

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I
der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. Georg Ertl

**Einfluss von Tumor Nekrose Faktor- α (TNF- α)
auf die myokardiale Energetik**

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilian-Universität zu Würzburg

vorgelegt von

Ulrich Dietmar Walter Hofmann

aus Würzburg

Würzburg, Dezember 2005

Referent: Prof. Dr. med. G. Ertl

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

Dekan: Prof. Dr. med. G. Ertl

Tag der mündlichen Prüfung: 10. Juli 2007

Der Promovend ist Arzt

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung

1.1 Bedeutung von Tumor-Nekrosefaktor- α im kardiovaskulären System	1
1.2 TNF- α induzierte Effekte auf die myokardiale Funktion	4
1.3 TNF- α abhängige intrazelluläre Signalwege in Kardiomyozyten	5
1.4 Der myokardiale Energiestoffwechsel	6
1.5 Bestimmung des myokardialen Energieumsatzes	7
1.6 Sauerstoffverbrauch als Parameter des myokardialen Energieumsatzes	9
1.6.1 Methoden zur Messung des myokardialen Sauerstoffverbrauchs	
1.6.2 Messung des Sauerstoffverbrauchs an isolierten Herzmuskelstreifenpräparaten	
1.7 Fragestellung	11

2. Material und Methoden

2.1 Gewinnung von isolierten Muskelstreifenpräparaten	12
2.1.1 Anästhesie und Herzentnahme	
2.1.2 Präparation und Konservierung	
2.2 Versuchsaufbau für mechanische Messungen	14
2.2.1 Haltevorrichtung, Perfusion und Stimulation und Dehnung	
2.2.2 Kraft-Zeit-Integral	
2.2.3 Aufzeichnung der mechanischen Daten und Versuchsdurchführung	
2.3 Versuchsaufbau für Sauerstoffverbrauchsmessungen	17
2.3.1 Aufbau und Messprinzip	
2.3.2 Messvorgang und Auswertung des Messsignals	
2.4 Versuchsprogramm	22
2.4.1 Effekte von Tumornekrosefaktor- α	
2.4.2 Blockierung der NO-Synthasen	
2.4.3 Blockierung der Ceramidasen	
2.4.4 Effekt von exogenem Sphingosin	
2.5 Auswertung	23
2.6 Statistik	24

3. Ergebnisse

3.1 Effekte von Tumornekrosefaktor- α	25
3.2 Blockierung der NO-Synthasen	29
3.3 Blockierung der Ceramidasen	29
3.4 Effekt von exogenem Sphingosin	33

4. Diskussion

4.1 Sauerstoffverbrauchsmessung, Limitationen der Methode	36
4.2 Effekte von TNF- α auf Mechanik und Energetik	38
4.3 NO-vermittelte Effekte	41
4.4 Sphingolipid-vermittelte Effekte	43
4.5 Relevanz der Ergebnisse für in vivo Situationen	46

5. Zusammenfassung	47
---------------------------	-----------

6. Literatur	48
---------------------	-----------

Danksagung

1. Einleitung

1.1 Bedeutung von Tumor-Nekrosefaktor- α im kardiovaskulären System

Im Jahr 1975 entdeckte Carswell ein Endotoxin-induziertes Protein, das wie man erkannte, die Nekrose von Tumorzellen zu induzieren vermag und daher später als Tumor-Nekrosefaktor- α (TNF- α) bezeichnet wurde¹. TNF- α wurde ursprünglich wegen seiner Isolierung bei Patienten mit starkem Gewichtsverlust unter chronischen Erkrankungen auch als Kachektin bezeichnet und erst später als mit TNF- α identisch erkannt².

Es handelt sich um ein unglykosyliertes Polypeptid, das in einer transmembranären und einer löslichen Form vorkommt. Aus der Plasmamembran wird es durch eine Protease, genannt TACE, für TNF- α converting enzyme, freigesetzt und kommt dann in freier Form in der Regel als 51 kD Homotrimer vor. Beinahe alle kernhaltigen Zellen exprimieren TNF- α Rezeptoren, von denen zwei Typen bekannt sind, TNFR1 (CD120a, p55) und TNFR 2 (CD 120b, p75). TNFR1 ist der häufiger exprimierte und scheint für die Hauptsache der bislang bekannten Effekte verantwortlich zu sein. Beide Rezeptortypen können auch als soluble Form (sTNFR1,2), deren Bedeutung noch weitgehend unklar ist, aus der Plasmamembran freigesetzt werden^{3, 4,5}.

Lange Zeit ist TNF- α nur im Rahmen seiner immunmodulierenden Funktion als proinflammatorisches Zytokin betrachtet worden. Im weiteren wurde dann seine Rolle im Zusammenhang mit der systemischen Organdysfunktion im klinischen Komplex des „septic shock syndrom“ untersucht⁶. In den letzten Jahren wurde nun die Bedeutung von TNF- α für die Pathogenese verschiedenster akuter und chronischer, primär nicht infektiöser oder immunologischer Erkrankungen deutlich. Wachsende Erkenntnisse um die physiologische und pathophysiologische Funktion inflammatorischer Zytokine rückten TNF- α so auch ins Blickfeld der Erforschung kardiovaskulärer Erkrankungen.

Soweit bislang bekannt, spielt TNF- α eine Rolle in der Pathogenese diverser kardialer Krankheitsbilder, so des Myokardinfarktes⁷, der chronischen Herzinsuffizienz^{8,9}, der Myokarditis¹⁰, der sepsisassoziierten Myokarddysfunktion¹¹, der myokardialen Allotransplantatabstoßung⁵, des

myokardialen Reperfusionsschadens¹² und der Koronarsklerose¹³. Gerade im Fall der chronischen Herzinsuffizienz ist bislang noch nicht abschließend geklärt, inwiefern die dabei peripher messbaren Plasmakonzentrationen auf die Produktion im Myokard zurückzuführen sind.

Die bei den genannten Krankheitsbildern nachgewiesenen Plasmakonzentrationen schwanken je nach Erkrankung interindividuell stark und es konnte jeweils nur bei einem Teil der Patienten eine deutlich erhöhte TNF- α Konzentration beobachtet werden. Die Spannweite der im Plasma gefundenen Konzentrationen bewegt sich zwischen unter zehn pg/ml bei Herzinsuffizienzpatienten mit niederen NYHA- Stadien bis zu über Tausend pg/ml, bei Patienten mit Hypertrophischer Kardiomyopathie¹⁴. Weiter wurde eine Korrelation zwischen den Konzentrationen von TNF- α und insbesondere auch seinen löslichen Rezeptoren und dem klinischen Schweregrad der Herzinsuffizienz beobachtet¹⁵ und dabei gezeigt, dass diese Werte auch als prognostische Marker dienen könnten.

In unterschiedlichen in vitro und in vivo Arbeiten konnte nachgewiesen werden, dass Kardiomyozyten im Gegensatz zu vielen anderen Zelltypen TNF- α zu exprimieren vermögen^{4,7,16,17,18}, wobei dafür verschiedene Stimuli infrage kommen.

Endotoxin (Lipopolisaccharid) führt zu einer Beeinträchtigung der myokardialen Funktion, gleichzeitig stellt es einen bedeutenden Stimulus für die TNF- α Produktion und dadurch ausgelöste myokardiale Dysfunktion dar^{19,4}. Für Lipopolisaccharid (LPS) konnte weiter gezeigt werden, dass es zu eine NF-kappa B abhängigen Induktion der TNF- α Expression bewirkt²⁰, was u.a. durch den Toll-like receptor-4 vermittelt wird¹⁷. Endotoxin bewirkt ähnlich wie TNF- α Veränderungen des intrazellulären Kalziumhaushaltes und besitzt einen negativen Einfluss auf die myokardiale Kontraktilität²¹. Die verringerte myokardiale Kontraktilität nach Endotoxin induzierter TNF- α Synthese ist dabei mit erhöhter Sphingosin- und Thromboxanproduktion verknüpft²². Insgesamt sind wohl wesentliche LPS Effekte auf kardiovaskulärer Ebene über die Induktion von Zytokinen zu erklären.

Ischämie an sich stellt einen Stimulus für die TNF- α Produktion im Herzmuskelgewebe dar, wobei hier v.a. Nicht-Myozyten als Produzenten identifiziert wurden²³. Daneben kommt es im Rahmen von Ischämie-/Reperfusionssituationen am Herzen zur Freisetzung von TNF- α ^{24,25}. Gerade die Reperfusion des zuvor transient ischämischen Gewebes scheinen hier einen bedeutenden Stimulus darzustellen²⁶. Solche Situationen sind sowohl im Zusammenhang mit Gefäßverschlüssen im Rahmen der koronaren Herzkrankheit als auch bei kardiochirurgischen Eingriffen^{27,28} von Relevanz. Als zusätzlicher Trigger sind im Rahmen von ischämiebedingten Myokardschäden die *Komplementaktivierung* und die Entstehung freier *Radikale* zu nennen. Im infarzierten Gewebe kommt es so u.a. durch die proinflammatorische Wirkung von TNF- α zum Anstoß der Zytokinkaskade²⁶.

Ein anderer Stimulus für die TNF- α Expression und Freisetzung durch Kardiomyozyten stellt *mechanischer Stress* dar. Schon nach 30-minütiger Belastung von Muskelstreifenpräparaten mittels passiver Überdehnung oder nach Ligatur der Aorta ascendens in vivo kommt es akut binnen 90 bzw. 120 Minuten zum Anstieg von TNF- α Protein und -Bioaktivität mit funktioneller Signifikanz³⁰. In einer Arbeit von Palmieri³¹ wurde bereits nach zehnminütiger passiver Dehnung im Langendorff-Modell des isolierten Herzens eine de novo TNF- α Produktion nachgewiesen. Chronische Belastung durch Aortenligatur führt akut zu einem Anstieg von TNF- α m-RNA und Protein, der nach Tagen nicht mehr nachweisbar ist¹⁸.

