegangen werden kann. Darüberhinaus wurden Patienten mit prä- oder intraoperativ nachgewiesenem Vorhofflimmern aufgrund veränderter elektrischer Stimulierbarkeit ausgeschlossen. Die Patienten wurden vor dem Eingriff über die Möglichkeit der wissenschaftlichen Verwendung des Vorhofgewebes, das unabhängig von der experimentellen Verwendung entnommen wurde, aufgeklärt. Das Einverständnis wurde auf dem Aufklärungsbogen für den operativen Eingriff gesondert dokumentiert.

Dieses Gewebe wurde unmittelbar nach Entnahme in eine auf Eis gelagerte, vorher mit Carbogen (95 % O₂, 5% CO₂) durchperlte, Krebshenseleit-2,3 Butan-Dion-Monoxid (KHS-BDM)-Lösung (Tabelle 1) gegeben. Unmittelbar nach dem Transport aus dem Operationstrakt wurde das Präparat blutleer gespült und in eine frische KHS-BDM Lösung gegeben. Die anschließende Präparation wurde in carbogen-durchperlter Lösung unter einem Stereomikroskop mit 10-facher Vergrößerung mit Hilfe mikrochirurgischer Scheren und Pinzetten vorgenommen unter weitgehender Vermeidung von Zug- und Scherkräften.

Zusammensetzung der Krebshenseleit-BDM Lösung (KHS-BDM Lsg)

NaCl	116,1 mmol/l
KCl	5,0 mmol/l
MgCl ₂ (6H ₂ O)	1,2 mmol/l
Na ₂ SO ₄	1,2 mmol/l
NAH ₂ PO ₄ (H ₂ O)	2,0 mmol/l
NAHCO ₃	18,0 mmol/l

Glucose	11,2 mmol/l
CaCl	0,25 mmol/l
2,3 Butan-Dione-Monoxid (BDM) 30	mmol/l
(BDM nur während des Transports und der Präparation)	
Chemikalien von Sigma (Deissenhofen)	

Dabei wurden im Durchmesser 150 bis 300 μm und in der Länge 3 bis 4 mm messende Präparate gewonnen. In vorhergehenden Versuchen zeigte sich kein Unterschied in den Messwerten, bei optischer Bestimmung des Durchmessers oder Berechnung der Faserfläche über die Länge und Gewicht der Streifen, so dass die mittels des Maßstabsokular des binokular Mikroskops gemessenen Werte eingesetzt wurden.

2,3 Butan-Dion-Monoxid (BDM) wurde für Transport und Präparation zugesetzt, um eine Schädigung des Gewebes durch massive Calciumfreisetzung zu verhindern. Der protektive Effekt beruht auf einer Inhibition der myofibrillären ATPase und verhindert Kontraktionen trotz einer aufgrund der Präparation erhöhten intrazellulären Ca-Konzentration^{90,91}. Die BDM-Effekte sind nach auswaschen vollständig reversibel⁹¹.

2.2 Versuchsaufbau für Messungen an isolierten Muskelstreifen

In Abbildung 1.1 ist der Aufbau der Perfusionskammer (2,5 mm Innendurchmesser) mitsamt der Sauerstoffsonde für die nachfolgend beschriebenen mechanischen Messungen und Sauerstoffverbrauchsmessungen wiedergegeben. Die Apparaturen stammen soweit nicht anders angegeben von Scientific Instruments, Heidelberg. Die Präparate wurden nach Präparation zweimalig mit BDM-freier KHS-Lösung überspült, und dann im spannungslosen Zustand L_0 zwischen zwei Klemmen in der bereits KHS befüllten Perfusionskammer zwischen Kraftmesser und Mikropinzette mit Mikrometerschraube fixiert. Die zunächst vorhandene Ca-Konzentration von 0,25 mmol wurde mittels Zugabe von 1molarer CaCl-Lösung auf 1,25 mmol angehoben. Somit befand sich der Streifen kontinuierlich nach Entnahme in calciumarmer KHS-Lösung, die bis zur Fixation in der

Messkammer 30 mmol/l BDM enthielt. Diese wurde in der Apparatur im doppelwandigen Vorratsgefäß mittels Wasserbadheizung auf 39°C vorgeheizt und mit Carbogen durchperlt. Zwei Temperaturregeleinheiten - eine vor und eine in der Messkammer - hielten, die mittels einer Rollenpumpe beförderte Perfusionslösung, in der Messkammer konstant auf 37°C. Die genaue Regulation ist in Anbetracht der Temperaturabhängigkeit der Kontraktilität und der Sauerstoffmessung notwendig. Die Flussgeschwindigkeit war bei allen Versuchen identisch und stellte die gleichbleibende Sauerstoffsättigung sicher (Sauerstoffpartialdruck 540 mm Hg). In einer 10 minütigen Äqilibrierungsphase wurden das Perfusat und der Muskelstreifen in der Kammer auf die angestrebten 37° C temperiert. Dann wurde mit der elektrischen Stimulation (Stimulator-Typ 215/I, Hugo-Sachs Elektronik) begonnen. Es wurde ein 5 ms dauernder Rechteckimpuls mit einer Frequenz von 1 Hz und einer Spannung 20 % oberhalb der Reizschwelle (2 – 3,5 mV) eingesetzt. Im Anschluß wurde der Kraftaufnehmer im spannungslosen Zustand L_0 auf Null geeicht. Dann wurde der Streifen mittels einer Mikrometerschraube, die die Position der rechte Klemmen im Bezug zum linksseitigen Kraftaufnehmer verändert, von L_0 bis zu einer optimalen Kraftentwicklung bei L-max gedehnt. Dies entspricht der Länge, bei der durch weitere Dehnung kein nennenswerter Kraftzuwachs messbar ist.

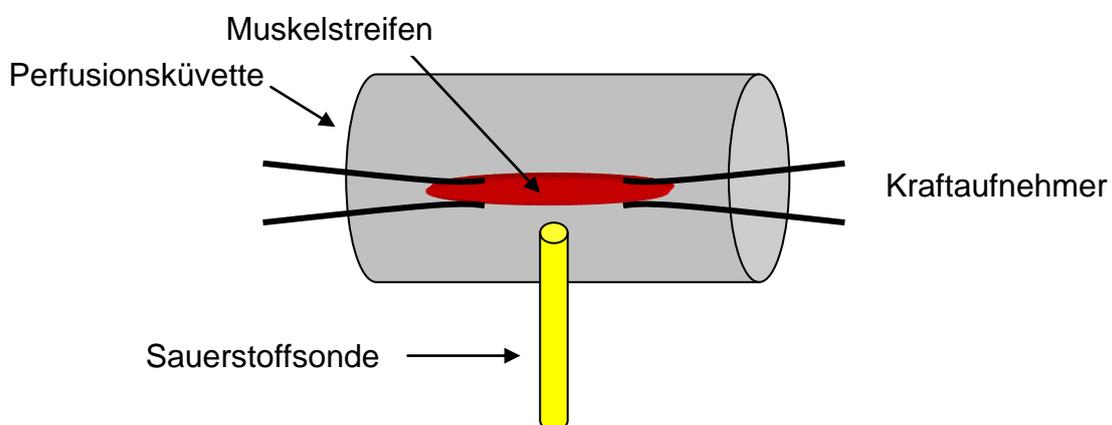


Abb. 1.1. Schema des Versuchsaufbaus

2.2.1 Aufzeichnung der mechanischen Daten und Versuchsdurchführung

Der verwendete Kraftaufnehmer kann einwirkende Kräfte von $0,2\mu\text{N}$ bis 100 mN messen. Die Messdaten wurden mittels eines Flachbettsschreibers (Kipp & Zonen, BD 41) und über ein Interface von der Software „Twitch“ (Scientific Instruments Heidelberg) aufgezeichnet. Die gemessene Kraft wurde auf den Streifenquerschnitt bezogen als $\mu\text{N}/\text{mm}^2$ angegeben.

Die vom Kraftaufnehmer gemessene isometrische Kontraktion stellt im physikalischen Sinn keine mechanische Arbeit dar, da kein Weg zurückgelegt wird. Dennoch erhöht diese Haltearbeit den Energieumsatz im Vergleich zu Ruhebedingungen. Es konnte gezeigt werden, dass unter isometrischen Kontraktionsbedingungen das Integral der über die Zeit registrierten Kraft (Force-Time-Integral, FTI) ein gutes Äquivalent der Arbeit darstellt⁹². Das Programm „Twitch“ ermittelt aus den während der Messperiode gemessenen Kontraktionen, einen Mittelwert dieses Integrals als $\text{mN}\cdot\text{s}/\text{s}\cdot\text{mm}^2$.

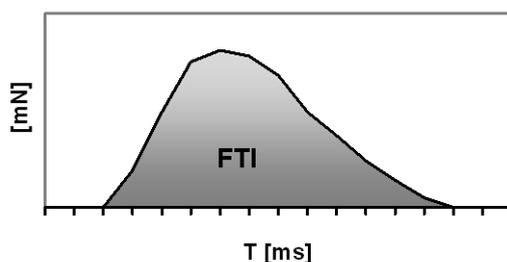


Abb 2. Kraft-Zeit-Integral / Force-Time-Integral (FTI)

Nach einer kontinuierlichen Stimulation mit 1 Hz über 45 Minuten (Einschlagphase), bei der es in mindestens den letzten 20 Minuten zu keiner Veränderung der entwickelten Kraft kam wurde mit dem eigentlichen Versuchsprotokoll begonnen. Die Stimulationsfrequenz wurde in Schritten von $0,33\text{ Hz}$ in vier Stufen bis zu einer maximalen Frequenz von $2,33\text{ Hz}$ ($60 - 140/\text{min}$) erhöht. Bei jeder der fünf Frequenzstufen wurde in einem 25 Sekunden dauerndem Messverfahren der Sauerstoffverbrauch (s.u.) sowie simultan die entwickelte Kraft in verschiedenen Parametern (FTI, Amplitude,

Relaxationsgeschwindigkeit) mit „Twitch“ aufgezeichnet. In den paarig angelegten Versuchen wurde zunächst unter Kontrollbedingungen dann nach Zusatz einer Substanz in die Perfusionslösung in den beschriebenen fünf Frequenzen gemessen. Zeigte ein Streifen einen abrupten Abfall der erzielten isometrischen Kraft z.B. aufgrund einer spontan veränderten Dehnung in der Apparatur oder durch Perfusionsänderungen durch Luftblasen in der Kammer wurde der Versuch abgebrochen.

2.2.2 Versuchsaufbau für Sauerstoffverbrauchsmessungen

Aufbau und Messprinzip

Die Ermittlung des Sauerstoffverbrauchs erfolgte über den Abfall des Sauerstoffpartialdrucks im Perfusat während eines 25 sekündigen Messintervalls. Bei Unterbrechung der Perfusatströmung durch Ausschalten der Rollenpumpen sinkt der Sauerstoffpartialdruck durch den Verbrauch des Myokards. Aufgrund der Diffusionsabhängigkeit ergibt sich ein zum Myokard hin abnehmender Partialdruck. Die Messung des Partialdrucks erfolgt mittels einer Clarkschen Sauerstoffsonde (Abb.3)

Die Kathode, ein Golddraht mit einem Durchmesser von 50 μm , liegt innerhalb einer isolierenden 0,8 mm dicken Glaskapillare, die wiederum von einem Silberrohr, der Anode umgeben ist. Die in Glas eingefasste Goldkathode überragt das Silberrohr um etwa 0,5 mm und ist an der Spitze mit einer Kunststoffschicht bedeckt.

Dieser Kunststoffmantel dient als Diffusionsbarriere, die selektiv für O_2 permeabel ist. Der Sauerstoff an der Kathode wird zu OH^- reduziert, während an der Anode eine Oxidation des Silbers zu AgCl stattfindet. Durch diese Redoxreaktion werden für jedes Sauerstoffmolekül vier Elektronen amperometrisch wirksam. Der entstehende Polarisationsstrom ist somit proportional zum Sauerstoffpartialdruck der die Sondenspitze umgebenden Lösung.

Da an der Sonde selbst geringe Mengen Sauerstoff verbraucht werden, entsteht bei stehender Lösung ein Partialdruckgefälle um die Elektrode. Somit

ist der gemessene Partialdruck im ruhenden Perfusat geringer als im strömenden.

Dies kommt besonders direkt nach Unterbrechung der Perfusion als Röhreffekt mit zum Sauerstoffverbrauch überproportional abfallenden Messwerten zu tragen. Daher erfolgt die rechnerische Ermittlung des tatsächlichen Verbrauchs im zweiten gleichmässig abfallenden Teil der Kurve. Der in dieser Phase auftretende zusätzliche Verbrauch wird von der Software mittels gespeicherte Vergleichsmessungen vom gemessenen Partialdruckabfall abgezogen.

Zur Messung des Sauerstoffverbrauch dient der Abfall des Partialdrucks, ermittelt über den Sondenstrom während einer 25 sekündigen Unterbrechung der Perfusion. Die Steigung des Messkurve nach dem initial auftretenden Röhreffekt ist dabei zum Verbrauch proportional. Der an der Messstelle herrschende Partialdruck ist sowohl vom Verbrauch als auch diffusionsabhängig vom Abstand zur Verbrauchsstelle entsprechend des Fickschen Diffusionsgesetzes abhängig. Diese vom Sondenabstand abhängige Relation ist ebenfalls für einen Bereich von 50 bis 200 μ m in der Software integriert. In jeder vorgenommenen Messreihe wurde unter mikroskopischer Kontrolle ein Abstand von 100 μ m eingestellt und in die Software entsprechend eingegeben. Die darüber hinaus beeinflussenden Faktoren wie Löslichkeitskoeffizient, Messkammervolumen, Durchmesser des Muskelstreifens und Sauerstoffpartialdruck, bestimmt mit einem Blutgasanalysator (Radiometer, Kopenhagen), wurden ebenfalls eingegeben und von der Software berücksichtigt. Die Angabe des Sauerstoffverbrauchs erfolgt in ml [O₂]/ mm³ /min.