Neben Kardiomyozyten stellen ortsständige Makrophagen eine weitere wichtige Quelle für myokardiale TNF- α Produktion dar. Auf Endotoxin-Stimulation hin ist das Myokard so in der Lage beinahe ebensoviel TNF- α pro Gramm Gewebe zu produzieren, wie die Organe Leber und Milz, die im Körper sonst quantitativ die Hauptquelle für dieses Zytokin darstellen^{4,32}. Auch können unter bestimmten Bedingungen im Myokard Endothelzellen, Lymphozyten, Fibroblasten³³ und glatte Muskelzellen³⁴ TNF- α exprimieren.

1.2 TNF- α induzierte Effekte auf die myokardiale Funktion

TNF- α induziert die Apoptose von Kardiomyozyten, wobei Sphingosin als Botenstoff identifiziert wurde^{4,35}. Apoptose spielt im Myokard bei pathologischen Umbauvorgänge u.a. im Rahmen der chronischen Herzinsuffizienz, der ischämischen Kardiomyopathie, der Myokarditis und der arrhythmieinduzierten rechtsventrikulären Dysplasie eine Rolle⁴. Neben funktionellen Veränderungen bewirkt TNF- α auch morphologische, auf der Ebene der Myokardgeometrie und Histologie, als Remodelling bezeichnete. TNF- α führt im Tierversuch bei kontinuierlicher Infusion zu einer linksventrikulären Dilatation verbunden mit einer reduzierten Wanddicke und einer Abnahme der Myozytenzahl im Gewebe³⁶. Des Weiteren konnte eine stimulatorische Wirkung auf die Fibroblastenpopulation und die extrazelluläre Matrixproduktion im Infarktmodell beobachtet werden³⁷.

Jüngst wurde gezeigt, dass TNF- α eine kardioprotektive Rolle hinsichtlich ischämischer Schädigung spielt³⁸. TNF- α , exogen zugeführt, ist in der Lage den Effekt einer „ischämischen Präkonditionierung“ (Ischämietoleranzinduktion durch vorangehende kurzfristige Ischämieepisodes), auf das Myokard nachzuahmen. Parallel wurde nachgewiesen, dass TNF- α die Infarktgröße nach experimenteller Koronarligatur zu verringern vermag. Entsprechend verhindern neutralisierende Antikörper im Tierversuch den Effekt der Präkonditionierung^{38,39}. Sphingolipid Botenstoffe, wie Sphingosin, Sphingosin-1-Phosphat oder Ceramid, scheinen auch hier bei der Vermittlung des Effekts involviert zu sein³⁸.

Unter TNF- α Stimulation kommt es zu einer allgemeinen Depression der mechanischen Funktion des Herzens⁴. Systemisch führt dies zu Hypotension bei reduzierter Ejektionsfraktion und gleichzeitig verringertem Gefäßwiderstand. Dies geht mit einer verringerten Ansprechbarkeit der Kardiomyozyten hinsichtlich der positiv inotropen Wirkung β -adrenerger Substanzen einher⁴⁰.

Die TNF- α vermittelte Verschlechterung der myokardialen Funktion wird bislang, was schnelle Effekte angeht, im Wesentlichen auf Veränderungen des Kalziummetabolismus zurückgeführt. Als zugrunde liegende Signalwege

konnten dabei sowohl der NO^{41,42} als auch ein Sphingosin vermittelter^{43,44} Mechanismus gezeigt werden, Signalwege die beide dem TNFR1 Rezeptor nachgeschaltet sind. Die Wirkung auf die Kontraktilität scheint dabei biphasisch, wobei die schnelle Reaktion eher Sphingosin zugeschrieben wird⁴. Unklar ist dabei, inwiefern schnelle Effekte auch durch NO vermittelt werden können, was bislang insbesondere in einer Arbeit von Finkel⁴¹ postuliert wurde.

Unlängst konnte gezeigt werden, dass es unter TNF- α auch zu einer Verschlechterung der myokardialen Energetik, gemessen an einem erhöhten Sauerstoffverbrauch, kommt⁴⁵: An einem durch ein zweites Tier perfundierten isolierten Kaninchenherzen erzeugten sehr hohe Konzentrationen von humanem TNF- α einen nur geringen transienten negativen Einfluss auf die Kontraktilität, bei gleichzeitiger deutlicher Erhöhung des Sauerstoffbedarfs. Bei unveränderter Ansprechbarkeit auf Kalzium unter TNF- α Infusion schloss man in dieser Arbeit auf eine verschlechterte chemomechanische Konversion als Ursache für die verschlechterte myokardiale Ökonomie.

1.3 TNF- α abhängige intrazelluläre Signalwege in Kardiomyozyten

Für die unter TNF- α beobachteten nicht transkriptionsabhängigen Effekte sind, soweit bekannt, im Wesentlichen zwei intrazelluläre Signalwege relevant:

NO als lipophile, sehr reaktive und äußerst kurzlebige Signalsubstanz wird im Herzen von mindestens drei NO-Synthase (NOS) Isoformen produziert. Bislang nicht ganz klar ist, inwieweit TNF- α die Aktivität der konstitutiv aktiven neuronalen (nNOS) und endothelialen (eNOS) Isoform reguliert, und diese damit für schnelle TNF- α Effekte verantwortlich sind. Die induzierbare Isoform (iNOS) wird u.a. durch Zytokin-Stimulation, auch TNF- α reguliert, exprimiert⁴⁶.

Weiterhin führt TNF- α nach Bindung und Oligomerisierung von TNFR 1 Rezeptoren zur raschen Degradation von Sphingomyelin⁴⁷, einem in der äußeren Schicht der Plasmamembran, insbesondere in Mikrodomänen mit Signaltransduktionsfunktion, wie z.B. Caveolae, verbreitet vorkommendem Membransphingolipid. TNF- α vermag die zelluläre Aktivität von Sphingomyelinasen und Ceramidasen zu stimulieren. Das dabei entstehende

Ceramid ist per se signalaktiv und liefert weiterhin die Ausgangssubstanz für die Signalsubstanzen Sphingosin und Sphingosin-1-Phosphat⁴⁸. Die Regulation und abhängige Effekte dieser Signalkaskaden sind bislang nur lückenhaft bekannt.

Beide TNF- α abhängige Signalwege modulieren wohl den zellulären Kalziummetabolismus der Herzmuskelzelle und können somit potentiell zu einer Depression der mechanischen Funktion führen^{4,49,50}.

1.4 Der myokardialen Energiestoffwechsel

Schon früh betrachtete man den Sauerstoffverbrauch als Parameter des Energieumsatzes. Bereits 1912 konnte von Rohde⁵¹ der Zusammenhang zwischen dem Sauerstoffverbrauch und der mechanischen Kontraktion gezeigt werden.

Wesentliche Grundlage für die Verwendung des Sauerstoffverbrauchs als Parameter des Energieumsatzes ist die Tatsache, dass das humane Myokard physiologisch beinahe ausschließlich unter aeroben Bedingungen arbeitet und daher zwischen beiden Größen ein annähernd linearer Zusammenhang besteht⁵². Normalerweise stellen freie Fettsäuren den Hauptanteil an der Energiegewinnung der Herzmuskelzelle, gefolgt von Glucose und Laktat. Der Anteil der Substrate wird dabei über das Angebot reguliert. Die gemeinsame Endstrecke aller Substrate bildet der Citratzyklus, in dem als Produkt des oxidativen Abbaus NADH₂ als Reduktionsäquivalent gebildet wird. NADH₂ ist wiederum Ausgangssubstrat der mitochondrialen Atmungskette, die als Resultat der Oxidation des Wasserstoffes Adenosintriphosphat (ATP) liefert.

Über die Kreatinkinase-reaktion steht ATP mit Kreatinphosphat im Gleichgewicht, das eine zusätzliche energiereiche Phosphatverbindung darstellt. Kreatinphosphat bildet einen schnell mobilisierbaren Energiespeicher und verhindert ein zu rasches Absinken der ATP Konzentration in Situationen eines kurzzeitigen relativen Sauerstoffmangels. Kann unter aeroben Bedingungen die mitochondriale Atmungskettenreaktion vollständig ablaufen, so ist der Sauerstoffverbrauch ein geeigneter Parameter des Energieumsatzes⁵². Unter anaeroben Stoffwechselbedingungen ist ein solcher

Zusammenhang nicht gegeben. Für den Energiemetabolismus des Myokards spielen anaerobe Stoffwechselwege allerdings annähernd keine Rolle⁵².

1.5 Bestimmung des Myokardialen Energieumsatzes

Zur Messung des myokardialen Energieumsatzes wurden im Wesentlichen bislang folgende Ansätze verfolgt:

In direkter Beziehung zum Energieumsatz steht die Konzentration an energiereichen Phosphaten, ATP und Kreatinphosphat und den dazugehörigen Abbauprodukten Adenosindi- und Monophosphat, sowie Kreatin. Diese lassen sich mit biochemischen Methoden quantifizieren⁵³. Hierzu müssen aber Gewebeproben schockgefroren werden, um die Substanzen zu fixieren, was die parallele Untersuchung verschiedener mechanischer und energetischer Funktionszustände an einem Präparat unmöglich macht.

Neuerdings bieten die Magnetresonanzphosphorspektroskopie⁵⁴ und die Positronenemissionsmessung⁵⁵ alternative Möglichkeiten zur Untersuchung des myokardialen Energiemetabolismus in vivo. Die Verfügbarkeit dieser Methoden ist wegen des Apparativen und finanziellen Aufwandes bislang allerdings sehr eingeschränkt. Weiterhin sind hier keine Methoden zur Untergliederung der einzelnen Beiträge zum Gesamtverbrauch etabliert.

Eine Registrierung der während der Kontraktion freiwerdenden Wärme mit Hilfe von Thermoelementen erlaubt eine sehr hohe zeitliche Auflösung und die differenzierte Bestimmung des Wirkungsgrades der mechanischen Herzarbeit⁵⁶. Diese Methode basiert auf der Grundlage, dass unter aeroben Bedingungen das energetische Äquivalent des verbrauchten Sauerstoffes sich aus der Summe der freigesetzten Wärme und der geleisteten Arbeit zusammensetzen. Die in dieser Arbeit angewandten energetischen Betrachtungen basieren z.T. auf den aus diesen Untersuchungen abgeleiteten Konzepten.

Neben Parametern des Energieverbrauchs, also Wärme oder die Konzentration energiereicher Phosphate, können die Substrate der Energiebereitstellung von Interesse sein. Im isolierten Herzmodell wird durch die Perfusion mit ³H und ¹⁴C markierten Substraten eine Analyse der Substratutilisation unter definierten Bedingungen möglich⁵⁷.

Dem „energetischen Input“ des Systems, zumeist ausgedrückt als Sauerstoffverbrauch, bzw. dessen energetisches Äquivalent (rund 20 J/ml je nach Substrat⁵⁸) muss für energetische Betrachtungen ein entsprechendes „output-Äquivalent“ gegenübergestellt werden. Der Energiebedarf des arbeitenden Myokards setzt sich dabei im wesentlichen aus dem Basalverbrauch für homöostatische Prozesse (Ionenpumpen, Proteinsynthese etc.), dem Aufwand für Kalziumpumpen im Rahmen der elektromechanischen Kopplung und dem Energiebetrag, der auf myofilamentärer Ebene in potentielle Energie und äußere Arbeit umgewandelt wird.^{58,59} Hier stellt sich das Problem, eine Größe zu definieren, welche die gesamte umgesetzte Energie, unabhängig von Kontraktionsbedingungen (iso(volu)metrisch-isotonisch), Dehnung, Kontraktionsfrequenz, Inotropieparametern und anderen Einflussgrößen, sicher erfasst. Im engeren Sinn leistet das Herz physikalische Arbeit nur als Druck-Volumen-Arbeit. Wegen der zusätzlichen Beiträge zum Gesamtenergieumsatz beschreibt diese äußere Arbeit den gesamten Umsatz aber nur unvollständig. Die verbreitetsten Maße zur Korrelation des Sauerstoffverbrauch mit dem Gesamtumsatz sind die Druck-Volumen Fläche (PVA) nach dem Konzept von Suga, das v.a. im Rahmen von Experimenten an in linken Ventrikeln vivo und in isolierten Herzpräparationen angewandt wird, und andererseits das Kraft-Zeit-Integral (force-time-integral: FTI)^{58,59}. Obwohl FTI weitgehend unabhängig von den Kontraktionsbedingungen sein soll⁶⁰, wird dieses Maß v.a. für Studien unter isometrischen Kontraktionsbedingungen angewandt. Je nach Modell und Fragestellung lassen sich unterschiedlichste Effizienzparameter für den Energieumsatz definieren. Am häufigsten wird, dem Konzept von Suga folgend, die Effizienz der Energieübertragung von MVO_2 zu PVA („contractile efficiency“), als Steigung der entsprechenden Regressionsgeraden, und andererseits mit dem Mass FTI argumentierend, die Ökonomie des Kontraktionsprozesses („economy of contraction“), entsprechend als Geradensteigung der MVO_2 -FTI Relation, betrachtet^{58,59}. Formal besitzt FTI keine physikalische Einheit der physikalischen Energie bzw. der Arbeit (Kraft*Weg), weswegen die Ökonomie nicht in Prozentwerten des Gesamtumsatzes, gemessen am Sauerstoffverbrauch, angegeben werden

kann. Beide Effizienzparameter sind ihrer physikalischen Definition folgend nicht grundsätzlich miteinander korreliert und müssen eher unabhängig voneinander diskutiert werden.

1.6 Sauerstoffverbrauch als Parameter myokardialen Energieumsatzes

1.6.1 Messung des myokardialen Sauerstoffverbrauchs

Seit den Arbeiten von Rohde wurden eine Vielzahl von Ansätzen zur Quantifizierung des myokardialen Energieumsatzes mit Hilfe der Bestimmung des Sauerstoffverbrauchs entwickelt.

Die Messung des myokardialen Sauerstoffverbrauches geschieht im intakten Organismus über die simultane Registrierung von koronarem Blutfluss und, zur Bestimmung der arteriovenösen Sauerstoffdifferenz, von arteriellem und venösem Sauerstoffgehalt in Aorta ascendens und Sinus coronarius. Neben den aufwendigen Versuchsbedingungen setzten Änderungen von Vor- und Nachlast oder des Para- und Sympathikotonus, mit direktem Einfluss auf den myokardialen Sauerstoffverbrauch, der Erforschung der myokardialen Energetik in vivo insoweit Grenzen, als diese Einflussparameter schlecht kontrolliert werden können.

Ähnliche Probleme treten bei Versuchen mit isolierten und von einem zweiten „support“-Tier perfundierten Herzen auf. Hinzu kommt hier die Schwierigkeit der Simulation der physiologischen Druck- und Volumenverhältnisse mit in den Ventrikel eingesetzten Gummiballons, was ebenso für isolierte Herzen nach dem Langendorff Modell gilt. Die beiden ersteren Modelle erlauben jedoch Versuche unter den realitätsnäheren Bedingungen einer Perfusion des Herzens mit Blut.

1.6.2 Messung des Sauerstoffverbrauchs an isolierten Herzmuskelstreifenpräparaten

Die simultane Messung des Sauerstoffverbrauches und mechanischer Parameter an isolierten Herzmuskelstreifenpräparaten ermöglicht die relativ einfache Messung des myokardialen Energieumsatzes. Dabei können die

Kontraktionsbedingungen und die myokardiale Arbeit mittels Variierung von Vordehnung und Stimulationsfrequenz frei definiert werden. Dies ist von besonderer Bedeutung, da die verschiedenen Schritte des myokardialen Energiestoffwechsels über die mechanische Arbeit und die entsprechende ATP Utilisation geregelt werden. Dem Nachteil der fehlenden Blutperfusion des Gewebes steht die Ausschaltung nicht kontrollierbarer systemischer humoraler Faktoren, wie z.B. Hormone oder Zytokine, gegenüber. Des Weiteren wird die freie Konzentration und Wirkung experimentell zugesetzter Pharmaka in kristallinen Perfusionslösungen nur gering durch schwer kalkulierbare pharmakokinetische Faktoren, wie z.B. Proteinbindung, verändert.

Bereits Fenn⁶¹ unternahm 1927 erste Versuche, an isolierten Muskeln Sauerstoffverbrauch und Kraftentwicklung gleichzeitig zu messen. Die direkte Messung von Gaspartialdrücken war aber noch nicht möglich, weshalb man sich mit der Messung der Druck- oder Volumenreduktion in gasgefüllten Kammern behelfen musste. Erst die Erfindung der polarographischen Sauerstoffsonde durch Clark im Jahr 1953⁶² ermöglichte die direkte Messung des Sauerstoffpartialdruckes in wässrigen Lösungen und damit Experimente mit kürzeren Messintervallen und einer besseren zeitlichen Auflösung. Lee führte mit dieser Elektrode Versuche durch und konnte dabei eine Abhängigkeit des Sauerstoffverbrauchs von der Kontraktionsfrequenz zeigen⁶³. Eine Verbesserung erfuhr die durch ihre Ungenauigkeit, v.a. wegen Sauerstoffverlusten auf dem Weg von der Versuchskammer mit dem Muskelstreifen zur nachgeschalteten Sonde, problematische Methode durch die erstmalige Verwendung von „Rührkammern“ durch Lambert⁶⁴. Die Clarksche Sonde befand sich hier in der Versuchskammer in der Nähe des Muskelstreifens. Zur Messung wurde die Perfusion der Kammer mit sauerstoffgesättigter Lösung angehalten und der Abfall des Sauerstoffpartialdruckes registriert. Um eine Hypoxie des Muskelstreifens im Inneren zu verhindern befindet sich in der Messkammer ein Magnetprüher zur homogenen Durchmischung der Lösung. Problematisch und letztlich unbefriedigend blieb bei dieser Methode die reibungsfreie und gleichzeitig

gasdichte Verbindung des Muskelstreifens in der Kammer und der mechanischen Kraftaufnehmer.

Meyer und Keweloh⁶⁵ gelang schließlich die Entwicklung einer verbesserten Methode, die ohne gasdichte Messkammer auskommt und zugleich kürzere Messintervalle bei höherer Auflösung erlaubt. Diese verbesserte Methode der Sauerstoffverbrauchsmessung an isolierten isometrisch kontrahierenden Herzmuskelstreifenpräparaten kam nun in der folgenden Arbeit zum Einsatz.

1.7 Fragestellung

Ziel der vorliegenden Arbeit war:

1. Die Etablierung der Methode im Kardiologischen Forschungslabor der Medizinischen Universitätsklinik in Würzburg.
2. Den in der Arbeit von Miyano beobachteten Effekt hinsichtlich der veränderten Energetik unter $\text{TNF-}\alpha$ an isolierten Muskelstreifenpräparaten zu untersuchen.
3. Weiterführend sollte dann untersucht werden, welchen Mechanismen den beobachteten Effekten bezüglich der Energetik zugrunde liegen. Dabei wurde schon von Miyano⁴⁵ spekuliert, dass eventuell NO eine Rolle bei der beobachteten Erhöhung des Sauerstoffbedarfs spielt. Zum anderen lieferten die aktuellen Erkenntnisse von Sugishita⁴⁴ und Oral⁴³ hinsichtlich der Rolle von Sphingosin im Rahmen des schnellen negativ inotropen Effekts von $\text{TNF-}\alpha$ die Grundlage auch diesen Signalweg hinsichtlich seiner Relevanz für energetische Veränderungen zu untersuchen.