2.2.3 Auswertung der Sauerstoffverbrauchsmessungen

Suga et al, Meyer und Keweloh konnten eine lineare Korrelation zwischen myokardialem Sauerstoffverbrauch und dem Kraft-Zeit-Integral für intaktes humanes Myokard zeigen^{93,92}. Aufgrund dieser Beziehung lässt sich in einem x-y-Koordinatensystem eine Regressionsgerade bestimmen. Diese ermöglicht über die Höhe des Y-Achsenabschnitts eine Bestimmung des basalen

Sauerstoffverbrauchs ohne aktive Kontraktion. Die Steigung stellt dagegen ein Maß für den Anstieg des Sauerstoffverbrauchs proportional zur aktiven Kraftentwicklung dar. Damit lässt sich auch über die invertierte Geradensteigung die Effizienz des aktiven Kontraktionsprozesses, also der chemo-mechanischen Konversion, ablesen. Der Quotient Sauerstoffverbrauch/FTI, der spezifische Sauerstoffverbrauch während einer definierten Kontraktionsleistung, ermöglicht dagegen nicht die Ableitung des basalen Sauerstoffverbrauchs.

2.3 Effekte von Tumornekrosefaktor- α und Interleukin-1 β

Zur Untersuchung der Effekte von Tumornekrosefaktor- α und Interleukin-1 β auf Mechanik und Energetik des Muskelstreifenpräparates wurde rekombinanter humaner TNF- α und rekombinantes humanes IL1- β (R&D Systems) verwendet. Das Cytokin wird als Lyophilisat geliefert und wurde gemäß Herstellerangaben in PBS-Lösung mit 0,1 % bovinem Serumalbumin gelöst. Die Cytokinlösung wurde in Einzelportionen als Stocklösung mit einer Konzentration von 10 μ g/ml bei -20° für max. 3 Monate aufbewahrt.

2.4 Mechanische Messungen unter Glutathion

Zur Untersuchung der Effekte von TNF- α und IL1- β unter Glutathionperfusion auf die mechanischen Parameter des Muskelstreifenpräparates wurde Glutathion (Sigma) als Festsubstanz in der KHS-Lösung gelöst um eine 10 μ molar Lösung zu erhalten.

Die Muskelstreifen wurden sowohl während der 45 minütigen Einschlagphase, zwischen Fixation in der Apparatur und vor der Zugabe von TNF- α und IL1- β , als auch im restlichen Versuchsprotokoll kontinuierlich mit einer Frequenz von 2 Hz stimuliert. Ab Beginn der Einschlagphase bis zum Ende aller Messungen wurde in der Glutathiongruppe eine KHS-Perfusionslösung mit 10 μ M Glutathion verwendet. In der Kontrollgruppe wurden die Messungen und Cytokingaben zu den gleichen Zeitpunkten durchgeführt. Vor und nach Zugabe der Cytokine erfolgte die Messung der mechanischen Daten (Amplitude der isometrischen

Kontraktion, diastolische Kraft, Relaxationsgeschwindigkeit, Zeit von Kraftmaximum bis 50% [t50down]) zunächst 5, 10, 15 und 20 Minuten nach 5 ng/ml TNF- α dann 5, 10, 15 und 20 Minuten nach einer zusätzliche Gabe von 1 ng/ml IL1- β .

2.5 Messung der Sphingomyelinaseaktivität

Die Messung der neutralen und sauren Sphingomyelinaseaktivität erfolgte jeweils für ein Cytokin und einen pH-Bereich in zwei verschiedenen Dosen am atrialen Gewebe eines Patienten. Dazu wurde das entfernte Herzohr wie oben beschrieben transportiert und unter Sicht präpariert. Die gewonnenen Streifen wurden dann jeweils in drei Gefäße gegeben. In der Kontrollgruppe erfolgte eine Inkubation bei 37°C mit Carbogen durchperlter KHS-Lösung für 15 Minuten. In den beiden anderen Gefäßen wurden die Streifen mit zwei unterschiedlichen Dosen der Cytokine ebenfalls über 15 Minuten inkubiert. (0,5 ng/ml, 5ng/ml TNF- α ; 0,1 ng/ml, 1 ng/ml IL-1 β). Anschließend wurden die Proben mittels flüssigem Stickstoff gekühlt und für die nach Inkubation aller Streifen erfolgte Messung der Sphingomyelinaseaktivität bei -80°C gelagert. Die Messung wurde mit dem kommerziellen Amplex Red Sphingomyelinase Assay Kit A-12220 (Molecular Probes, Eugene, OR, U.S.A.) durchgeführt.

Zunächst wurden die Muskelstreifen folgendermaßen vorbereitet.

Das Gewebe wurde in 50 μ l Lysispuffer (pH 7,5) gelöst (10mMol Tris-HCl, 1mMol EDTA, 0,1% Triton X-100). Dann erfolgte die Messung der neutralen und sauren Sphingomyelinaseaktivitätsmessung aufgrund der unterschiedlichen pH-Bereiche der Reaktionslösung in zwei vollständig getrennten Messreihen.

50 μ l des Reaktionspuffers (pH 7,4) mit
100 μ M 10-Acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazin (Amplex Red Reagenz)
2 IE/ml Meerrettich-Peroxidase
0,2 IE/ml Cholinoxidase
8 IE/ml alkalische Phosphatase
0,5 mM Sphingomyelin
0,2% Triton X-100

0,1 M Tris-HCl

10 mM MgCl

wurden zu den in 50 µl Lysispuffer gelösten Proben gegeben und diese für 30 Minuten bei 37°C inkubiert.

Dabei entsteht folgender Reaktionsablauf:

Sphingomyelinase hydrolysiert Sphingomyelin zu Ceramid und Phosphorylcholin. Alkalische Phosphatase hydrolysiert Phosphorylcholin. Cholin wird von Cholinoxidase zu Betain und Wasserstoffperoxid (H₂O₂) oxidiert. Schließlich reagiert H₂O₂ in Anwesenheit von Meerrettich-Peroxidase mit Amplex Red (10-Acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazin) in einer 1:1 Stöchiometrie zu einem stark fluoreszierendem Produkt: Resorufin. Dies hat ein Absorptionsmaximum bei 563 nm und ein Fluoreszenzemissionsmaximum bei 587nm welches fluoreszenzspektrometrisch gemessen wird. Die Messung erfolgte mit Fluoreszenzmessung bei einer Exzitationswellenlänge von 540nm und einer Emissionswellenlänge von 590 nm. Im Vorfeld wurden mittels einer Sphingomyelinase von Staphylococcus sp. (Molecular Probes) am selben Fluoreszenzspektrometer eine Standardkurve der Regressionsgeraden der Exzitation und Sphingomyelinaseaktivität ermittelt. Diese im Fluoreszenzspektrometer gespeicherten Werte wurden genutzt um die aus den Muskelstreifenproben erhaltenen Fluoreszenzwerte mit einer Sphingomyelinaseaktivität zu korrelieren.

Messung der sauren Sphingomyelinase:

Da die saure Sphingomyelinase ein pH-Optimum von 5,0 aufweist werden die Proben für 30 Minuten bei 37°C mit einem 50 mM Natriumacetatpuffer, der eben diesen pH-Wert aufweist und zusätzlich 0,5 mM Sphingomyelin enthält, inkubiert. Danach wird eine Reaktionslösung, die sich von der oben beschrieben nur durch einen alkalische 100 mM Tris-HCl-Puffer, und das Fehlen des bereits zugesetzten Sphingomyelin unterscheidet. Der Tris-HCl Puffer neutralisiert die Reaktionslösung auf einen pH-Wert von 7,0, was notwendig ist, da das entstehende Produkt Resorufin ein pH-abhängiges Absorptionsmaximum aufweist. (Bei einem pH-Wert < 6 wird es kurzweilliger).

Die Angabe der Aktivität erfolgt in $\mu\text{U}/\text{mg}$ Protein. Eine Einheit Sphingomyelinase wird in diesem Assay als die Menge SM definiert, die $1\mu\text{Mol}$ Sphingomyelin/min bei einem pH-Wert von 7,4 und 37°C hydrolysiert.

Patientendaten nach Versuchsreihe

Versuchsreihe	TNF	IL	Glutathion (KHS)	Glutathion (Glu)	Sphingomyelinase
Altersspanne	37 - 74	44 - 77	65 – 81	48 – 79	56 – 80
Durchschnittsalter	56,3	63,5	72,8	65,5	69,6
Geschlechtsverhältnis Männl. /Weibl.	7 / 0	4 / 4	5 / 0	7 / 0	6 / 7
ACVB	5	8	2	4	11
Aortenersatz	1	0	0	0	0
Aortenklappenersatz	1	0	1	1	2
Anzahl der Patienten	7	8	3	5	9
Anzahl der Präparate	7	8	5	6	13

2.6 Statistische Auswertung

Die Daten wurden mittels „Excel“ ausgewertet. Alle mechanischen Daten wurden dabei von „Twitch“ als exportfähige Dateien übertragen. Die Sauerstoffverbrauchswerte wurden in einem zusätzlichen PC der nur zum Betrieb des Sauerstoffverbrauch ermittelnden „Oxc“ genutzt wurde separat gespeichert und manuell in die entsprechenden Exeldateien eingefügt.

Die statistische Auswertung erfolgte mittels WinStat (Benecke & Schwippert; Staufen). Signifikanzen wurden für paarige abhängige Stichproben mit dem Vorzeichen-Rang-Test (Wilcoxon), für unabhängige Stichproben mit dem Mann-Whitney U-Test, für den Vergleich mehrerer abhängiger Stichproben mit ANOVA for repeated measurements (Analysis of Variance) ermittelt.

Alle Daten werden als Mittelwert \pm mittlerer Fehler des Mittelwertes (Mean \pm SEM) dargestellt. Ein Wert von $p < 0,05$ wird als statistisch signifikanter Unterschied angenommen. Ein positives Votum der Ethikkommission der Universität Würzburg für die Verwendung von humanem Gewebe liegt vor.

3. Ergebnisse

3.1 Effekte von TNF- α auf die isometrische Kraftentwicklung

5ng/ml TNF- α verringert die aktiv unter isometrischen Bedingungen geleistete Kraft. Dieser Effekt ist nach zehnmütiger Stimulation signifikant und noch ausgeprägter nach weiteren 20 Minuten. Abbildung 3.1a zeigt die frequenzabhängige Reduktion der registrierten Amplituden nach 10 und 30 Minuten in Bezug auf die Kontrollwerte, die nach 10 Minuten zwischen $25 \pm 4\%$ und $36 \pm 4\%$ und nach 30 Minuten zwischen $42\% \pm 4\%$ und $53\% \pm 5\%$ liegt. Die deutlichste Reduktion tritt bei einer Stimulationsfrequenz von 80/min nach 30 minütiger Inkubation mit $53\% \pm 5\%$ auf.

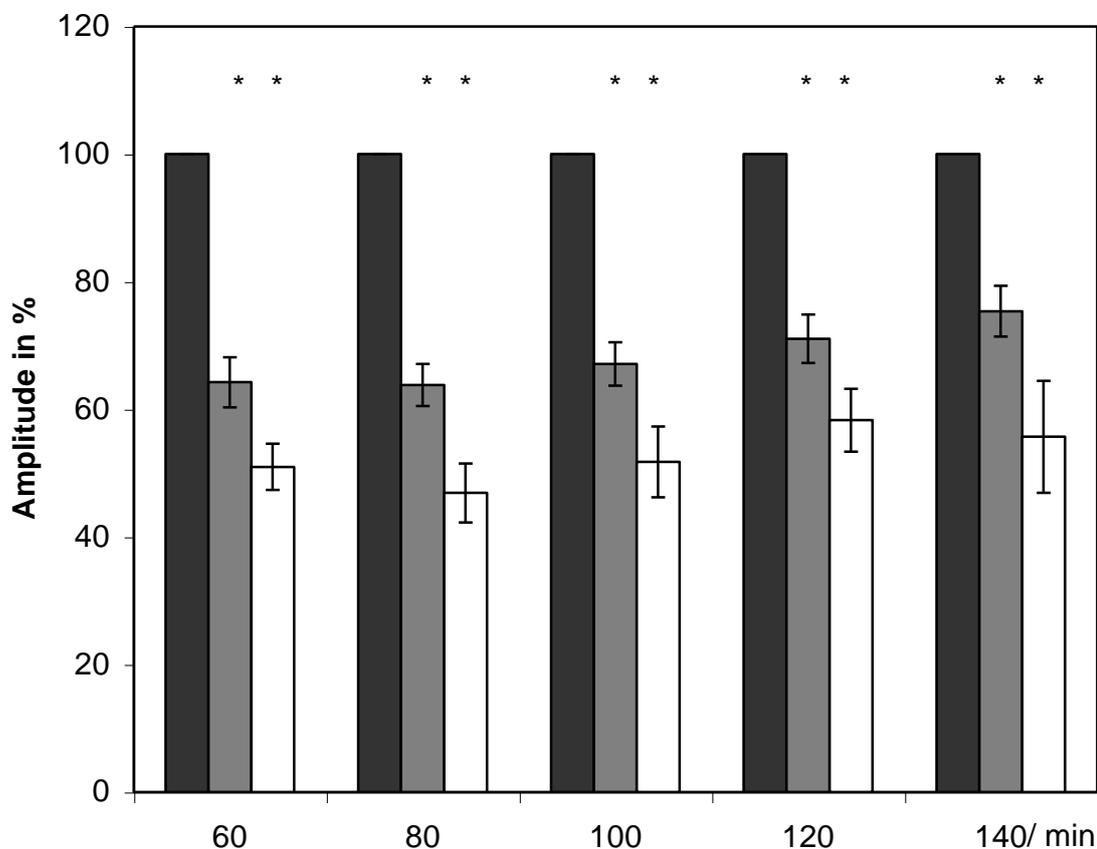


Abb. 3.1a: Isometrische Kraft in Bezug zur Kontrollgruppe Y-Achse: Amplitude in % zur Kontrolle. X-Achse: Stimulationsfrequenzen (Schläge pro

Minute). Schwarz: Kontrollgruppe. Grau: 10 Minuten nach TNF- α . Weiß: 30 Min. nach TNF- α , n = 7, Mittelwerte \pm SEM P < 0,05

In der diastolischen Kraftentwicklung ergibt sich bei allen Frequenzen ein geringer tendenzieller Anstieg ohne statistische Signifikanz.