2. Material und Methoden

2.1 Gewinnung von isolierten Muskelstreifenpräparaten

2.1.1 Anästhesie und Herzentnahme

Alle verwendeten Myokardstreifenpräparate entstammen männlichen, 250-400g schweren Wistar-Ratten, die von Fa. Charles River (Sulzfeld) bezogen wurden. Zur Anästhesie wurden die Tiere in einen Topf mit gesättigter Etheratmosphäre verbracht und dort belassen, bis keine Schmerzreaktion an Pfoten und Schwanz mehr auslösbar war. Sodann wurden die Tiere, unter Aufrechterhaltung der Etherinhalation mittels eines über den Kopf gestülpten etherhaltigen Gefäßes, über einen medianen Schnitt thorako-laparotomiert. Nach Darstellung der schlagenden Herzen wurde in die Vorhöfe rund 0,2 ml Heparin injiziert um einen evtl. thrombembolischen Verschluss im Bereich des koronaren Gefäßsystems zu verhindern. Sodann wurde das Herz rasch entnommen und sofort in eine gekühlte Krebs.Henseleit – Butane Dione Monoxime (KHS-BDM) Lösung (Tab. 1) zur Konservierung verbracht. Die dargestellten Schritte fanden zum Schutz vor inhalativer Etherbelastung des Operateurs unter einem Abzug statt.

2.1.2 Präparation und Konservierung

Nach der Explantation wurden die Herzen in einer, mit Carbogen (95% O₂, 5% CO₂) durchperlter KHS-BDM Lösung gefüllten Schale mit eben dieser Lösung blutleer gespült. Dazu wurde das Gewebe mit ungefähr 50 ml Lösung retrograd über eine in die Aorta eingebrachte Knopfkanüle perfundiert, bis sowohl das Gewebe von außen makroskopisch gleichmäßig hell erschien, als auch kein rötliches Efluat aus dem rechten Vorhof, bzw. den Vv. cavae mehr austrat.

Die anschließende Präparation der Muskelstreifen erfolgte unter frischer KHS-BDM Lösung unter einem Stereomikroskop bei 10- bis 25-facher Vergrößerung mit Hilfe mikrochirurgischen Scheren und Pinzetten:

Nach der Entfernung des rechten Vorhofgewebes wurde die Ebene der Trikuspitalklappe dargestellt. Diese wurde am Ansatz vom Ventrikelgewebe abpräpariert, so dass das Klappengewebe weitgehend an den Sehnenfäden

verblieb. Sodann wurde die freie Wand des rechten Ventrikels nach einem Schnitt längs der langen Achse hin zur Herzspitze mobilisiert, um Einblick in die Kammer zu erlangen. Anschließend wurde eine geeignete Region zur Präparation von Herzmuskelstreifen von ungefähr 300-600 µm Durchmesser ausgewählt. Die ausgewählte Region wurde dann entsprechend freigelegt, so dass sich Muskelstreifen möglichst atraumatisch gewinnen ließen. Dabei sollte unter möglichst geringer Manipulation, die zu Mikrotraumatisierung des Gewebes v.a. durch Spannungsentwicklung durch Zug oder Stauchung führen könnte, vorgegangen werden. Daher eigneten sich prinzipiell Papilarmuskeln gut, soweit diese entsprechend dimensioniert vorgefunden werden konnten. Die Haltbarkeit, d.h. die Tauglichkeit für die nachfolgend dargestellten Experimente, des Gewebes erwies sich unter optimalen Bedingungen, unter ständiger Durchperlung mit Carbogen der KHS-BDM Lösung und Kühlung auf Eis, als 3-5 Stunden nach Herzentnahme. Somit waren maximal zwei Versuche, d.h. Streifen, pro Herz möglich.

NaCl	116,1	mmol/l
KCl	5,0	mmol/l
MgCl ₂ (6 H 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
BDM	30,0	mmol/l

Tab. 1 : Zusammensetzung der Krebs-Henseleit (KHS), KHS- 2,3 Butane Dione Monoxime (BDM) Lösung. Chemikalien von Sigma (Deissenhofen)

2.2 Versuchsaufbau für mechanische Messungen

2.2.1 Haltevorrichtung, Perfusion, Stimulation und Dehnung

Eine schematische Ansicht der Messkammer mit der Position von Muskelstreifen, Sauerstoffsonde und Perfusion ist in Abbildung 1 wiedergegeben. Soweit nicht anders angegeben, stammen die Komponenten des Versuchsaufbaus von Scientific Instruments, Heidelberg.

Das Muskelpräparat wurde unter einem Stereomikroskop mit 10-facher Vergrößerung, zwischen einem, in Muskelfaserachse links liegenden, Kraftaufnehmer und einer rechtsliegenden Klemme, mittels Mikropinzetten fixiert. Dabei wurde besonders darauf geachtet, dass der Streifen durch die Manipulation beim Einspannen möglichst gering durch Spannungsentwicklung traumatisiert wurde. Zugleich musste die Faser während des gesamten Experiments gegen Lösung gesichert werden, was durch Vorschub eines Klemmrings um die Pinzettenbranchen von Kraftaufnehmer und rechter Klemmeinrichtung erreicht wurde.

Vom Vorgang des Einspannens an, bis zum Versuchsende befand sich der Streifen allseits umspült in KHS-Perfusionslösung (Tab. 1). Diese wurde in einem doppelwandigen Glasgefäß mittels einer Wasserbadheizung (Haake, DC 10) auf 39°C vorgeheizt und mit Carbogen durchperlt. Mit Hilfe einer Rollenpumpe wurde das Perfusat (Gesamtvolumen 100 ml) der Messkammer zugeleitet, der eine zweite Temperaturregeleinheit vorgeschaltet ist, die die Perfusionslösung auf 37°C konstant einregelt. Der die Messkammer umgebende Metallblock wird ebenfalls kontrolliert beheizt. Diese aufwendige Temperaturregulation ist notwendig, um einerseits die Bildung von Gasblasen zu verhindern und zum anderen den temperaturabhängigen Messvorgang der Sauerstoffelektrode (s.u.) nicht zu beeinflussen.

Die Absaugung der Perfusionslösung zur Recyclierung erfolgte gegenläufig durch die gleiche Rollenpumpe, was einen konstanten Fluss garantiert. Zur Feineinstellung der Flussgeschwindigkeit ist die Umlaufgeschwindigkeit der Rollenpumpe stufenlos regelbar.

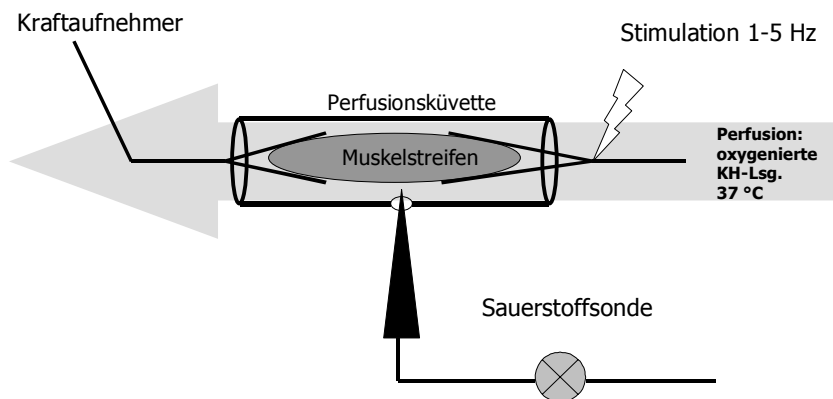


Abb.1 Schema des Versuchsaufbaues

Nach dem Auswaschen des kardiopleg wirkenden BDM erfolgte die elektrische Stimulation des Muskelstreifens über die Halteklemme. Bei einer primären Stimulationsfrequenz von 2 Hz wurde die Höhe des Rechteckimpulses auf 20% über der Reizschwelle eingestellt. Hierzu waren bei einer Reizdauer von 10 ms Spannungen von 2- 4 V notwendig.

Anschließend wurden die Muskelstreifen vorsichtig schrittweise über eine Mikrometerschraube an der beweglichen rechten Klemmeinrichtung vom spannungslosen Grundzustand L_0 bis zu einer optimalen Kraftentwicklung bei L_{max} (definiert durch die Länge, bei der nach Einstellung einer annähernd konstanten Kraftentwicklung durch weiteres Dehnen kein nennenswerter Zuwachs an entwickelter Kraft mehr beobachtet wurde) gedehnt. Zuvor wurde der Kraftaufnehmer bezüglich des diastolischen Kraftniveaus bei L_0 auf Null geeicht. Der Faserdurchmesser konnte mittels einer im Okular befindlichen Skalierung abgeschätzt werden, wobei für die Berechnung der Querschnittsfläche eine kreisrunde Form angenommen wurde. Die durchschnittliche Querschnittsfläche betrug $0,13 \pm 0,06 \text{ mm}^2$ ($n= 11$).

Für die folgenden Versuche wurden nur Muskelstreifen eingeschlossen, die bezüglich der Kraftamplitude einen konstanten „steady state“ Zustand erreichten.

2.2.2 Kraft-Zeit-Integral

Es konnte gezeigt werden, dass unter isometrischen Kontraktionsbedingungen das Integral der über die Zeit registrierten Kraft (Abb. 1) dem Sauerstoffverbrauch proportional, und linear mit diesem korreliert ist^{58,65}. Für gesundes Myokard ohne aktive diastolische Spannungserzeugung gilt dies für das Integral der systolisch entwickelten Kraft FTI, in Abbildung 2 mit FTI bezeichnet.