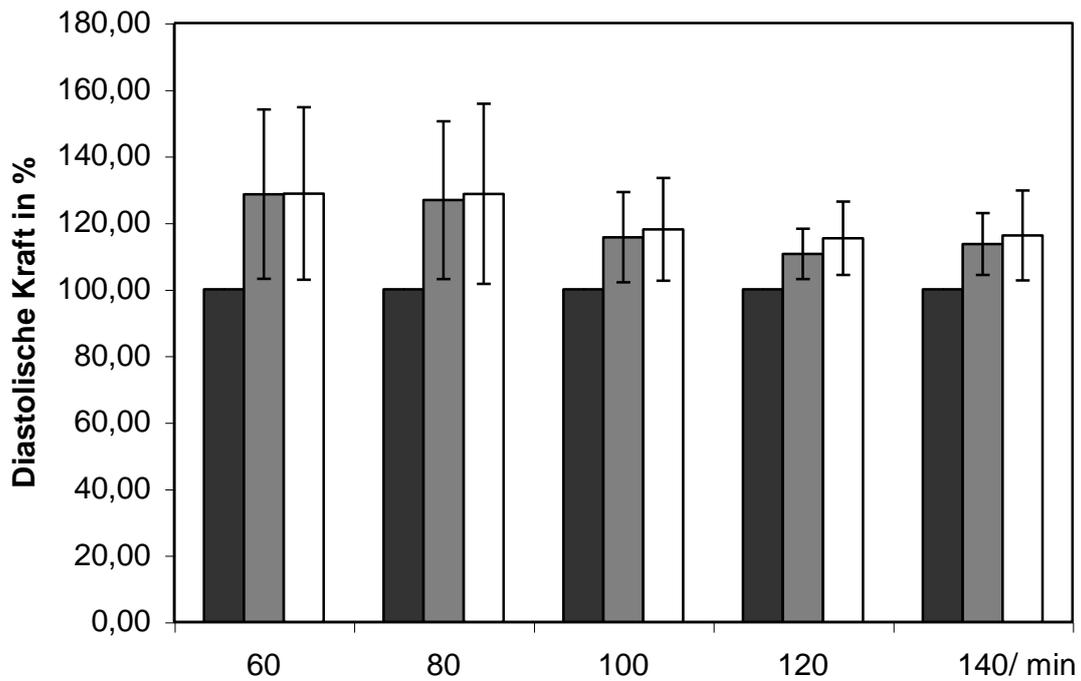


Abb. 3.1b Diastolische Kraft in Bezug zur Kontrollgruppe. Y-Achse: Diastolische Kraft in % zur Kontrolle. X-Achse: Stimulationsfrequenzen (Schläge pro Minute). Schwarz = Kontrolle, Grau = 10 Min. nach TNF α 5 ng/ml, Weiß = 30 Min. nach TNF- α , n = 7, Mittelwerte \pm SEM

3.2 Effekte von IL 1-β auf die isometrische Kraft

Bei IL 1-β (1ng/ml) trat nach 10 Minuten eine signifikante Reduktion der isometrischen Kraft zwischen $27 \pm 5 \%$ und $40 \pm 7 \%$ und nach 30 Min zwischen $43 \pm 6 \%$ und $54 \pm 8 \%$ ein. Die negativ inotrope Wirkung ist bei einer Stimulationsrate von 80/min am stärksten und bei 140/min am geringsten ausgeprägt.

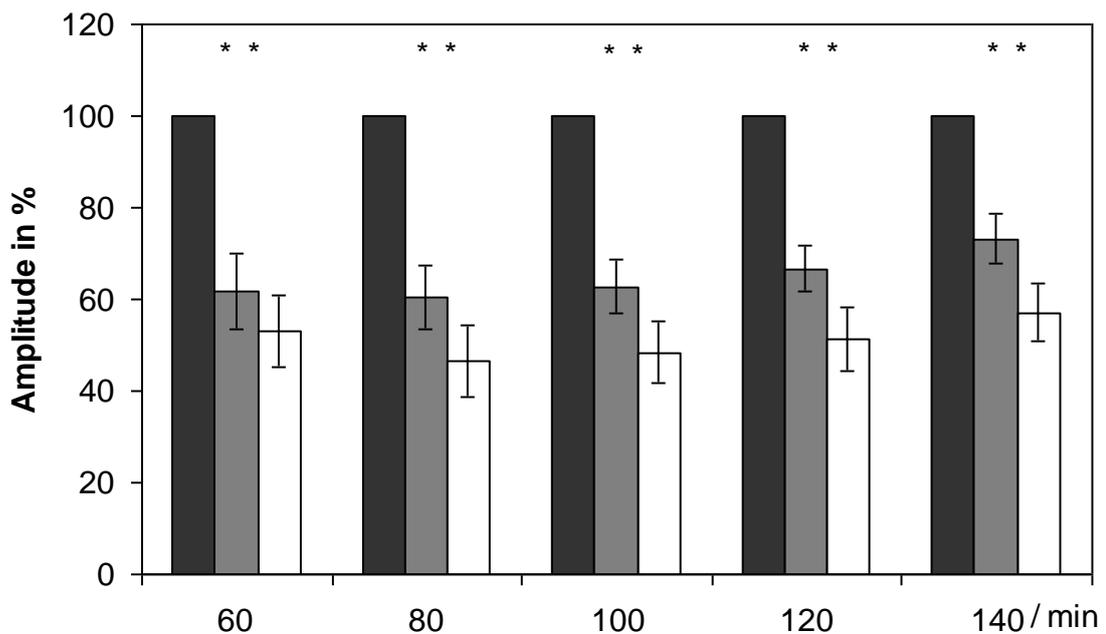


Abb. 3.2a Isometrische Kraft in Bezug zur Kontrollgruppe Y-Achse: Amplitude in % der Kontrollgruppe. X-Achse: Stimulationsfrequenzen (Schläge pro Minute). Schwarz: Kontrollgruppe. Grau: 10 Min. nach IL-1β Weiß: 30 Min. nach IL -1β. ,n = 8, P < 0,05 Durchschnittswerte ± SEM

Es zeigt sich hier eine signifikante Erhöhung der diastolischen Kraft nach 30 Minuten IL-1 β bei den Frequenzen 120/min und 140/min von $46,1 \pm 20,3 \%$ und $57,4 \pm 20,4 \%$.

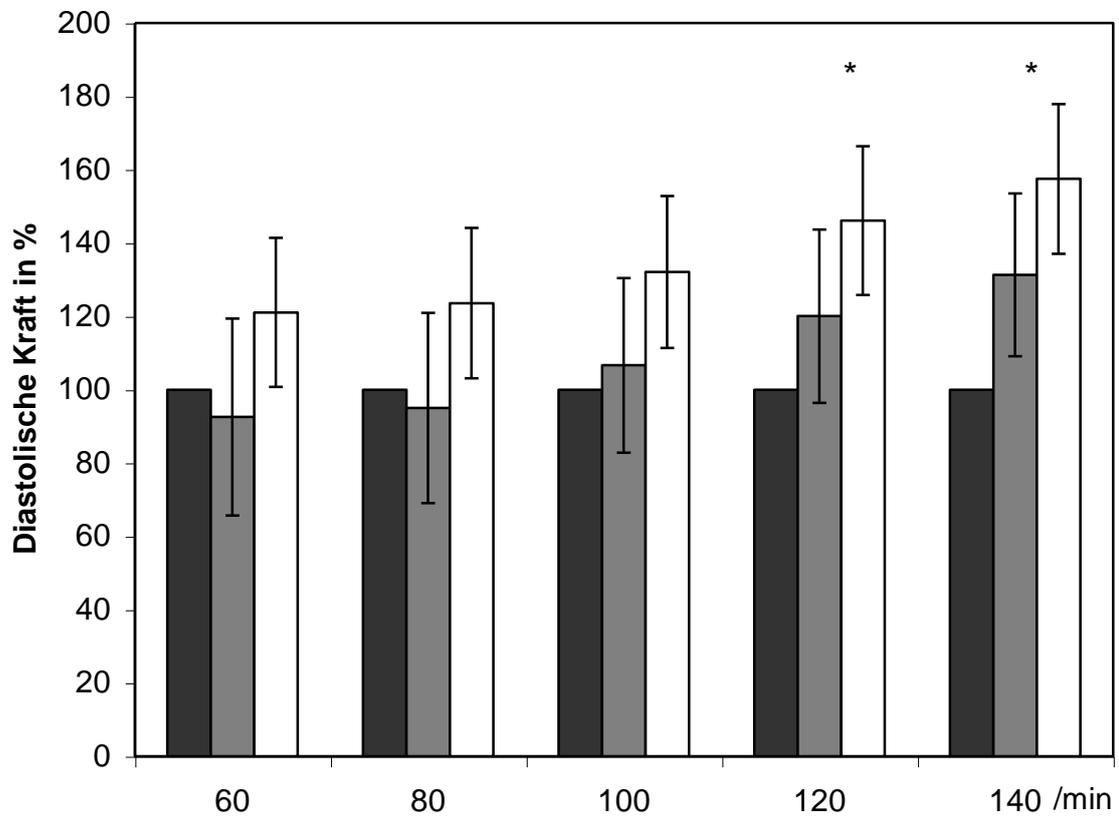


Abb. 3.2b Diastolische Kraft in Bezug zur Kontrollgruppe. Y-Achse: Diastolische Kraft in % zur Kontrolle. X-Achse: Stimulationsfrequenzen (Schläge pro Minute). Schwarz = Kontrolle, Grau = 10 Min. nach IL-1 β 1 ng/ml, Weiß = 30 Min. nach IL-1 β , *P < 0,05 n = 8, Mittelwerte \pm SEM

3.3 Relaxationszeit

Die gemessene Relaxationszeit weist keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen auf.

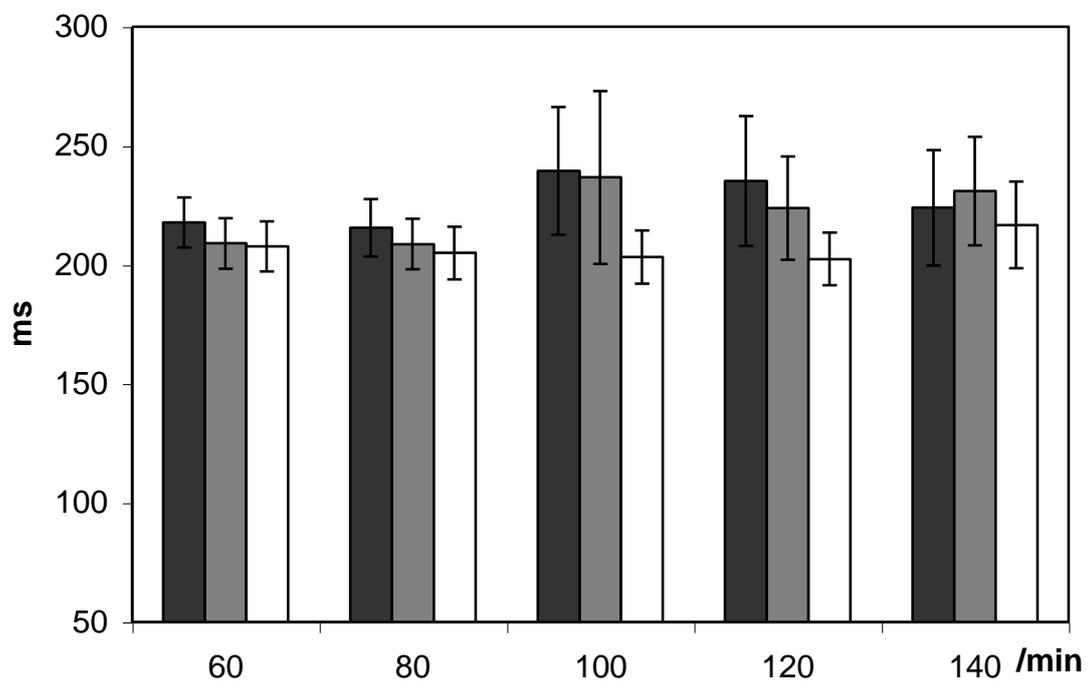


Abb. 3.3a Relaxationszeit (Abfall auf 50% der Maximalamplitude)

Schwarz = Kontrolle, Grau = 10 Min. nach TNF α 5 ng/ml, Weiß = 30 Min. nach TNF- α , n = 7, Mittelwerte \pm SEM

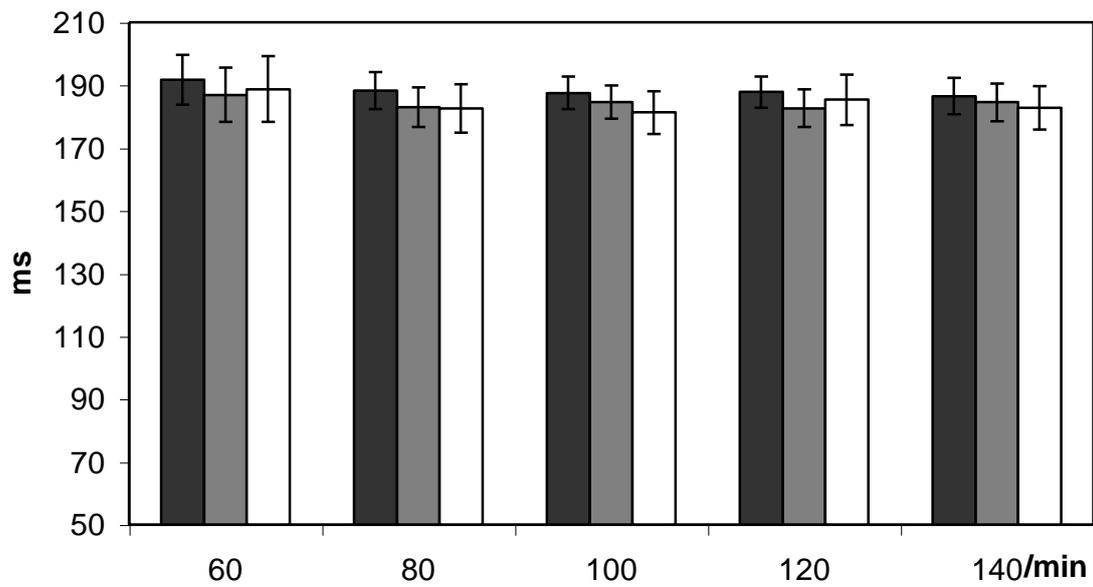


Abb. 3.3b Relaxationszeit (Abfall auf 50% der Maximalamplitude) Schwarz = Kontrolle; Grau = 10 Min. nach IL -1 β 1 ng/ml; Weiß = 30 Min. nach IL -1 β ,n = 8, Mittelwerte \pm SEM

3.4 Einfluss beider Cytokine auf die myokardiale Energetik

In allen Experimenten ergab sich eine lineare Korrelation zwischen MVO_2 und FTI. Über den negativ inotropen Effekt hinaus zeigt sich eine deutliche Wirkung von TNF (5 ng/ml) und IL 1- β (1ng/ml) auf die myokardiale Energetik. Beide Cytokine bewirken eine signifikante Erhöhung des spezifischen Sauerstoffverbrauchs, dies drückt sich bei Auftragung der Messpunkte der jeweiligen Frequenzen in einer steileren Regressionsgeraden aus. Dieser Anstieg war im Gegensatz zum mechanischen Effekt erst nach 30 Minuten signifikant.

Der basale Sauerstoffverbrauch - unabhängig von der isometrischen Kraftentwicklung - der aus dem Y-Achsenabschnitt abgeleitet werden kann, wurde durch die Cytokine nicht signifikant verändert.

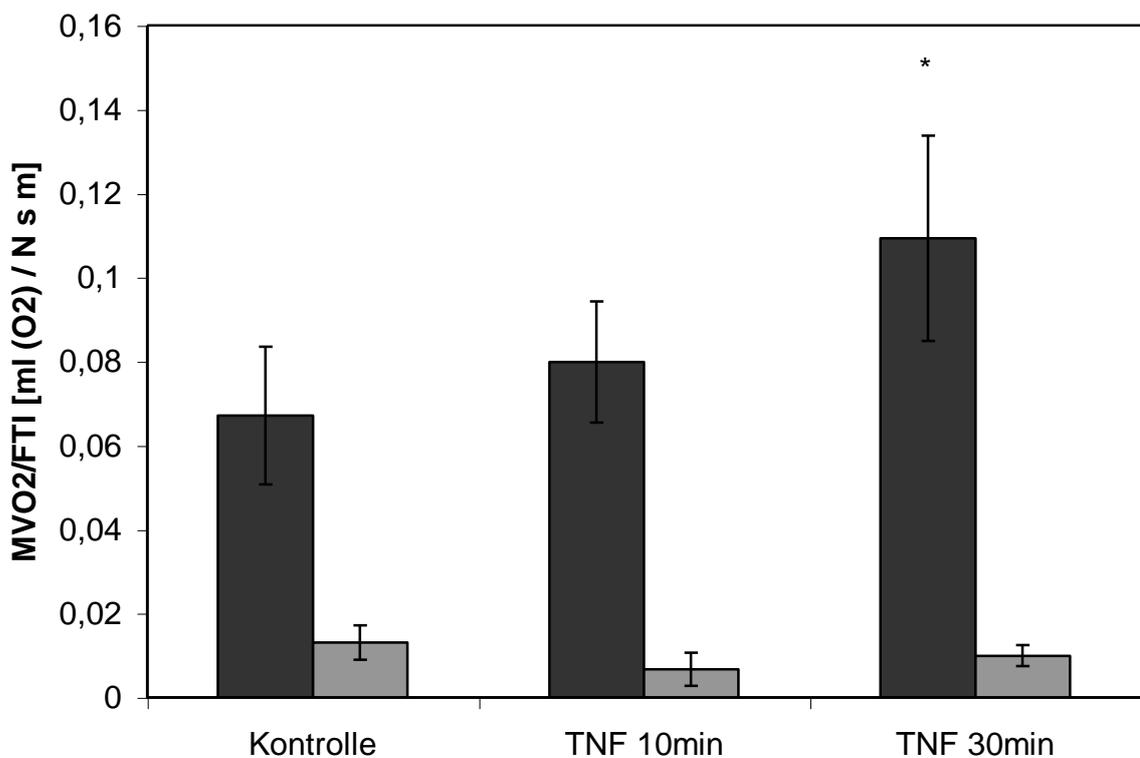


Abb. 3.4a Steigung der Regressionsgeraden [MVO₂/Force-Time-Integral(FTI)] unter Perfusion mit TNF- α 5ng/ml nach 10 Minuten / 30 Minuten, Kontrolle vs. TNF- α 30 Minuten 0.66 vs. 1.09, * P < 0,05 , n = 7, Mittelwerte \pm SEM.

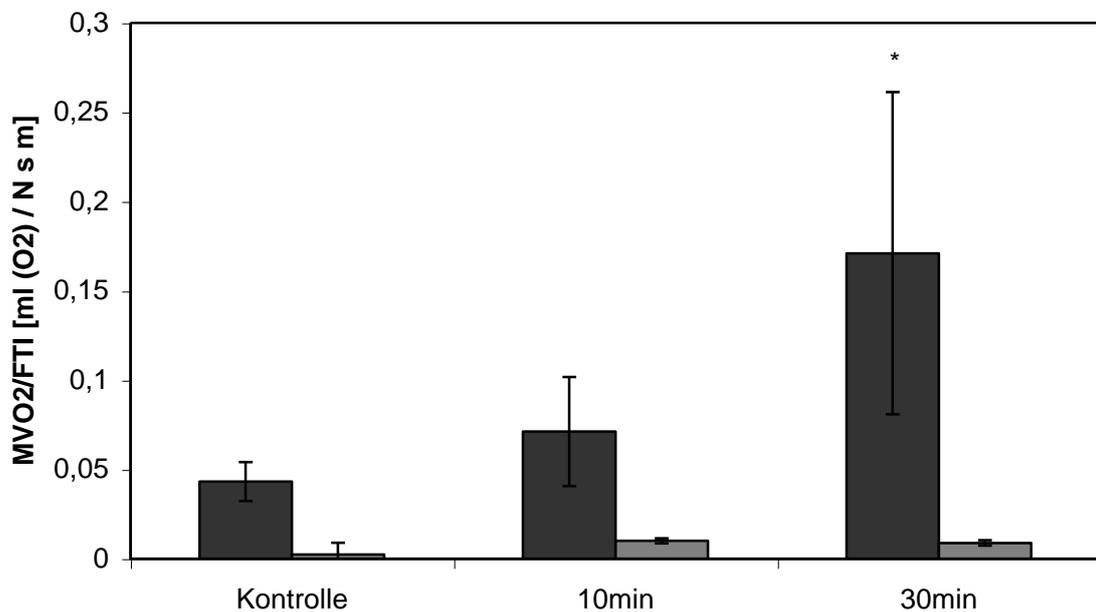


Abb. 3.4b Steigung der Regressionsgeraden [MVO₂/Force-Time-Integral(FTI)] unter Perfusion mit IL-1 β 1ng/ml nach 10 Minuten / 30 Minuten, Kontrolle vs. IL-1 β 30 Minuten = 0.44 vs. 1,71, * P = 0.018, n = 7, Mittelwerte \pm SEM,

3.5 Effekte von TNF- α und IL 1- β unter Glutathion

Der negativ inotrope Effekt von TNF- α und IL-1 β wurde durch die kontinuierliche Perfusion der Muskelstreifen mit 10 μ mol Glutathion ab 45 Min. vor und während der Cytokinperfusion vollständig aufgehoben. Nach 20 minütiger TNF- α (5ng/ml) Perfusion zeigte sich ohne Glutathion eine Reduktion der Amplitude auf 70 ± 6 % und mit Glutathion eine nur minimale Reduktion auf 97 ± 1 %. Weitergehend zeigte sich auch bei einer zusätzlichen IL-1 β Zugabe (1ng/ml) kein zusätzlicher Effekt auf die systolische Kraftentwicklung in der Glutathionreihe. Dagegen gab es in der Kontrollgruppe bei zusätzlicher Zugabe von IL-1 β in Kombination mit der längeren Einwirkungszeit des TNF- α eine weitere Reduktion der Kraft auf 58 ± 9 %.

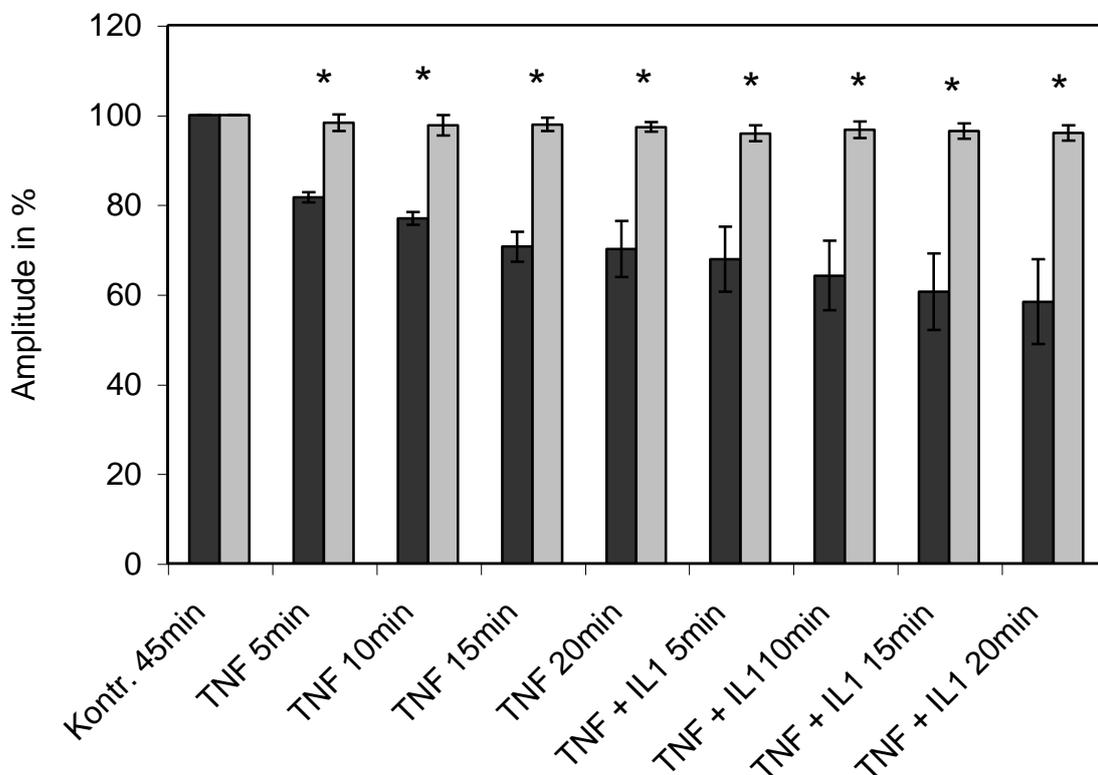


Abb. 3.5a Amplitude/Fläche bei 2 Hz in % zur Kontrolle.

Schwarz: 45 min KHS + TNF- α + IL-1 β , n = 5

Grau: 45 min Glutathion + TNF- α + IL-1 β , P ab TNF α 5min < 0,05, n = 6;

Mittelwerte \pm SEM,

In der diastolischen Kraftentwicklung ergab sich bei Cytokinapplikation sowohl mit als auch ohne Glutathion übereinstimmend mit den vorherigen Untersuchungsreihen keine signifikante Veränderung.

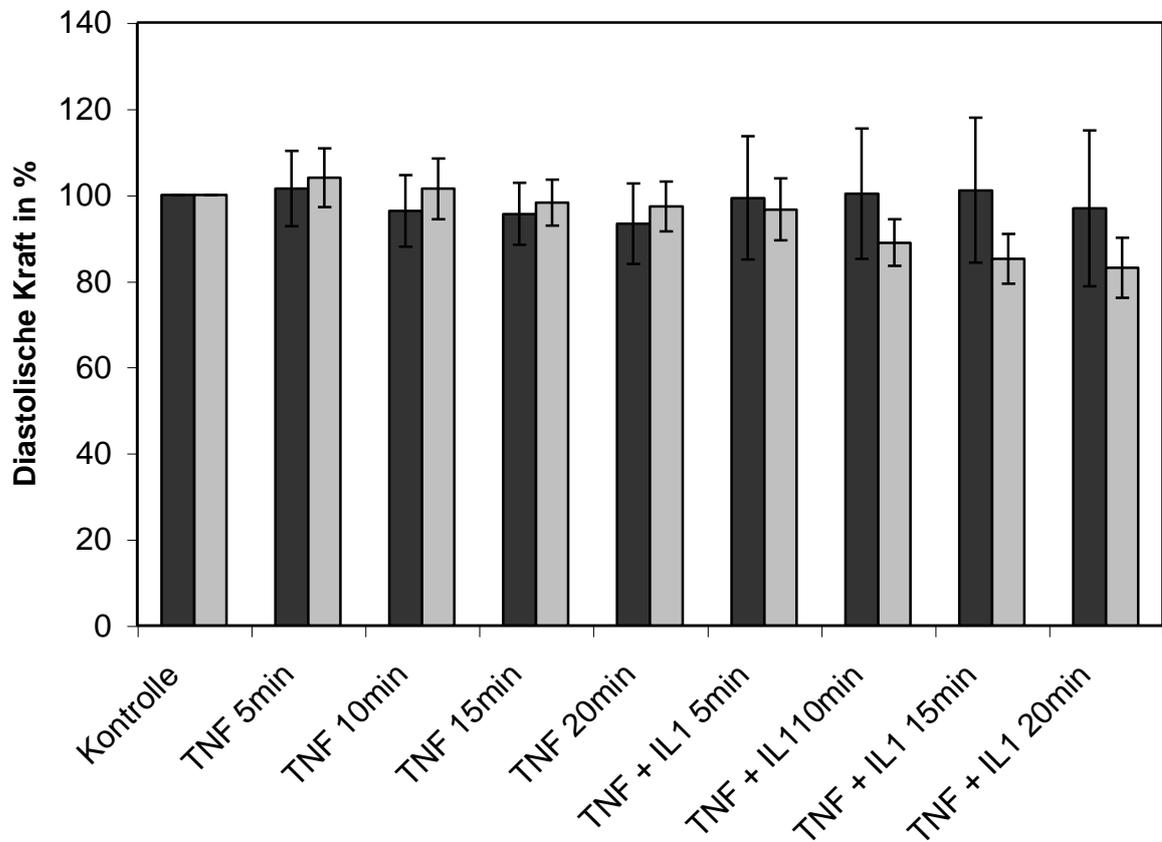


Abb. 3.5b Diastolische Kraft in % zur Kontrolle;

Schwarz: 45 min KHS vor TNF- α + IL-1 β

Grau n = 5, 45 min Glutathion vor TNF- α + IL-1 β n = 6; Mittelwerte \pm SEM

3.6 Sphingomyelinaseaktivität

TNF- α und IL-1 β führten jeweils zu einem zeit- und dosisabhängigen tendenziellen Anstieg der neutralen Sphingomyelinase. Eine statistische Signifikanz wurde jedoch nicht erreicht.