Da sich isometrisch kontrahierende Muskelstreifen per definitionem nicht verkürzen, verrichten sie im physikalischen Sinn keine Arbeit (Kraft-Weg Produkt). Trotz fehlender physikalischer Arbeit ist der Energieumsatz bei isometrischer Kontraktion gegenüber Ruhebedingungen erhöht und man spricht hier von „Haltearbeit“. Das Kraft-Zeit-Integral stellt dabei einen Surrogatparameter zur Erfassung der Arbeit bei isometrischer Kontraktion dar. Das Auswertungsprogramm „twitch“ (Scientific Instruments) errechnet aus der Mittelung einer variablen Anzahl von Kontraktionen den Wert dieses Integrals bezogen auf die Zeit und die Querschnittsfläche des Streifens als $\text{mN} \cdot \text{s} / \text{s} \cdot \text{mm}^2$.

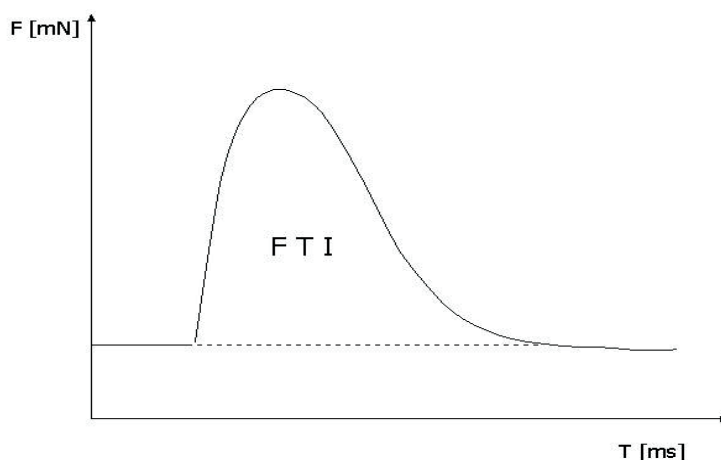


Abb.2: Kraft-Zeit-Integral (FTI)

2.2.3 Aufzeichnung der mechanischen Daten und Versuchsdurchführung

Der verwendete Kraftaufnehmer besitzt einen Messbereich von 0 – 100 mN und zeichnet die isometrische Spannungsentwicklung des Muskelstreifens auf. Die aufgenommenen mechanischen Daten wurden über ein Interface mit Hilfe des Programms „twitch“ (Scientific Instruments) simultan aufgezeichnet und auf einer graphischen Benutzeroberfläche dargestellt. Zugleich wurden die Kraftamplitude und das Sondensignal (s.u.) mit einem Flachbettsschreiber (Kipp & Zonen, BD 41) aufgezeichnet. Die gemessene Kraft wurde auf den Streifenquerschnitt bezogen als $\mu\text{N}/\text{mm}^2$ angegeben.

Nach Erreichen einer konstanten Kraftentwicklung unter der Stimulationsfrequenz 2 Hz konnte mit dem Versuchsprotokoll begonnen werden: Die mechanische Arbeit pro Zeiteinheit wurde über die Stimulationsfrequenz von 1-5 Hz (60-300 Schläge / min) in 1Hz Schritten gesteigert. Entsprechend steigt der Sauerstoffverbrauch an. Nach Erreichen einer konstanten Kraftentwicklung wurde für jede Stimulationsfrequenz der Sauerstoffverbrauch (s.u.) aufgezeichnet, sowie während des 25-sekündigen Messintervalls die entwickelte Kraft und FTI mit Hilfe der speziellen Software „twitch“ registriert und gemittelt gespeichert.

Die Versuche waren alle paarig angelegt. Das bedeutet, dass jeder Streifen in zwei Durchgängen jeweils von 1-5 Hz stimuliert wurde. Zuerst unter Kontrollbedingungen, sodann nochmals nach Zugabe einer Substanz zur Perfusionslösung. Ausgeschlossen wurden solche Streifen, die nach Wechsel von 5 auf 1 Hz das ursprüngliche Niveau der anfangs bei 1 Hz entwickelten Kraft deutlich unterschritten.

2.3 Versuchsaufbau für Sauerstoffverbrauchsmessungen

2.3.1 Aufbau und Messprinzip

Grundlage der Sauerstoffverbrauchsmessung ist die Aufzeichnung des Sauerstoffpartialdruckes in der Messkammer mit Hilfe einer Clarkschen Sauerstoffsonde (Abb.3). Ihr Messprinzip basiert auf einer Redoxreaktion,

deren Reaktionsgeschwindigkeit von der Menge des an der Kathode zur Verfügung stehenden und durch die Membran diffundierenden Sauerstoffs abhängt.

Die Sauerstoffsonde besteht aus einem Golddraht mit ungefähr 50 µm Durchmesser, der in eine Glaskapillare eingeschmolzen ist. Diese befindet sich in einem Silberröhrchen, aus dem sie an der Spitze etwa 500 µm hervorragt. Die Oberfläche der Kapillare ist mit einem Kunststoff überzogen, der für kleine Moleküle, wie Sauerstoff selektiv permeabel ist.

Sauerstoffmoleküle diffundieren abhängig vom Sauerstoffpartialdruck in der Perfusionslösung durch die Kunststoffmembran und werden an der Goldkathode reduziert, dabei entsteht Wasser und in geringer Menge als Nebenreaktion Wasserstoffperoxid. An der Silberanode wird zugleich Silber oxidiert und unterhält somit die Reduktion des Sauerstoffs. Der dabei fließende Strom ist proportional zum Sauerstoffpartialdruck in der die Sondenspitze umgebenden Lösung. Dieser Messstrom wird als SONDENSIGNAL aufgezeichnet.

Die Elektrode verbraucht selbst kontinuierlich geringe Mengen Sauerstoff. Dies wird relevant, wenn zur Messung des Sauerstoffverbrauchs des Muskelstreifens die Perfusion mit sauerstoffhaltiger Lösung kurz abgestellt wird. In der stehenden Lösung bildet sich dann um die Kathode (Sondenspitze) ein diffusionsabhängiger Sauerstoffpartialdruckgradient. Folglich ist das Messsignal solcher polarographischer Sonden bei gleichem Sauerstoffgehalt in fließender Lösung etwas höher.

Während des Messintervalls erzeugt das Myokardgewebe durch seinen Sauerstoffverbrauch einen konstanten Abfall des Sauerstoffpartialdruckes in der umgebenden Lösung. Dieser Abfall überlagert sich mit dem Verbrauch der Sonde, so dass der registrierte Abfall primär nicht linear ist. Dieser Effekt wird als „Röhreffekt“⁶⁸ bezeichnet. Der initiale nichtlineare Abfall des Messstroms wurde jeweils vor Versuchsbeginn zum Ausschluss dieses genannten systematischen Fehlers während einer Probemessung erfasst und dauerte jeweils zwischen 2 und 15 Sekunden.

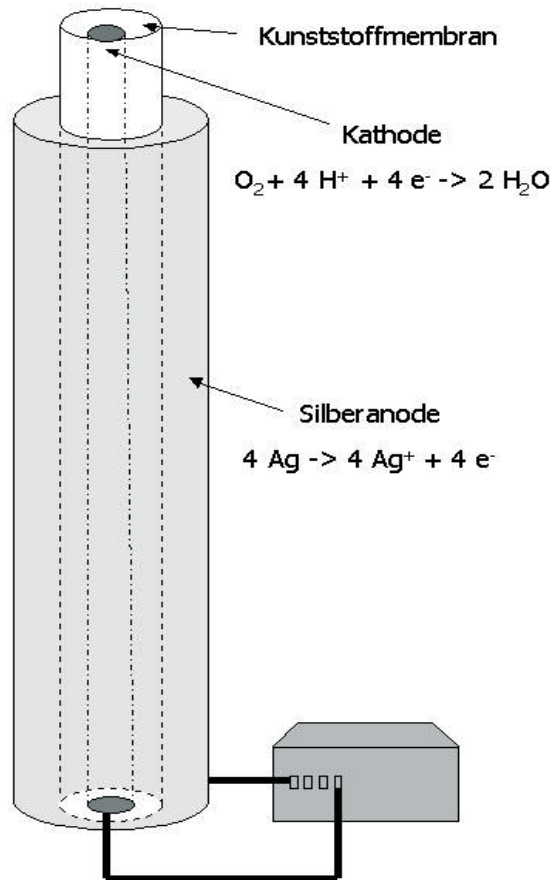


Abb.3: Schema einer Clarkschen Sauerstoffelektrode

2.3.2 Messvorgang und Auswertung des Messsignals

Zur Messung des Sauerstoffverbrauchs während des Experiments wird der Verlauf des Sauerstoffpartialdruckabfalls, gemessen am Sondenstrom in einem definierten Abstand von der Muskelstreifenoberfläche, 50-200 μm , eingestellt an einer Mikrometerschraube, in einem Intervall von 25 Sekunden aufgezeichnet. Dabei ist die Perfusion abgestellt; dies bedeutet, die Lösung in der Messkammer ruht und die Sauerstoffverteilung ist nur diffusionsabhängig. Je größer der Sauerstoffverbrauch des Muskelstreifens, desto steiler ist nun der Abfall des Messsignals (Abb.4).

Mit Kenntnis des Löslichkeitskoeffizienten, des Messkammervolumens und des Sauerstoffpartialdruckes im Perfusat, bestimmt mit einem externen Blutgasanalysator (Radiometer, Kopenhagen), lässt sich die Sauerstoffkonzentration der Lösung errechnen. Die Steilheit des Sondensignals im zweiten Teil der Kurve ist dabei dem Sauerstoffverbrauch proportional.

Von Prof. K. Güth (Scientific Instruments) wurden mit Hilfe des Fickschen Diffusionsgesetzes für definierte Verbrauchswerte Sauerstoffpartialdruckprofile, in Abhängigkeit vom Abstand zur Mitte des Streifens, errechnet (Abb.5, Fig. 1). Aus diesen ergibt sich wiederum der zeitliche Verlauf des Partialdruckabfalles für bestimmte Sondenabstände (Abb. 5, Fig. 2).