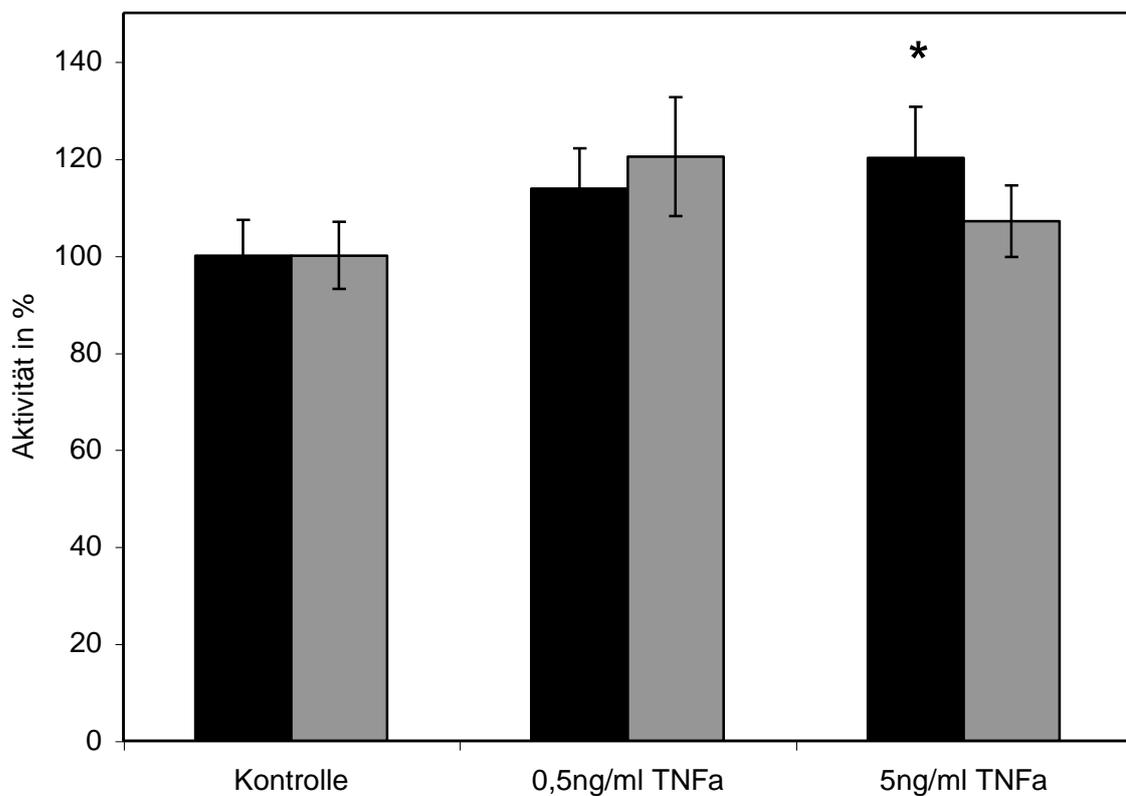


Abb. 3.6a Neutrale Sphingomyelinaseaktivität (schwarz) und saure Sphingomyelinaseaktivität (grau) unter TNF- α Inkubation mit 0,5 und 5 ng/ml über 15 min bei 37°, *P = 0,054, n= 13, Mittelwerte \pm SEM

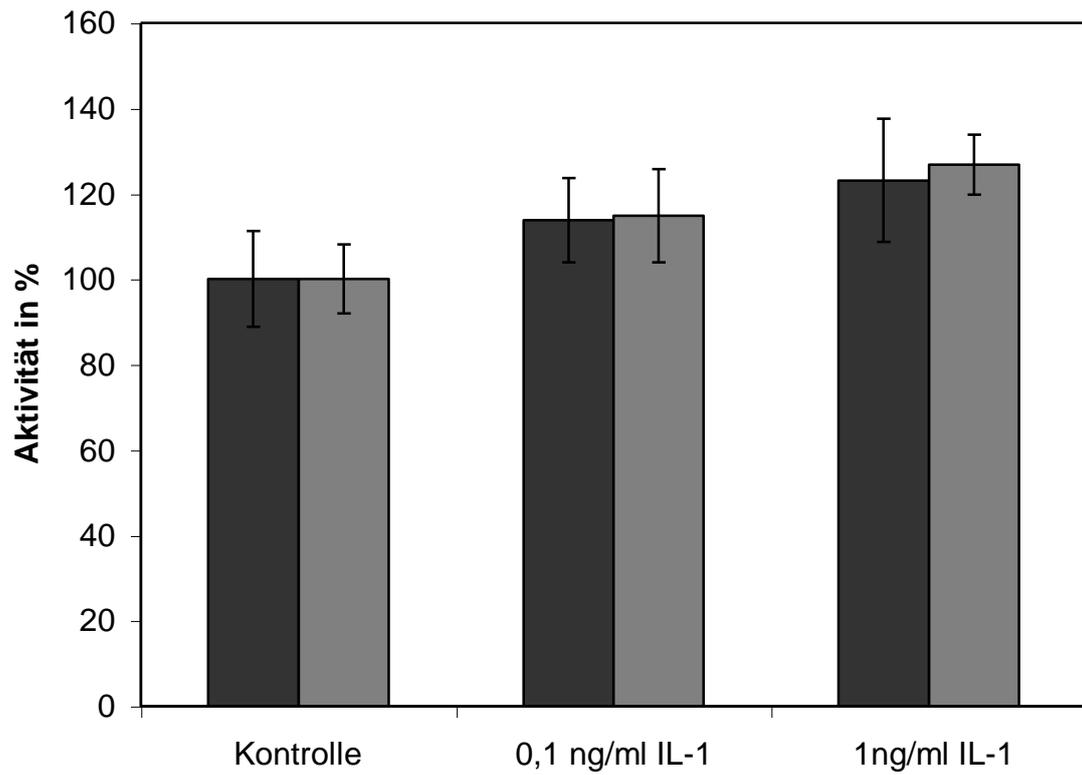


Abb. 3.6b Neutrale Sphingomyelinaseaktivität (schwarz) und saure Sphingomyelinaseaktivität (grau) unter IL-1 β Inkubation mit 0,1 und 1 ng/ml über 15 min bei 37°, n = 13, Mittelwerte \pm SEM

4. Diskussion

4.1 Diskussion der Methode

4.1.1 Mechanische Parameter

Die Myokardkontraktilität wird durch zwei Mechanismen bestimmt: den Frank-Starling-Mechanismus und den Inotropiemechanismus. Bei Variation von preload und afterload wird der Herzmuskel bei konstanter Inotropie zu Veränderungen von Last- und Geschwindigkeitsgrößen befähigt (Frank-Starling-Mechanismus), während unter Veränderung der Inotropie Änderungen von Last- und Geschwindigkeitsgrößen auch bei Konstanz von preload und afterload auftreten. Veränderungen der Verkürzungsgeschwindigkeit können sowohl unter dem Einfluß des Frank-Starling-Mechanismus als auch des Inotropiemechanismus nachweisbar sein. Eine Differenzierung zwischen beiden Mechanismen ist daher nur unter kontrollierten Ausgangsbedingungen (preload, afterload, Herzfrequenz) möglich. Diese Bedingungen sind durch die standardisierte Vorspannung der Streifen auf L_{max} und konstanter Herzfrequenz mittels elektrischer Stimulation erfüllt. Damit ist eine isolierte Messung der Inotropie unter Ausschluß des Frank-Starling-Mechanismus gegeben.

4.1.2 Kraft-Frequenz Beziehung

Die Kraft-Frequenz-Beziehung des Herzens (Bowditch-Effekt) bezeichnet einen Anstieg der Kontraktionskraft bei zunehmender Herz- bzw. Stimulationsfrequenz. Es kommt aufgrund der höheren Anzahl der Kontraktionen in der selben Zeiteinheit zu einer höheren intrazellulären Ca-Konzentration. Im erkrankten Myokard (terminale Herzinsuffizienz/Cardiomyopathie) ist oberhalb einer Stimulationsfrequenz von 1,5 Hz im Gegensatz zu gesundem Myokard ein Abfall der Kontraktilität zu beobachten. Daher wurden ausschließlich Streifen verwendet, die im ersten Frequenzdurchgang eine eindeutige Kraft-Frequenz Beziehung aufwiesen und keinen Abfall bis zur höchsten verwendeten Stimulationsrate von 2,3 Hz

aufwiesen. Die positive Kraft-Frequenz-Beziehung kann somit zum Ausschluß einer terminalen Insuffizienz oder Cardiomyopathie dienen^{94,95}.

4.1.3 Atriales Myokard und ventrikuläres Myokard

Vorhof und Ventrikel sind physiologisch über einen identischen Rhythmus verbunden. Trotzdem sind Unterschiede im Kontraktionsverhalten vorhanden. Es zeigen sich aber bezüglich der Kraft-Frequenz-Beziehung von 0,5 bis 3 Hz keine deutlichen Unterschiede⁹⁶. Auch die frequenzabhängige Steigerung des SR Ca (2+) Aufnahme im Vergleich zum sarcolemmalen Na(+)/Ca(2+)-Austausch ist vergleichbar. Es zeigt sich allerdings ein konträres Verhalten der post-rest entwickelten isometrischen Kraft^{96,97}. Post-rest Untersuchungen des Vorhofs sind somit nicht auf Ventrikelgewebe übertragbar. Da im Rahmen dieser Arbeit kein humanes ventrikuläres Gewebe verfügbar war musste auf eine genauere Untersuchung veränderter SERCA-Funktionen im humanen Myokard in dieser Form verzichtet werden.

4.1.4 Schädigung des Herzmuskelpräparates

Ischämie die insbesondere bei großen Präparatedurchmessern auftreten kann ist eine mögliche Ursache einer im Verlauf des Versuchsprogramms abnehmende Inotropie. Hypoxische Zustände wurden in der Versuchsanordnung durch mehrere Maßnahmen verhindert. Es wurde ein geeigneter geringer maximaler Präparatdurchmesser von 600 µm und ein hoher Sauerstoffpartialdruck von 540 mmHg gewählt. Eine Hypoxie des Muskelstreifens würde zu einer unzureichenden ATP-Bereitstellung führen. Dies wiederum würde zu Rigorbrücken führen. Rigorbrücken wiederum würden einen Anstieg der diastolischen Spannung erwarten lassen. Ein signifikanter Anstieg der diastolischen Spannung ist aber nur bei IL-1β beobachtet worden, so dass auf einen cytokininduzierten Effekt im Gegensatz zu einem Artefakt geschlossen werden kann.

4.1.5 In Vitro versus in Vivo Modell

Eine große Anzahl von in vivo Studien an Hunden (10) zeigen übereinstimmend einen biphasischen inotropen Effekt von TNF- α . Schon nach 5 Minuten und bis maximal 3 Stunden nach Applikation zeigt sich mit wenigen Ausnahmen ein geringer positiver inotroper Effekt. Mehr als 3 Stunden nach Beginn der TNF- α wird übereinstimmend ein negativer inotroper Effekt beobachtet. Die verwendeten intravenös applizierten Dosen lagen zwischen 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Hunde) und 120 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Die überwiegende Zahl der in vitro Studien (isolierte Myocyten, Muskelstreifen, isolierte Herzmodelle) protokollieren einen unmittelbaren negativ inotropen Effekt⁴⁰⁻⁴³. Während einige Studien einen frühen stimulatorischen oder keinen unmittelbaren inotropen Effekt beschreiben⁴⁴⁻⁴⁶. Diese positiven Effekte treten sehr früh nach 5 bis 15 Minuten ein und bei niedrigen Dosen.

Als mögliche Ursachen für die diskrepanten Beobachtungen bezüglich des frühen Effekts von TNF- α und IL-1 β sind folgende Gründe postuliert worden.

Im In-Vivo Modell sind weitere physiologische vaskuläre, neuronale und endokrinologische Mechanismen auslösbar, die in den In-Vitro Präparationen unterschiedlich ausgeprägt ausgeschaltet werden. In den beschriebenen TNF- α Untersuchungen wurde eine intravenöse Applikation gewählt. Diese Applikation von physiologisch vor allem im Myokard sezernierten und autokrin/parakrin wirkenden Cytokinen bewirkt eine relativ hohe systemische und vergleichsweise niedrige lokale Konzentration. Weiterhin wirken Cytokine nicht nur auf die teilweise isoliert untersuchten Zellen und Gewebe, sondern auch auf die umgebenden Zellen und extrazelluläre Matrix. Die erscheint insbesondere von Bedeutung da diese Zellen wiederum durch die Cytokine zur Freisetzung von weiteren modulierenden Stoffen stimuliert werden. Die je nach Modell resultierenden weiteren Mediatoren können wiederum die Effekte des untersuchten Cytokin verstärken oder inhibieren. Die Bedeutung der sich im Verlauf verschiebenden Erhöhung mehrere Cytokine ist in der Herzinsuffizienz, Myokarditis und Sepsis mehrfach nachgewiesen. Diese simultane und

sequentielle Abfolge lässt sich aufgrund der Komplexität im Modell nur bedingt nachbilden.

Darüberhinaus werden bei den In-Vitro Studien verschiedene Spezies verglichen. Stamm et al weisen aber auf deutlich speziesspezifische inotrope Effekte hin, insbesondere in Studien, die nicht die spezieseigenen rekombinanten Cytokine verwenden⁹⁸.

4.1.6 Humanes Myokard

Das verwendete Gewebe von Patienten, die sich aufgrund einer kardialen Erkrankung einer chirurgischen Intervention unterziehen, ermöglicht ein deutlich besseres Abbild der Pathophysiologie des Cytokineinflusses als in Versuchen mit nicht-humanem Myokard:

Speziesspezifische Unterschiede können ausgeschlossen werden. Das Durchschnittsalter der Patienten zwischen 56,3 und 69,6 Jahren in den einzelnen Versuchsreihen entspricht dem Risikoprofil von Patienten mit erhöhten Cytokinspiegeln z.B. im Rahmen eines Myokardinfarktes. Darüberhinaus bestehen durch chronischen Erkrankungen und Medikamenteneinnahme induzierte Veränderungen des Myokards und bilden somit im Vergleich zum Tierversuch eine deutlich realistischere Untersuchungssituation.

4.1.7 Limitationen

Aus den hier vorgestellten Untersuchungen sind aufgrund des Versuchsaufbaus keine Aussagen über längerfristige Wirkungen (> 5 Stunden) zu treffen. Das Modell ist dagegen gut geeignet die unmittelbaren postinfartiellen Zustände nachzubilden.

Die sehr begrenzte Zahl an verfügbarem humanem Myokardgewebe verhinderte weitere Untersuchung der zur Verschlechterung der Ökonomie führenden Prozesse.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

Es konnte gezeigt werden, dass TNF- α und IL-1 β im humanen Myokard, vergleichbar mit den meisten In-Vitro Tiermodellen einen raschen negativ inotropen Effekt zeigen.