Diese Partialdruckprofile und die abgeleiteten Partialdruckkurven sind im Programm „oxc“ (Scientific Instruments) hinterlegt. Unter Vorgabe des Muskelstreifendurchmessers, des Abstandes der Sondenspitze von der Oberfläche des Muskelstreifens, des Sauerstoffpartialdruckes im Perfusat und der Dauer des „Rühreffektes“ wird vom Programm durch Kurvenanpassung aus der aufgezeichneten Kurve der Sauerstoffverbrauch errechnet. Die aktuell aufgezeichnete Kurve wird dabei mit den gespeicherten Kurven verglichen, wobei zur Kurvenanpassung nur der zweite Teil des Messsignals (Abb.4) berücksichtigt wird, nachdem vor Versuchsbeginn die Dauer des Rühreffektes aus dem Messsignal bestimmt und dem Programm eingegeben wurde. Der systematische Fehler durch den Eigenverbrauch der Sonde wird so vermieden.

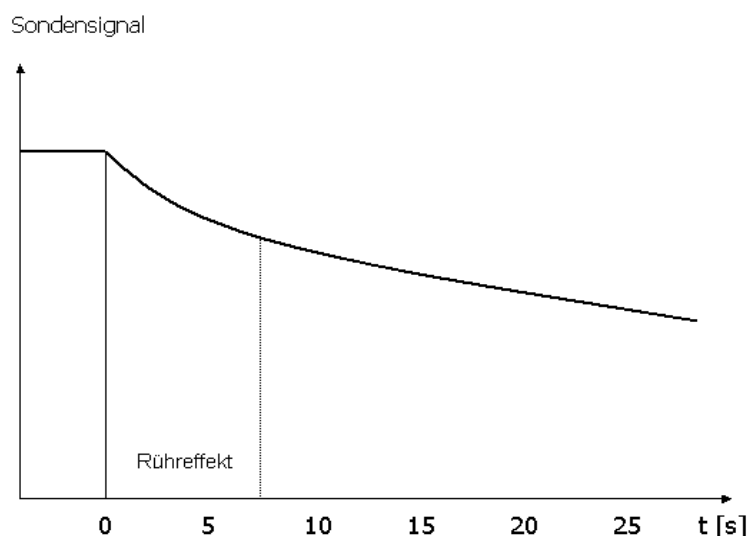


Abb.4: Abfall des Sondensignals nach Anhalten der Perfusion

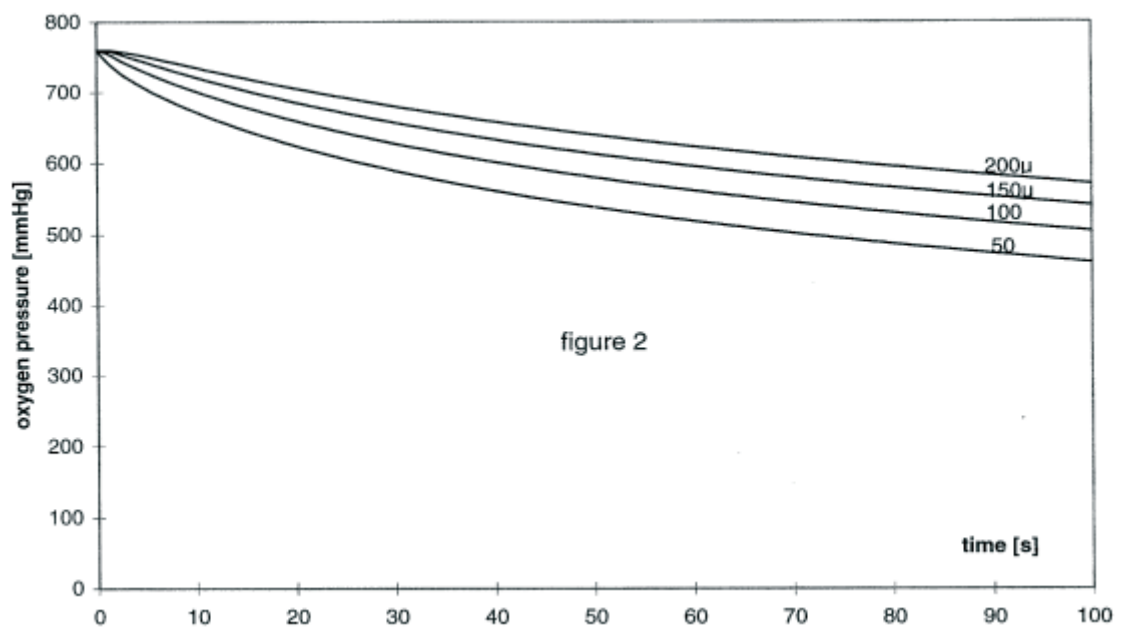
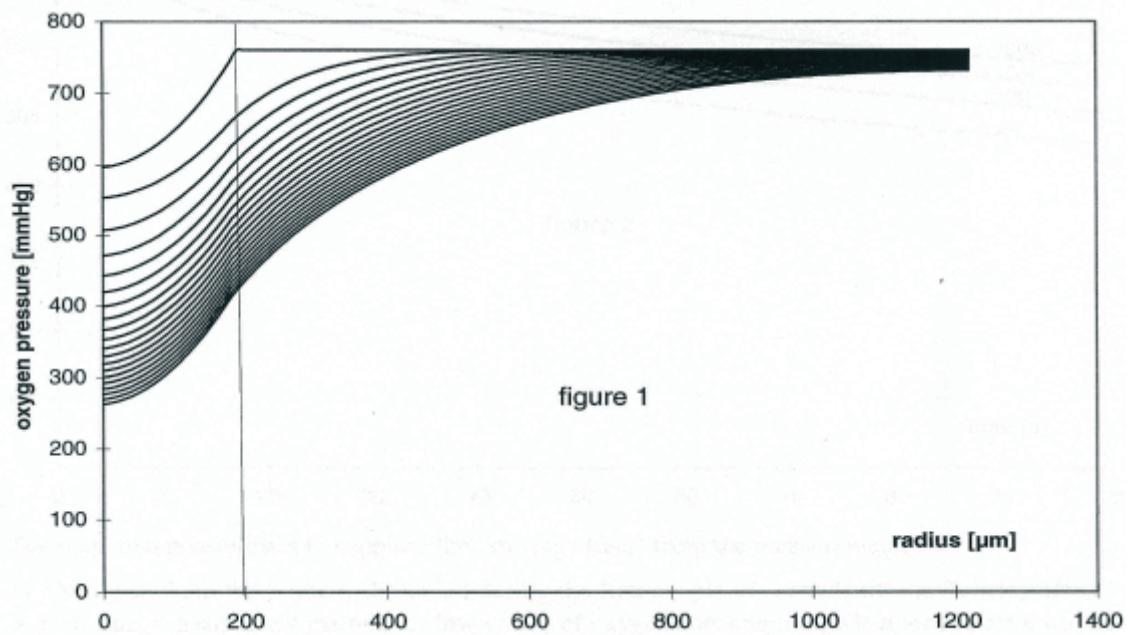


Abb. 5:

Sauerstoffkonzentrationsprofile für den Verbrauch 0,06 ml/ml/min. Die 200 μm Linie stellt die Muskelstreifenoberfläche dar. Das Zeitintervall zwischen den Profilen beträgt jeweils 5 s (Figure 1). Daraus ergeben sich abstandsabhängige Sauerstoffpartialdruckkurven (Figure 2). (aus: "manual for the muscle research system", Scientific Instruments)

Die Angabe des Sauerstoffverbrauchs erfolgt in ml [O₂]/ mm³ /min.

Bei zu geringen kalkulierten Sauerstoffpartialdrücken im Zentrum des Muskelstreifens warnt das Programm „preparation hypoxic“. Dies kann bei zu dicken Streifen auftreten, da hier bei abgestellter Perfusion die Diffusion nicht mehr zur Versorgung des zentralen Gewebeanteils ausreicht.

2.4 Versuchsprogramm

2.4.1 Effekte von Tumornekrosefaktor- α

Zur Untersuchung der Effekte von TNF- α auf Mechanik und Energetik des Muskelstreifenpräparates wurde rekombinanter Ratten- TNF- α (R&D Systems) verwandt. Das Zytokin wird als Lyophilisat geliefert und wurde gemäß Herstellerangaben in PBS-Lösung mit mindestens 0,1 % Serum Albumin Anteil gelöst und danach portioniert eingefroren (-20 °C).

Im Verlauf der Versuche wurde nach dem ersten Frequenzdurchgang diese TNF- α Lösung in entsprechender Menge dem KHS-Perfusat zugegeben, um die Endkonzentrationen von 50 pg/ml und 5 ng/ml zu erzielen. Zur Festlegung dieser Konzentrationen wurden zuvor Dosisversuche unternommen, wobei sich bei geringeren Konzentrationen kein stabiler Effekt zeigte. Die Perfusionslösung wurde nach Durchfluss der Messkammer rezykliert (s.o.).

2.4.2 Blockierung der NO-Synthasen

Um die NO Produktion des Muskelstreifengewebes zu blockieren wurde ein unspezifischer Inhibitor⁶⁹ der NO-Synthasen, N-nitro-L-argininmethylester (L-NAME) verwandt. L-NAME wurde in 500 μ M Konzentration der KHS-Lösung zugegeben und der Streifen so unter Kontraktionsbedingungen vor Versuchsbeginn jeweils eine Stunde inkubiert. Ein zweiter Messdurchgang erfolgte unter zusätzlicher TNF- α Stimulation.