Weiterhin konnte ein erhöhter Sauerstoffverbrauch durch beide Cytokine nachgewiesen werden. Die verwendeten Dosen entsprechen dabei physiologisch relevanten, liegen aber in der unteren Spanne der bisher durchgeführten In-Vitro Untersuchungen^{40, 41, 43}.

Damit bestätigen die Untersuchungen einerseits In-Vitro Studien an Tiermodellen und sprechen diesbezüglich für eine Übertragbarkeit auf humane pathophysiologische Vorgänge

Eine rasche Induktion von TNF- α mRNA und Sekretion von TNF- α konnte in Tiermodellen schon für Ischämie und Mikroembolisation, die nur mikroskopisch nachweisbare Nekrosebereiche verursacht, dargestellt werden. Bei Patienten konnte aus technischen und ethischen Gründen kein Nachweis einer Induktion durch kurzfristige Ischämie gezeigt werden. Bei Myokardinfarktpatienten sind aber erhöhte TNF- α Serumspiegel nachgewiesen^{27, 36}. Die Cytokine verursachen dabei eine Dysfunktion des umgebenden nicht ischämischen Gewebes, die zu schweren Störungen der Pumpfunktion führen kann. Ein hier nachgewiesener erhöhter Sauerstoffverbrauch ist besonders bei myokardialen Ischämien mit ohnehin reduziertem Sauerstoffangebot besonders dramatisch.

4.2.1 Kontraktionsökonomie

Mit Druck/Volumen-Messungen an isolierten Herzmodellen und simultaner Sauerstoffverbrauchsmessung konnte zum ersten Mal ein Effekt von TNF- α auf die Kontraktionsökonomie beobachtet werden. TNF- α stört die LV-Funktion durch einen um bei gleicher Kontraktilität um 40% erhöhten Sauerstoffverbrauch (MVO₂ml/mmHg/Kontraktion)⁹⁹.

Die Veränderung des intracellulären Calcium-Handling ist besonders bedeutsam für die myozytäre Kontraktionsökonomie. Die Sarkoplasmatische Ca-ATPase des Retikulums (SERCA) transportiert aktiv Calciumionen aus dem

Cytoplasma ins sarkoplasmatische Retikulum und hat somit Anteil daran, dass die Ca-Konzentration in der Diastole auf etwa 10^{-7} sinkt⁹³.

Die kardiale Relaxation ist somit abhängig von der Aktivität der SERCA. Diese wird reversibel unter anderem durch Phospholamban (PLB) reguliert^{100, 101, 102}. Dephosphoryliertes Phospholamban inhibiert die Affinität der SERCA, während Phosphorylation durch cAMP-abhängige und Ca-Calmodulin- Proteinkinasen diese Inhibition rückgängig macht⁸¹.

Stimulation der β -Rezeptoren erhöht die Phosphorylation von Phospholamban, ein intrinsisches Protein des Sarkoplasmatischen Retikulums (SR). Dies erhöht die Aktivität der SERCA, daraus resultiert eine erhöhte Ca-Aufnahme des SR und ein schnellerer cytoplasmatischer Ca-Abfall⁸¹. Diese Veränderungen bewirken die positiven inotropen Effekten sowie die verkürzte Relaxation im Säugetierherz durch β -Rezeptoragonisten⁸².

Bei beiden untersuchten Cytokinen ist ein Effekt auf die SERCA bekannt. Für TNF- α wurde eine Verminderung der Phosphorylation von Phospholamban unter anderem von Yokoyama et al nachgewiesen.¹⁰³ IL-1 β inhibiert die β -adrenerge Regulation auf den Calciumeinstrom I_{Ca} über die SERCA⁸⁰ und inhibiert die Phospholamban Genexpression¹⁰⁴.

Aus der bekannten Modulation der SERCA durch die Cytokine und den in diesen Versuchsreihen gezeigten erhöhten spezifischen Sauerstoffverbrauch bei gleichbleibender Relaxationsgeschwindigkeit lässt sich folgende Hypothese für die verschlechterte Kontraktionsökonomie ableiten:

Durch die Inhibition der SERCA, resultiert eine kompensatorisch erhöhte Aktivität des Na/Ca-Austauscher. Da dieser ein höheren Energieumsatz pro transportiertem Ca-Ion hat resultiert ein insgesamt höherer Energieverbrauch¹⁰⁵. Der diastolische Abfall des intrazellulären Calcium beruht normalerweise überwiegend auf der SERCA-Funktion (92%) und nur zu einem geringen Teil auf dem Na/Ca (8%) Austausch¹⁰⁶.

Eine Hemmung der SERCA ruft eine Verzögerung der Ca-Aufnahme in das SR und damit eine geringere Relaxationsgeschwindigkeit hervor. In den durchgeführten Untersuchungen stellten sich keine signifikanten Effekte der Cytokine auf die Relaxationszeit dar. Ein kompensatorischer Austausch über

die Zellmembran erklärt einerseits eine relativ unveränderte Ca-Transportgeschwindigkeit und andererseits den erhöhten Energieumsatz.

In den IL-1 β Versuchsreihen fällt eine erhöhte diastolische Kraft auf, die durch eine diastolische Ca-Überladung ausgelöst sein könnte. Diese Veränderung ist mit einer verminderten Aktivität der SERCA mit inkompletter Kompensation, die keinen signifikanten Einfluß auf die Relaxationsgeschwindigkeit ausübt, gut erklärbar.

Transgene Mäuse (PLB/N27A) mit einer Veränderung des Phospholambans, die eine starke Inhibition der SERCA bewirkt zeigen folgende Veränderungen: Isolierte Herzen (Langendorff-Modell) zeigen im Vergleich zum Wildtyp eine deutlich reduzierte Kontraktilität und Relaxation (+dP/dt und -dP/dt). Die positiven Effekt des β -Agonisten Isoproterenol auf beide Parameter sind erhalten aber deutlich geringer. Die Ca-Sensitivität der SERCA ist geringer bei unveränderter Vmax. Der enddiastolische Druck ist mehr als doppelt so hoch. Langfristig entwickelten die Mäuse eine konzentrische LV-Hypertrophie, pulmonale Stauung und vorzeitige Letalität¹⁰⁵. Eine Minderung der Isoproterenol-induzierten Phosphorylation ist bei chronischer Herzinsuffizienz nachgewiesen¹⁰⁷.

4.2.2 Glutathion

Es zeigt sich eine nahezu komplette Ausschaltung der negativ inotropen Effekte von TNF- α und IL-1 β durch 10 μ M Glutathion. Darüberhinaus bleiben die diastolischen Parameter vom Glutathion unbeeinflusst. In Vorversuchen wurde zunächst der Effekt von 10 μ M Glutathion untersucht, dabei zeigte sich kein signifikanter Einfluß auf die mechanischen Parameter übereinstimmend mit Cailleret et al, die keine signifikante Beeinflussung des Ca-Transienten bei isolierten Rattencardiomyocytten fanden^{46,69}

Die Aufhebung der negativen inotropen Effekte stehen in Übereinstimmung mit Cailleret, der diesen Effekt bei Applikation des Glutathiondonators N-Acetylcysteingabe sowie durch S-Methylglutathion aufzeigen konnte⁴⁶.

4.2.3 Aktivität der Sphingomyelinase

Die gemessenen Aktivierungserhöhungen sind gering und nur bei der höheren Konzentration von TNF (5ng/ml) annähernd signifikant.

Mit einer höheren TNF- α Konzentrationen von 50 ng/ml konnten in HeLA Tet-off Zellkulturen nach 10 Minuten signifikante Steigerungen der neutralen und sauren Sphingomyelinaseaktivität demonstriert werden⁶⁵. Es zeigte sich eine 100% erhöhte Aktivität der basalen N-Sphingomyelinase, während die A-Sphingomyelinase eine > 50 % erhöhte Aktivität zeigte.

Möglicherweise ist die Penetration in das verwendete Gewebe deutlich geringer als bei den oben genannten Untersuchungen verwendeten isolierten Myocyten.

Insgesamt widerspricht die Untersuchung somit nicht eindeutig der bisher aufgezeigten Rolle von Sphingomyelinase in der Signaltransduktion von TNF- α . Der spezifische Inhibitor der neutralen Sphingomyelinase GW 4863 zeigte in Vorversuchen - möglicherweise durch die notwendigen Lösungsmittel - eine sehr starke negative Inotropie. Diese Interferenz schloss somit die Untersuchung des Einflusses der Cytokine unter spezifischer Inhibition der neutralen Sphingomyelinase auf diese Weise aus.

Letztendlich bleibt somit weiterhin unklar ob die Inhibition der TNF- α und IL-1 β -Effekte durch Glutathion durch die Radikalfängerfunktion, die Aktivierung der neutralen Sphingomyelinase oder bisher noch unbekannte Signalwege vermittelt wird.

4.2.4 Therapieansätze

In Ischämie/Reperfusionsversuchen mittels Ligatur des Ramus interventricularis anterior (RIVA) bei Kaninchen konnte mit monoklonalem TNF- α -Antikörpern eine Reduktion des Infarktgebietes erzielt werden²⁶.

Hohe Erwartungen wurden neben den erfolgreichen Tiermodellstudien auch durch die guten Erfolge in der Therapie der rheumatoiden Arthritis mit Etanercept¹⁰⁸ einem TNF-R2 Fusionsprotein, welches TNF- α inaktiviert, und

Infliximab, einem chimärem (Mensch/Maus) monoklonalem TNF- α -Antikörper ausgelöst¹⁰⁹.

Die kombinierte Analyse RENEWAL (der europäischen RECOVER- und amerikanischen RENAISSANCE-Studie) zur subcutanen Applikation von Etanercept konnte allerdings keinen signifikanten Effekt im Vergleich zur Placebogabe aufzeigen. Ein weiterer Versuch mit Infliximab wurde aufgrund höherer Letalität in der höheren Dosisgruppe abgebrochen. Allerdings zeigte sich in der niedrigen Dosisgruppe eine signifikante bessere LV-Ejektionsfraktion^{10, 11}.

Eine Vielzahl an möglichen Hypothesen für die bisher enttäuschenden Studien sind formuliert worden. Etanercept könnte mittels einer stabilisierenden den Abbau verzögernden Wirkung auf TNF- α , die TNF- α -Wirkung verstärken¹¹⁰. Infliximab zeigt in transmembranär TNF-Rezeptor exprimierenden Zellen eine agonistische, Zelllyse auslösende Wirkung. Die gegenläufigen Effekte der eingesetzten Substanzen gleichen denen der löslichen TNF-R1 und TNF-R2, die sowohl als TNF-carrier, mit stabilisierender Wirkung, als auch als TNF- α Antagonisten agieren¹¹¹.

Zudem ist die in klinischen Studien mögliche Applikation deutlich anders als in Tiermodellen des akuten Myokardinfarkts oder chronischen Herzinsuffizienz. Denn in den Tiermodellen erfolgte meist eine Applikation vor oder simultan zur Ischämie. Aber auch bei ähnlicher Applikation unterscheiden sich die Ergebnisse der Tiermodelluntersuchungen drastisch von den in klinischen Studien erzielten. Somit stellt sich die Frage in wie weit die bisher vornehmlich an Säugetiermodellen unternommenen Untersuchungen auf Menschen übertragen werden können. Die hier durchgeführten Untersuchungsreihen an humanen Muskelstreifen dienen insbesondere dieser Fragestellung. Indem sie einerseits vergleichbare Effekte von TNF- α und IL-1 β im humanen Gewebe nachweisen und andererseits die Tatsache berücksichtigen, dass TNF- α nur eines der vielen nachgewiesenen Cytokine im Rahmen der Herzinsuffizienz ist. Die IL-1 β Untersuchungen zeigen dabei exemplarisch die parallelen Wirkungen anderer Cytokine, die durch eine einfache Antagonisierung von TNF- α nicht auszuschalten sind.

In den bisher unternommenen Therapieansätzen wurde eine langfristige Therapie der Herzinsuffizienz versucht. In den in dieser Arbeit unternommenen Untersuchungen wird aufgrund der hohen Dosierung und zeitlichen Konstellation ein Modell des kardiogenen Schocks abgebildet. Die dargestellten positiven Effekte von Glutathion werfen somit die Frage auf ob ein vielversprechendere Ansatz in der Blockade von TNF- α und IL-1 β Signalwegen in diesem akuten Krankheitsbild besteht.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Hintergrund

Die proinflammatorischen Cytokine TNF- α und IL-1 β werden im Myokard bei akuter und chronischer Herzinsuffizienz sezerniert. Ihr negativer Einfluß auf Inotropie und Kontraktionsökonomie des Myokards wurde in zahlreichen In-Vitro und Tiermodellen nachgewiesen. Bisherige Versuche einer therapeutischen Intervention in klinischen Studien waren trotz guter Erfolge in Tiermodellen bislang erfolglos. Um diese Diskrepanz zu untersuchen wurden erstmals Messungen der Kontraktilität und Kontraktionsökonomie an humanem Myokard durchgeführt. Weiterhin wurden Untersuchungen bezüglich der postulierten Signaltransduktion mittels der Sphingomyelinaseaktivität

Ergebnisse

Sowohl TNF- α als auch IL-1 β zeigen übereinstimmend mit In-Vitro Versuchen an nicht-humanem Myokard eine deutlich Minderung der Kontraktilität und Steigerung des kontraktionsabhängigen Sauerstoffverbrauchs. IL-1 β führt darüber hinaus zu einer erhöhten diastolischen Kraft. Die Relaxationsgeschwindigkeit wird nicht beeinträchtigt.

Glutathion vermindert diese Effekte in 10 μ mol Konzentration fast vollständig. Eine Steigerung der Aktivität der neutralen oder sauren Sphingomyelinase kann nicht als Bestandteil der Signaltransduktion bestätigt werden.

Schlussfolgerung

Alleinig auf TNF- α zielende Therapieansätze inhibieren die negativen Einflüsse von Cytokinen im ischämischen und postischämischen Myokard nicht ausreichend. Glutathionapplikation kann TNF- α und IL-1 β Effekte auf das Myokard inhibieren.