2.4.3 Blockierung der Ceramidasen

N-oleoylethanolamin (NOE) inhibiert die TNF- α abhängige Ceramidaseaktivität^{43,70}. Die Substanz wurde in Dimethylsulfoxid (DMSO)

gelöst in 5 μM Konzentration der KHS-Perfusionslösung zugegeben und der Streifen ebenfalls unter Kontraktionsbedingungen jeweils eine Stunde inkubiert. Die Konzentration von DMSO im Perfusat blieb dabei unter 0,1%. Konzentrationen von über 0,1% DMSO wirken negativ inotrop auf Muskelstreifenpräparate (unveröffentlichte Untersuchung der Arbeitsgruppe von Dr. Bonz).

Nach einem ersten Frequenzdurchgang erfolgte wiederum ein zweiter unter zusätzlicher TNF- α Stimulation.

2.4.4 Effekt von exogenem Sphingosin

Zur Nachahmung des Effekts von TNF- α wurde D-Sphingosin gelöst in DMSO in 1 μM Konzentration dem Perfusat nach einem ersten Frequenzdurchgang zugegeben. Diese Konzentration entspricht in etwa der intrazellulär zu erwartenden unter TNF- α Stimulation^{43,71}. Die Inkubationszeit betrug 15 Minuten.

Alle Konzentrationen wurden gewählt, nachdem sich in Vorversuchen unter diesen ein stabiler Effekt zeigte.

2.5 Auswertung

Die Auswertung der gemessenen Werte geschah mit Hilfe des Tabellenkalkulationsprogramms „Excel“ (Microsoft). Das Programm „twitch“ (Scientific Instruments, Heidelberg), das zur Aufzeichnung der mechanischen Daten verwandt wurde, liefert hierfür exportfähige Dateien. Die Sauerstoffverbrauchswerte zu den gespeicherten mechanischen Werten wurden vom Programm „oxc“ (Scientific Instruments, Heidelberg) auf einem gesonderten Rechner hinterlegt und sind manuell ausgelesen worden. Als zusätzliche Kontrolle dienten dabei die analogen Aufzeichnungen des Sondensignals mittels des Schreibers.

Eine lineare Korrelation zwischen myokardialem Sauerstoffverbrauch und dem Kraft-Zeit-Integral der aktiv entwickelten Kraft konnte für intaktes humanes Myokard gezeigt werden⁵⁸. Entsprechen lassen sich beide Größen in einem x-

y-Koordinatensystem in Beziehung setzen und eine Regressionsgerade errechnen. Aus dieser lassen sich jeweils zweierlei Befunde ableiten:

Der y-Achsenabschnitt der Gerade, d.h. FTI gleich Null, kann als ein Maß für den Ruhesauerstoffverbrauch des Gewebes betrachtet werden. Die Steigung der Regressionsgerade stellt ein inverses Maß für die Ökonomie des aktiven Kontraktionsprozesses, der chemo-mechanischen Konversion, dar^{58,72}.

Der Quotient Sauerstoffverbrauch/FTI, also der spezifische Sauerstoffverbrauch eines Muskelstreifens unter definierten Kontraktionsbedingungen, würde dagegen diese Differenzierung in kontraktionsbezogenen und Basalenergieumsatz allein nicht erlauben.

Die Regressionsgeraden für die lineare Beziehung zwischen FTI und Sauerstoffverbrauch wurden mit den entsprechenden Funktionen von „Excel“ (Microsoft) errechnet.

2.6 Statistik

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe des Excel „add-in“ WinSTAT (Beneke&Schwippert).

Verbundene Daten wurden mittels Wilcoxon Test, unverbundene mittels Mann-Whitney-U-test untersucht. Wiederholte Messungen am gleichen Präparat wurden durch Varianzanalyse (ANOVA for repeated measurements) verglichen. Werte $p < 0,05$ wurden dabei jeweils als signifikant erachtet.

Alle Daten sind als Mittelwert \pm Standardfehler (SEM) angegeben.

3. Ergebnisse

3.1 Effekte von Tumornekrosefaktor- α

Zugabe von 5 ng/ ml TNF- α führten zu einem raschen negativen Effekt auf die aktiv entwickelte Kraft der Muskelstreifen unter den durchwegs gewählten isometrischen Kontraktionsbedingungen. Im Rahmen der Umlaufzeit der Perfusionslösung von etwa einer Minute war die Wirkung auf die Mechanik rasch, d.h. in einem Zeitraum kleiner fünf Minuten zu beobachten. Nach zehn Minuten TNF- α Stimulation wurde mit der Messung des Frequenzdurchganges 1-2-3-4-5 Hz begonnen. Abbildung 6 zeigt die frequenz-abhängige Reduktion der isometrisch entwickelten Kraft im Vergleich zu Kontrollbedingungen für die Konzentrationen 5 pg/ ml, 50 pg/ ml und 5 ng/ ml. Die Reduktion der entwickelten Kraft betrug, über den gesamten Frequenzbereich gemittelt, unter 5 ng/ ml TNF- α $39 \pm 3 \%$ (n= 11). Die deutlich geringeren Konzentrationen von 50 pg/ ml und 5 pg/ ml erzeugten ebenfalls einen signifikanten negativ inotropen Effekt. Die Kraft-Frequenz Beziehung blieb unter allen TNF- α Konzentrationen qualitativ unverändert. TNF- α zeigte neben dem Einfluss auf die Mechanik eine deutliche Wirkung auf die myokardiale Energetik. TNF- α Konzentrationen von 50 pg/ml und 5 ng/ml bewirkten dosisabhängig eine signifikante Erhöhung des spezifischen Sauerstoffverbrauchs (MVO_2/FTI) (Abb. 7). Der Auftrag der einzelnen Messpunkte bei unterschiedlichen Frequenzen zeigt (Abb. 8D, dass diese Erhöhung des Energieumsatzes auf eine deutliche Verschlechterung der Ökonomie des aktiven Kontraktionsprozesses, abzulesen an der steileren Regressionsgerade, zurückzuführen ist. Für die sehr niedrige TNF- α Konzentration von 5 pg/ ml war dieser Effekt auf die Steigung, im Gegensatz zu zur rein mechanischen Wirkung nicht signifikant (Abb. 8A). Der Basalsauerstoffverbrauch, gemessen am y-Achsenabschnitt der Regressionsgeraden, blieb unter allen Konzentrationen unverändert. Unter Kontrollbedingungen wie nach TNF- α Stimulation bestand jeweils ein hochgradig linearer Zusammenhang zwischen MVO_2 und FTI ($r^2 > 0,80$ für Einzelexperimente und $r^2 > 0,95$ für kumulative Betrachtung).

Auf Grund des signifikanten Effektes auf Mechanik und Energetik wurden die folgenden Experimente unter einer TNF- α Konzentration von 5 ng/ ml durchgeführt.