5 LITERATURVERZEICHNIS

- 1 Ferrari R, Bachetti T, Confortini R, Opasich C, Febo O, Corti A, Cassani G, Visioli O. Tumor necrosis factor soluble receptors in patients with various degree of congestive heart failure. *Circulation* 1995;92,1479-86.
- 2 Levine B, Kalman J, Mayer L, Fillit HM, Packer M. Elevated circulating levels of tumor necrosis factor in severe chronic heart failure *N Engl J Med* 1990;323,236-241.
- 3 Deten A, Volz HC, Briest W, Zimmer HG. Cardiac cytokine expression is upregulated in the acute phase after myocardial infarction. *Experimental studies in rats. Cardiovasc Res* 2002;55,329-340.
- 4 Frangogiannis NG, Lindsey ML, Michael LH, Youker KA, Bressler RB, Mendoza LH, Spengler RN, Smith CW, Entman ML. Resident cardiac mast cells degranulate and release preformed TNF, initiating the cytokine cascade in experimental canine myocardial ischemia/reperfusion. *Circulation* 1998;98,699-710.
- 5 Frostegard J, Ulfgren AK, Nyberg P, Hedin U, Swedenborg J, Andersson U, Hansson GK. Cytokine expression in advanced human atherosclerotic plaques: dominance of pro-inflammatory (TH1) and macrophage-stimulating cytokines. *Atherosclerosis* 1999;145,33-43.
- 6 Smith SC, Allen P. Neutralization of endogenous tumor necrosis factor ameliorates the severity of myosin-induced myocarditis. *Circ Res* 1992;70,856-863.
- 7 Hegewisch S, Weh HJ, Hossfeld DK. TNF-induced cardiomyopathy. *Lancet* 1990;2,294-5.
- 8 Arbustini E, Grasso M, Diegoli M, Bramerio M, Foglieni AS, Albertario M, Martinelli L, Gavazzi A, Goggi C, Campana C. Expression of tumor necrosis factor in human acute cardiac rejection. An immunohistochemical and immunoblotting study. *Am J Pathol* 1991;139,709-715.
- 9 Kumar A, Thota V, Dee L, Olson J, Uretz E, Parillo JE. Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta are responsible for in vitro myocardial cell depression induced by human septic shock syndrome. *J Exp Med* 1996;183,949-958.
- 10 Mann D L., McMurray John JV, Packer Milton, Swedberg Karl, Fleming Thomas. Targeted anticytokine therapy in patients with chronic heart failure *Circ* 2004;109,1594-1602.
- 11 Chung ES, Packer M, Hung Lo K, Fasanmade AF, Willerson JT,. Randomized, double-blind, placebo-controlled, pilot trial of Infliximab, a chimeric monoclonal antibody to TNF-alpha in patients with moderate-to-severe heart failure *Circ* 2003;107,3133-3138.
- 12 Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B,. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci* 1975;72,3666-3670.
- 13 Beutler B, Mahoney J, Le Trang N, Pekala P, Cerami A. Purification of cachectin, a lipoprotein lipase-suppressing hormone secreted by endotoxin-induced RAW 264.7 cells *J Exp Med* 1985;161,984-95.

-
- 14 Tracey KJ, Vlassara H, Cerami A,. Cachectin/tumor necrosis factor. *Lancet* 1989;1,1122-26.
 - 15 Shames BD, Barton HH, Reznikov LL, Cairns CB, Banerjee A, Harken AH, Meng X. Ischemia alone is sufficient to induce TNF-alpha mRNA and peptide in the myocardium. *Schock* 2002;17,114-119.
 - 16 Chandrasekar B, Freeman GL. Induction of nuclear factor kB and activation protein 1 in postischemic myocardium. *FEBS Lett.* 1997;401,30-34.
 - 17 Herskowitz A, Choi S, Ansari AA, Wesselingh S. Cytokine mRNA expression in postischemic/reperfused myocardium. *Am J Pathol* 1995;146,419-428.
 - 18 Arras M, Strasser R, Mohri M. Tumor necrosis factor alpha is expressed by monocytes/macrophages following cardiac mikroembolization and is antagonized by cyclosporine. *Basic Research in Cardiology* 1998;93,97-107.
 - 19 Kapadia S, Oral H, Lee J,NAkano M, Taffet GE, Mann DL. Hemodynamic regulation of tumor necrosis factor-alpha and protein expression in adult feline myocardium. *Circ Res* 1997;81,187-195.
 - 20 Bellisari FI, Gallina S, DeCaterina R. Tumoor necrosis factor and cardiovascular diseases. *Ital Heart J* 2001;2,408-17.
 - 21 Irwin MW, Mak S, Mann DL, Qu R, Penninger JM, Yan A, Dawood F, Wen WH, Shou Z, Liu P. Tissue expression and Immunlocalization of Tumor necrosis factor-alpha in Postinfarction Dysfunctional Myocardium. *Circulation* 1999;99,1492-1498.
 - 22 Schulz R, Aker S, Belosjorow S, Heusch G. TNF in ischemia/reperfusion injury and heart failure *Basic Research in Cardiology* 2004;99,8-11.
 - 23 Kapadia S, Lee J, Torre-Amionee G, Birdsall HH, Ma TS, Mann DL. Tumor necrosis factor-alpha gene and protein expression in adult feline myocardium after endotoxin administration. *J Clin Invest* 1995;96,1042-52.
 - 24 Dörge H, Schulz R, Belosjorow S, Post H, van der Sand A Konietzka I, Frede S, Hartung T, Vinten-Johansen J, Youker KA, Entman ML, Erbel R, Heusch G. Coronary mikroembolization: the role of TNF in contractile dysfunction. *J Mol Cell Cardio* 2002;34,51-62.
 - 25 Tsutamoto T, Hisanga T, Wada A, Maeda K, Ohnishi M, Fukai D, Mabuchi N, Sawaki M, Kinoshita M. Interleukin-6 spilover in the peripheral circulation incdeases with the severity of heart failure, and thehigh plasma level of interleukin-6 is an important prognostiic predictor in patients with congestiv heart failure. *J Am Coll Cardiol* 1998;31,391-398.
 - 26 Li D, Zhao L, Liu M, Du X, Ding W, Zhang J, Mehta JL. Kinetics of tumor necrosis factor alpha in plasma and the cardioprotective effect of a monoclonal antibody to tumor necrosis factor alpha in acute myocardial infarction. *Am Heart J* 1999;137,1145-52.
 - 27 Kosmala W, Przewlocka-Kosmala M, Mazurek W. Proinflammatory cytokines and myocardial viability in patients after acute myocardial infarction *International Journal of Cardiology* 2004;101,449-456.
 - 28 Gupta RC, Shimoyama H, Tanimura M. Ca²⁺-ATPase activity and expression in ventricular myocardium of dogs with heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1997;42,12-18.

-
- 29 Sharov VG, Goussev A, Lesch M. Abnormal mitochondrial function in myocardium of dogs with chronic heart failure. *J Mol Cell Cardio* 1998;30,1757-762.
 - 30 Dörge H, Neumann T, Behrends M. Perfusion-contraction mismatch with coronary microvascular obstruction: role of inflammation. *Physiol Heart Circ Physiol* 2000;279,2587-592.
 - 31 Bonz AW, Lengenfelder B, Jacobs M, Strotmann J, Held S, Ertl G, Voelker G. Cytokine response after percutaneous coronary intervention in stable angina effect of selective glycoprotein IIb/IIIa receptor antagonism *Am Heart J* 2003;145,693-99.
 - 32 Matsumori A, Yamada T, Suzuki H, Matoba Y. Increased circulating cytokines in patients with myocarditis and cardiomyopathy. *Br Heart J* 1994;72,561-566.
 - 33 Joyce DA, Steer JH. Tumor necrosis factor alpha and interleukin-1 alpha stimulate late shedding of p75 TNF receptors but not p55 TNF receptors from human monocytes. *J Interferon Cytokine Res* 1995;15,947-54.
 - 34 Aorre-Amione G, Kapadia S, Lee J, Durand JB, Bies RD, Young JB, et al. Tumor necrosis factor-alpha and tumor necrosis factor receptors in the failing human heart. *Circulation* 1996;93,704-11.
 - 35 Rauchhaus M, Doehner W, Francis DP, Davos C, Kemp M, Liebenthal C, Niebauer J, Hooper, Volk HD, Coats AJ, Anker SD. Plasma cytokine parameters and mortality in patients with chronic heart failure. *Circulation* 2000;102,3060-67.
 - 36 Dibbs Z, Thornby J, White BG, Mann DL. Natural Variability of circulating levels of cytokines and cytokine receptors in patients with heart failure: Implications for clinical Trials *J Am Coll Cardiol* 1999;33,1935-942.
 - 37 Tracey KJ, Beutler B, Lowry SF, Mmerryweather J, Wolpe S, Milsark IW, Hariri RJ, Fahey TJ. Shock and tissue injury induced by recombinant human cachectin. *Science* 1986;234,470-474.
 - 38 Bryant D, Becker L, Richardson J, Shelton J, Franco F, Peschock R, Thompson M, Giroir B. Cardiac failure in transgenic mice with myocardial expression of tumor necrosis factor-alpha. *Circulation* 1998;
 - 39 Kubota T, My Tiernan CF, Frye CS, Slawson SE, Lemster BH, Koretsky AP, Demetris AJ, Feldman AM,. Dilated cardiomyopathy in transgenic mice with cardiac-specific overexpression of tumor necrosis factor-alpha *Circ Res* 1997;81,627-35.
 - 40 Oral H, Dorn GW, Mann DL. Sphingosine mediates the immediate negative inotropic effects of tumor necrosis factor-alpha in the adult mammalian cardiac myocyte. *J Biol Chem* 1997;272,4836-842.
 - 41 Cain BS, Meldrum DS, Dinarello CA, Joo KS, Banerjee A, Harken AH. Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta synergistically depress human myocardial function *Crit Care Med* 1999;27,1309-1318.
 - 42 Hofmann U, Domeier E, Frantz, Laser M, Weckler B, Kuhlencordt P, Heuer S, Keweloh B, Ertl G, Bonz AW. Increased myocardial oxygen consumption by TNF-alpha is mediated by a sphingosine signaling pathway. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003;284,2100-105.
 - 43 Goldhaber JI, Kim KH, Natterson PD, Lawrence T, Yang P, Weiss JN. Effects of TNF-alpha on $[Ca^{2+}]_i$ and contractility in isolated adult rabbit ventricular myocytes. *Am J Physiol* 1996;271,1449-455.

-
- 44 Amadou A, Nawrocki A, Best-Belpomme M, Pavoine C, Pecker F. Arachidonic acid mediates dual effect on TNF-alpha on Ca-transients and contractions of adult rat cardiomyocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002;282,C1339-C1347.
 - 45 Schulz R, Panas DI, Catena R, Moncada S, Olley PM, Lopaschuk GD. The role of nitric oxide in cardiac depression induced by interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha. *Br J Pharmacol* 1995;114,27-34.
 - 46 Cailleret M, Amadou A, Andrieu Abadie N, Nawrocki A, Adamy C, Ait-Mamar B, Rocaries F, Best-Belpomme M, Levade T, Pavoine C, Pecker F. N-Acetylcysteine prevents the deleterious effect of tumor necrosis factor-alpha on calcium transient and contraction in adult rat cardiomyocytes. *Circulation* 2004;406-411.
 - 47 Yokoyama T, Vaca L, Rossen RD, Durante W, Hazarika P, Mann DL. Cellular basis for the negative inotropic effects of tumor necrosis factor-alpha in the adult mammalian heart. *J Clin Invest* 1993;92,2302-2312.
 - 48 Krown KA, Yasui K, Brooker MJ, Dubin AE, Nguyen C, Harris GL, McDonough PM, Glembotski CC, Palade PT, Sabbadini RA. TNF-alpha receptor expression in rat cardiac myocytes: TNF-alpha inhibition of L-type Ca-current and Ca-transient. *FEBS Lett.* 1995;376,24-30.
 - 49 Sugishita K, Kinugawa K, Shimizu T, Harada K, Matsui H, Takahashi T, Serizawa T, Kohomoto O. Cellular basis for the acute inhibitory effects of IL-6 and TNF-alpha on excitation-contraction coupling. *Jmol Cell Cardiol* 1999;31,1457-1467.
 - 50 Aggarwal BB, Kohr WJ, Hass PE, Moffat B, Spencer SA, Henzel WJ, Bringman TS, Nedwin GE, Goedde DV, Harkins I. Human tumor necrosis factor. Production, purification, and characterization. *J. Biol. Chem* 1985;260,2345-2354.
 - 51 Engelmann II, Novick D, Wallach D. Two tumor necrosis factor-binding proteins purified from human urine: evidence for immunological cross-reactivity with cell surface receptors. *J Biol Chem* 1990;265,1531-1536.
 - 52 Torre-Amione G, Kapadia S, Lee J, Bies RD, Lebovitz R, Mann DL. Expression and functional significance of tumor necrosis factor receptors in human myocardium. *Circulation* 1995;92,1487-1493.
 - 53 Kolls J, Peppel K, Silva M, Beutler B. Prolonged and effective blockade of tumor necrosis factor activity through adenovirus-mediated gene transfer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91,215-219.
 - 54 Feldman AM, Combes A, Wagner D, Kadakomi T, Kubota T, Li YY, McTiernan. The role of tumor necrosis factor in the pathophysiology of heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2000;35,537-544.
 - 55 Okazaki T, Bell RM, Hannun YA. Sphingomyelin turnover induced by vitamin-D3 in HL-60 cells - role in cell-differentiation. *J Biol Chem* 1989;264,19076-19080.
 - 56 Dressler KA, Matias S, Kolesnick RN. Tumor-necrosis-factor-alpha activates the sphingomyelin signal transduction pathway in a cell-free system. *Science* 1992;255,1715-1718.
 - 57 Kolesnick R, Kronke M. Regulation of ceramide production and apoptosis. *Ann. Rev. Physiol* 1998;60,643-665.
 - 58 Wiegmann K, Schutze S, Kampen E, Himmler A, Machleidt T, Kronke M. Human 55-kDa receptor for tumor-necrosis-factor coupled to signal transduction cascades. *J Biol Chem* 1992;267,17997-18001.

-
- 59 Wiegmann K, Schutze S, Machleidt T, Witte D, Kronke M. Functional dichotomy of neutral and acidic sphingomyelinase in tumor necrosis factor signaling. *Cell* 1994;78,1005-1015.
 - 60 Adamklages S, Scwandner R, Adam D, Kreder D, Bernardo K, Kronke M. Distinct adapter proteins mediate acid versus neutral sphingomyelinase activation through the p55 receptor for tumor necrosis factor. *J Leukoc Biol* 1998;63,678-682.
 - 61 Adam D, Adamklages S, Kronke M. Identification of p55 tumor necrosis factor receptor-associated proteins that couple to signaling pathways not initiated by the death domain. *J Inflamm* 1996;47,61-66.
 - 62 Liu B, Andrieu-Abadie N, Levade T. Glutathione regulation of neutral sphingomyelinase in tumor necrosis-alpha-induced cell death. *J Biol Chem* 1998;273,11313-320.
 - 63 Singh S, Pahan K, Khan M. Cytokine-mediated induction of ceramide production is redox-sensitive: implications to proinflammatory cytokine-mediated apoptosis in demyelinating diseases. *J Biol Chem* 1998;273,20354-20362.
 - 64 Yoshimura S, Banno Y, Nakashima S. Inhibition of neutral sphingomyelinase activation and ceramide formation by glutathione in hypoxic PC 12 cell death. *Neurochem* 1999;73,675-683.
 - 65 Barsacchi R, Perrotta C, Bulotta S, Moncada S, Borgese N, Clementi E. Activation of Endothelial Nitric-oxide Synthase by tumor necrosis factor-alpha: A novel pathway involving sequential activation of neutral sphingomyelinase, Phosphatidylinositol-3'kinase and Akt. *Mol Pharmacol* 2003;63,886-895.
 - 66 Hannun YA. The sphingomyelin cycle and the second messenger function of ceramide. *J Biol Chem* 1994;274,787-794.
 - 67 Friedrichs GS, Swillo RE, Jow B, Bridal T, Numann R, Warner LM, Killar LM, Sidek K. Sphingosine modulates myocyte electrophysiology, induces negative inotropy and decreases survival after myocardial ischemia. *J Cardiovasc Pharmacol* 2002;39,
 - 68 Thielmann M, Dörge H, Martin C. Myocardial dysfunction with coronary microembolisation: signal through a sequence of nitric oxide, tumor necrosis factor-alpha and sphingosine. *Circ Res* 2001;90,807-813.
 - 69 Adamy C, Le Corvoisier P, Candiani G, Kirsch M, Pavoine C, Defer N, Bourin MC, Su JB, Vermes E, Hittinger L, Pecker E. Tumor necrosis factor alpha and glutathione interplay in chronic heart failure. *Arch Mal Coeur Vaiss* 2005;98,906-912.
 - 70 Han R, Ray P, Baughman K, Feldman A. Detection of interleukin and interleukin-receptor mRNA in human heart by polymerase chain reaction. *Biochem Biophys Res Comm* 1991;181,520-523.
 - 71 Guillen I, Blanes M, Gomez-Lechon MJ, Castell JV. Cytokine signaling during myocardial infarction: sequential appearance of IL-1beta and IL-6. *Am J Physiol* 1995;269,229-235.
 - 72 Testa M, Yeh M, Lee P, Fanelli R, Loperfido F, Berman JW, LeJemtel TH. Circulating levels of cytokines and their endogenous modulators in patients with mild to severe congestive heart failure due to coronary artery disease or hypertension. *J Am Coll Cardiol* 1996;28,964-971.
 - 73 Satoh M, Tamura G, Segawa I, Tashiro A, Hiramori K, Satodate R. Expression of cytokine genes and presence of enteroviral genomic RNA

-
- in endomyocardial biopsy tissues of myocarditis and dilated cardiomyopathie. *Virchows Arc* 1996;427,503-509.
- 74 Lagoo AS, George JF, Naftel DC, Griffin AK, Kirklin JK, Lagoo DS, Hardy KJ, Savunen T, McGiffin DC. Semiquantitative measurement of cytokine messenger RNA in endomyocardium and peripheral blood mononuclear cells from human heart transplant recipients. *J Heart Lung Transplant* 1996;15,206-217.
 - 75 Yue P, Massie BM, Simpson PC, Long CS. Cytokine expression increases in nonmyocytes from rats with postinfarction heart failure. *Am J Physiol* 1998;275,250-258.
 - 76 Long CS, Palmer JN, Hartogensis W, Honbo N, Miguel T, Grunfeld C, Karlner JS. Hypoxia stimulates interleukin-1 RNA expression by cardiac non-myocytes in culture. *Clin Res* 1993;41,145.
 - 77 Evans HG, Lewis MJ, Shah Am. Interleukin-1 β modulates myocardial contraction via dexamethasone sensitive production of nitric oxide. *Cardiovasc Res* 1993;27,1486-490.
 - 78 Hosenpud JD, Campbell SM, Mendelson DJ. Interleukin-1-induced myocardial depression in isolated beating heart preparation. *J Heart Transplant* 1989;8,460-464.
 - 79 Momii H, Shimokawa H, Qyama J, Cheng XS, Nakamura R, Egashira K, Nakazawa H, Takeshita A. Inhibition of adhesion molecules markedly ameliorates cytokine-induced sustained myocardial dysfunction in dogs in vivo. *J Mol Cell Cardio* 1998;30,2637-650.
 - 80 Rozanski GJ, Witt RC. IL-1 inhibits β -adrenergic control of cardiac calcium current: Role of L-arginine/nitric oxide pathway. *Am J Pharmacol* 1994;267,H1753-1758.
 - 81 Wegener AD, Simmermann HKB, Lindemann JP, and Jones LR. Phospholamban phosphorylation of serine 16 and threonine 17 in response to β -adrenergic stimulation. *J Biol Chem* 1989;264,11468-11474.
 - 82 Simmermann HKB, Jones LR. Phospholamban: Protein structure, mechanism of action, and role in cardiac function. 1998;*Physiol Rev*,921-947.
 - 83 Sims JE, Dower SK. Interleukin-1 receptors *Eur Cytokine* 1994;5,539-546.
 - 84 Colotta F, Re F, Muzio M, Bertini R, Polentarutti N, Sironi M, Giri JG, Dower SK, Sims JE, Mantovani A. Interleukin-1 type II receptor: a decay target for IL-1 that is regulated by IL-4. *Science* 1993;261,472-475.
 - 85 Sims JE, Gayle MA, Slack JL, Alderson MR, Bird TA, Giri JG, Colotta F, ReF, Mantovani A, Shanebeck K, Grabstein KH, Dower SK. Interleukin 1 signalling occurs exclusively via the typ I receptor. *Proc Natl Acad Sci* 1993;90,6155-6159.
 - 86 Dinarello CA. The biological properties of interleukin-1. *Eur Cytokine Netw.* 1994;5,517-531.
 - 87 Carter DB, Deibel MR, Dunn CJ, Tomich CSC, Laborde AL, Slightom JL, Berger AE, Bienkowski MJ, Sun FF, Mcewan RN, Harris PKW, Yem AW, Waszak GA, Chosay JG, Sieu LC, Hardee MM, Zurchenerleely HA, Reardon I. Purificatiion, cloning, expression and biological characterization of an interleukin-1 receptor antagonist protein. *Nature* 1990;344,633-638.

-
- 88 Schreuer KD, Liu S. Involvement of ceramide in inhibitory effect of IL-1 β on L-type Ca²⁺ current in adult rat ventricular myocytes. *Am J Pharmacol* 1997;105,575-580.
 - 89 Schutze S, Machleid T, Kronke M. The role of diacylglycerol and ceramide in tumor necrosis factor and interleukin-1 signal transduction. *J Leukoc Biol* 1994;56,533-41.
 - 90 Muliere LA, Hasenfuss G, Littleman F, Blanchard EM, Alpert NR. Protection of human left ventricular myocardium from cutting injury with 2,3-butanedione monoxime. *Circ Res* 1989;65,1441-49.
 - 91 Vahl CF, Bonz A, Hagl C, Hagl S. Reversible desensitization of the myocardial contractile apparatus for calcium. A new concept for improving tolerance to cold ischemia in human myocardium? *J Cardiothorac Surg* 1994;370-78.
 - 92 Meyer M, Keweloh B, Guth K, Holmes JW, Pieske B, Lehnart SE, Just H. Frequency-dependence of myocardial energetics in failing human myocardium as quantified by a new method for the measurement of oxygen consumption in muscle strip preparations. *J Mol Cell Cardio* 1998;30,1459-70.
 - 93 Suga H. Ventricular energetics *Physiol Rev* 1990;70,247-277.
 - 94 Muliere L A, Hasenfuss G, Leavitt B, Allen P D, Alpert N R. Altered myocardial force-frequency relation in human heart failure. *Circ* 1992;85,1743-1750.
 - 95 Pieske B, Kretschmann B, Meyer M. Alterations in intracellular calcium handling associated with the inverse force-frequency relation in human dilated cardiomyopathy. *Circ* 1995;92,1169-1178.
 - 96 Maier LS, Barckhausen P, Weisser J, Aleksic I, Baryalei M, Pieske B. Ca(2+) handling in isolated human atrial myocardium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000;279,H952-8.
 - 97 Bers DM. Excitation-contraction coupling and cardiac contractile force. *Acad Press* 1991;324-327.
 - 98 Stamm C, Cowan DB, Friehs I, Noria S, del Nido PJ, McGowan FX Jr. Rapid endotoxin-induced alterations in myocardial calcium handling: obligatory role of cardiac TNF- α . *Anesthesiology* 2001;95,1396-1405.
 - 99 Miyano H, Shishido T, Kawada T, Myashita H, Sato T, Sugimachi M, Sunagawa K. Acute effect of tumor necrosis factor- α is minimal on mechanics but significant on energetics in blood-perfused canine left ventricles. *Crit Care Med Crit Care Med* 1999;27,168-176.
 - 100 Lindemann JP, Jones LR, Hathaway DR, Henry BG, Watanabe AM. Beta-adrenergic stimulation of phospholamban phosphorylation and Ca-ATPase activity in guinea pig ventricles. *J Biol Chem* 1983;258,464-71.
 - 101 Luo W, Grupp IL, Harrer J. Targeted ablation of the phospholamban gene is associated with markedly enhanced myocardial contractility and loss of beta-agonist stimulation. *Circ Res* 1994;75,401-409.
 - 102 Kadambi VJ, Ponniah S, Harrer JM. Cardiac specific over-expression of phospholamban alters calcium kinetics and resultant cardiomyocyte mechanics in transgenic mice. *J Clin Invest* 1996;97,533-539.
 - 103 Yokoyama T, Arai M, Sekiguchi K, Tanaka T, Kanda T, Suzuki T, Nagai R. Tumor necrosis Factor- α decreases the phosphorylation Levels of

-
- Phospholamban and Troponin I in Spontaneously beating rat neonatal cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardio* 1999;31,261-273.
- 104 McTiernan CF, Lemster BH, Frye C, Brooks S, Combes A, Feldman AM. Interleukin-1 beta inhibits phospholamban gene expression in cultured cardiomyocytes. *Circ Res* 1997;81,493-503.
- 105 Schmidt AG, Zhai J, Carr An, Gerst MJ, Lorenz JN, Pollesello P, Annala A, Hoit BD, Kranias EG. Structural and functional implications of the phospholamban hinge domain: impaired SR Ca²⁺ uptake as a primary cause of heart failure. *Cardiovasc Res* 2002;56,248-259.
- 106 Bassani JWM, Bassani RA, Bers DM. Relaxation in rabbit and rat cardiac cells: species dependent differences in cellular mechanisms. *J Physiol* 1994;476,279-293.
- 107 Bartel S, Stein B, Eschenhagen T, Mende U, Neumann J, Schmitz, Krause EG, Karczewski P, Scholz H. Protein phosphorylation in isolated trabeculae from nonfailing and failing hearts. *Mol Cell Biochem* 1996;157,171-179.
- 108 Moreland LW, Baumgartner SW, Schiff MH, Tindall EA, Fleischmann RM, Weaver AL, Ettliger RE, Cohen S, Koopman WJ, Mohler K, Widmer MB, Bloesch CM. Treatment of rheumatoid arthritis with a recombinant human tumor necrosis factor receptor (p75)-Fc fusion protein. *N Engl J Med* 1997;337,141-147.
- 109 Ducoulombier V, Solau E, Coquerelle P, Houvenagel E, Siame JL, Desprez X, Fauquert P, Guyot MH, Delcambre B, Flipo RM. Long-term results of infliximab therapy in rheumatoid arthritis: Experience acquired by the North-Pas-de-Calais hospital network. *Joint Bone Spine* 2006;13,1165-69.
- 110 Aderka D, Engelmann H, Maor Y, Brakebusch C, Wallach D. Stabilization of the bioactivity of tumor necrosis factor by its soluble receptors. *J Exp Med* 1992;175,323-329.
- 111 Mohler KM, Torrance DS, Smith CA. Soluble tumor necrosis factor receptors are effective therapeutic agents in lethal endotoxemia and function simultaneously as both TNF carriers and TNF antagonists. *J Immunol* 1993;151,1548-561.

Abkürzungsverzeichnis

IL-1 β	Interleukin-1 β
NO	Nitric oxide
NOE	N-oleoylethanolamine
LPS	Lipopolysaccharide
LV	Linksventrikulär/ Linker Ventrikel
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase
SERCA	Sarkoplasmatisches Retikulum Ca-ATPase
SM	Sphingomyelin
Smase	Sphingomyelinase
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
TNF- α	Tumornekrosefactor- α

DANKSAGUNG

Im Rahmen dieser Arbeit bin ich zu besonderem Dank verpflichtet.

Herrn Prof. Dr. Georg Ertl für die Überlassung des Themas und die Bereitstellung aller Ressourcen in der Medizinischen Universitätsklinik.

Herrn Priv.-Doz. Dr. Andreas Bonz als Laborleiter und wissenschaftlichem Mentor, der mich in meiner Freude an der wissenschaftlichen Arbeit bestärkt und weit über die Belange der experimentellen Arbeit hinaus unterstützt hat.

Herrn Dr. Ulrich Hofmann als verantwortlicher Betreuer danke ich für die konstruktiven Anregungen und Diskussionen sowie die hervorragende Betreuung bei allen experimentellen Fragen.

Weiterhin möchte ich mich für die ausgezeichnete Unterstützung und Vorbereitung der experimentellen Arbeiten bei Katharina Meder und Verena Popp bedanken.

Größter Dank gebührt meinen Eltern, die mir das Studium ermöglicht haben.

Lebenslauf

Stefan Matthias Heuer

Am Wandberg 24
97080 Würzburg

Geburtsdatum: 24.01.1979

Geburtsort: Bad Oeynhausen

Familienstand: ledig

1985 – 1989 Grundschule Hahlen, Minden

1989 – 1998 Ratsgymnasium Minden (Allg. Hochschulreife)

1998 – 1999 Zivildienst als Rettungssanitäter, Berufsfeuerwehr Minden

10/1999 Humanmedizin, Julius-Maximilians-Universität Würzburg

09/2001 Physikum

09/2002 1. Staatsexamen

04/2005 2. Staatsexamen

05/2006 3. Staatsexamen, Approbation als Arzt

Seit 09/2006 Wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Klinik und Poliklinik für Allgemein- und Viszeralchirurgie der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg

Würzburg, den 21.05.2008