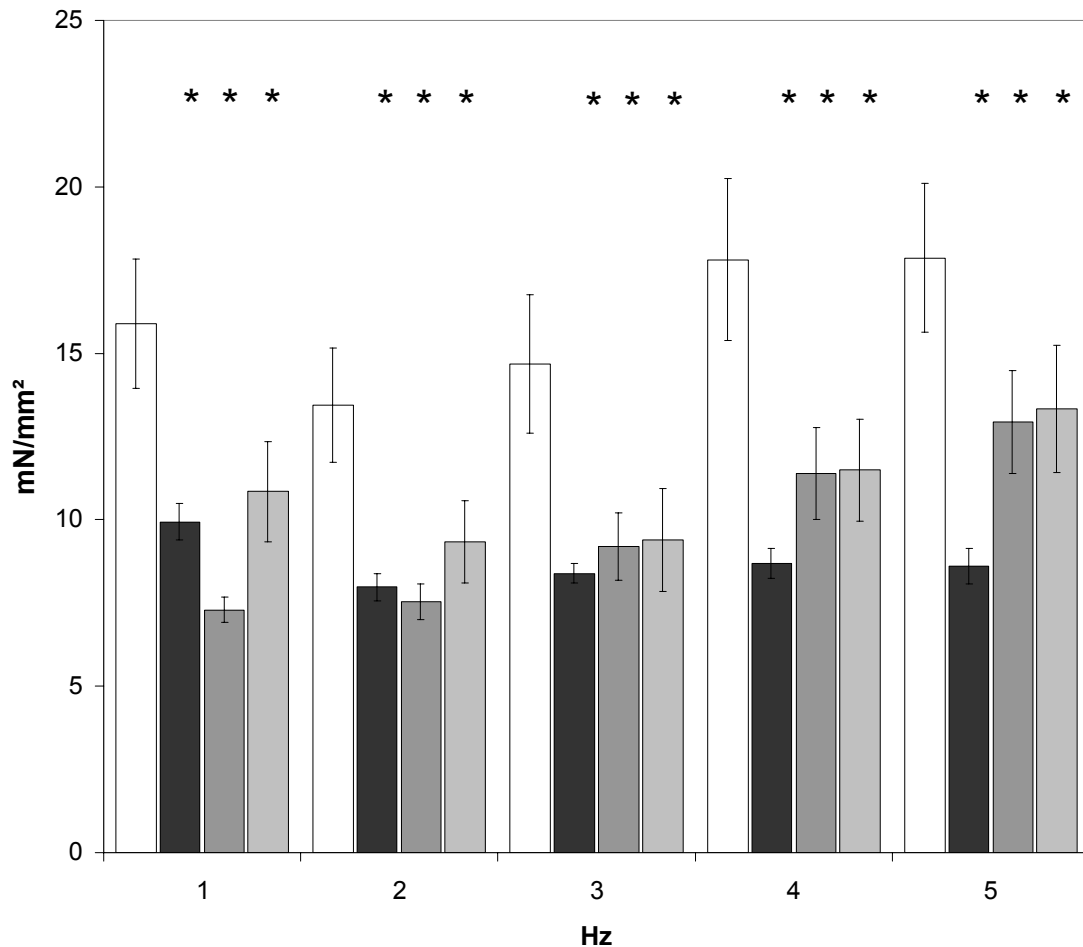


Abb.6: TNF- α in den Konzentrationen, 5pg/ ml (schwarz, $9,94 \pm 0,55$ mN/mm² (1 Hz), $7,97 \pm 0,40$ (2 Hz), $8,39 \pm 0,29$ (3 Hz), $8,69 \pm 0,44$ (4 Hz), $8,60 \pm 0,53$ (5 Hz), n= 7), 50 pg/ ml (dunkelgrau; $7,29 \pm 0,37$ mN/mm² (1 Hz), $7,53 \pm 0,53$ (2 Hz), $9,20 \pm 1,00$ (3 Hz), $11,38 \pm 1,38$ (4 Hz), $12,93 \pm 1,55$ (5 Hz), n= 7) und 5 ng/ ml (hellgrau; $10,84 \pm 1,34$ mN/mm² (1 Hz), $9,34 \pm 1,24$ (2 Hz), $9,40 \pm 1,54$ (3 Hz), $11,49 \pm 1,54$ (4 Hz), $13,33 \pm 1,92$ (5 Hz), n= 11) bewirkten je einen signifikant negativ inotropen Effekt gegenüber Kontrollstreifen (weiß; $15,88 \pm 1,94$ mN/mm² (1 Hz), $13,44 \pm 1,71$ (2 Hz), $14,67 \pm 2,08$ (3 Hz), $17,81 \pm 2,42$ (4 Hz), $17,86 \pm 2,24$ (5 Hz); n= 10), (* p<0,05 je vs. Kontrolle).

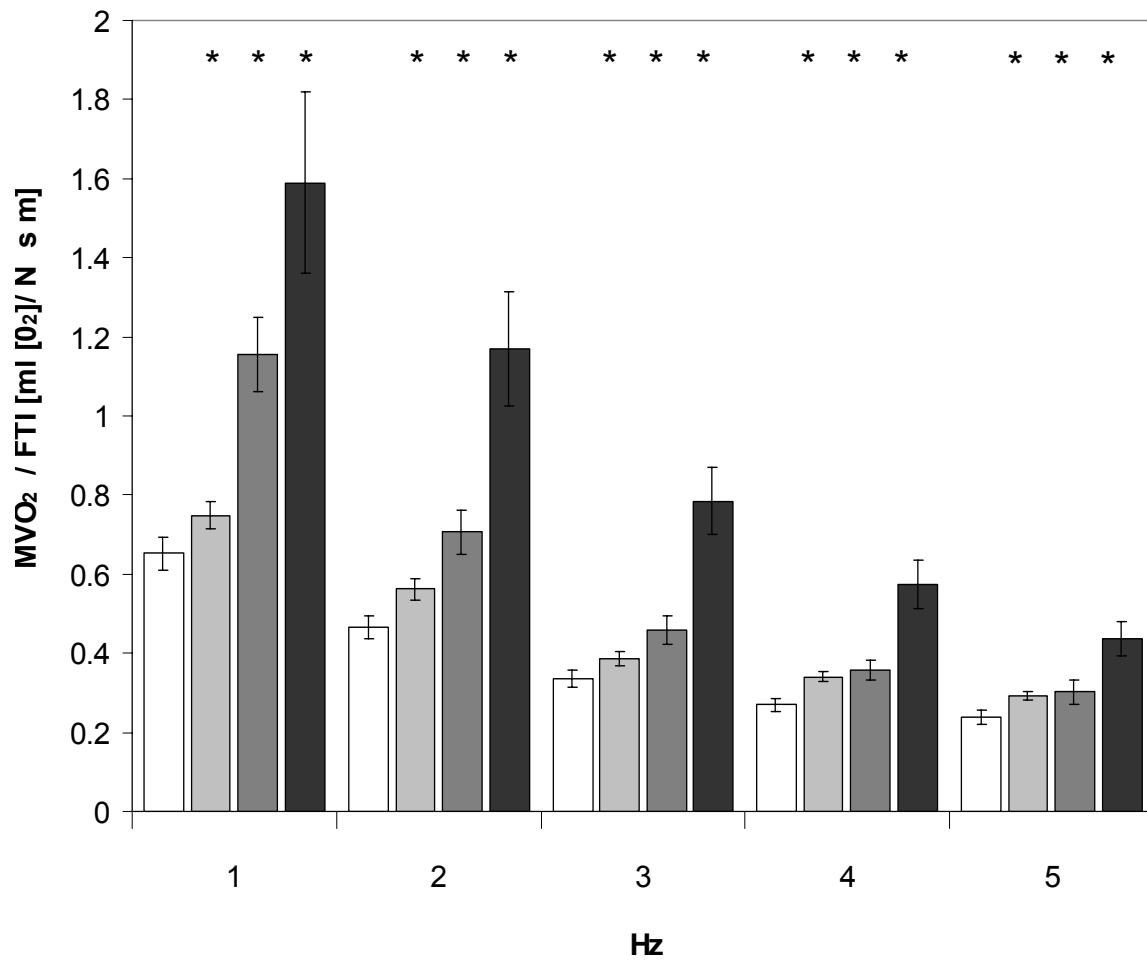


Abb.7: TNF- α erhöhte dosisabhängig den spezifischen Sauerstoffverbrauch (MVO_2/FTI [ml/N·s·m]) unter Konzentrationen von 5 pg/ ml (hellgrau; n= 7, * p< 0,05), 50 pg/ ml (mittelgrau; n= 8, * p< 0,05) und 5 ng/ ml (dunkelgrau= 11, * p< 0,05) gegenüber Kontrollbedingungen (weiß , n= 11).

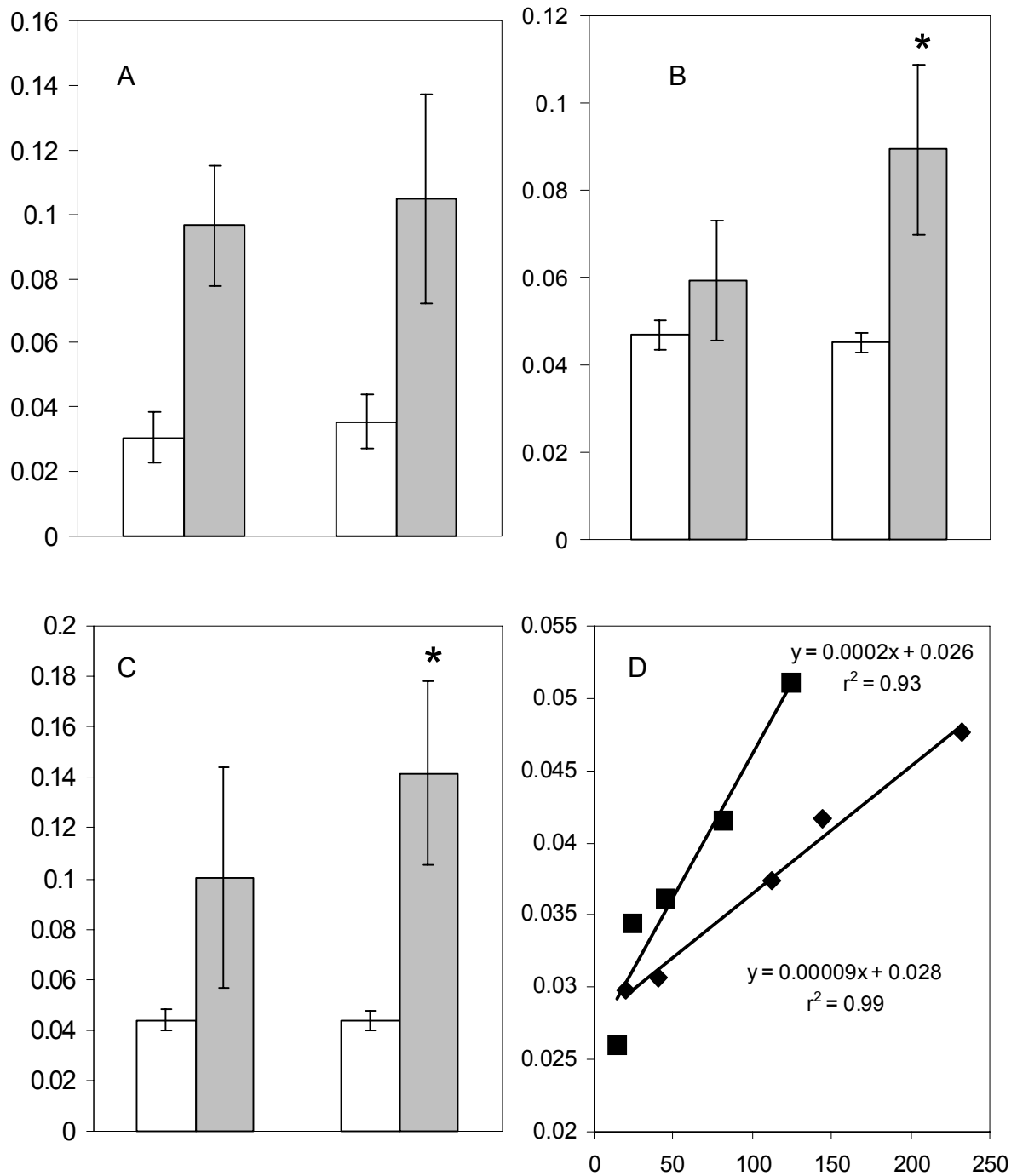


Abb. 8: Achsenabschnitt (weiße Balken) und Steigung der Regressionsgeraden ($\cdot 1000$) (graue Balken) jeweils unter Kontrollbedingungen (linke Säulenpaare) und TNF- α (A: 5pg/ml, B: 50pg/ml, C: 5ng/ml). 50pg/ml ($n=7$) und 5ng/ml TNF- α ($n=7$) bewirkten einen signifikanten Effekt auf die Steigung (* $p<0,05$), während der Basalverbrauch jeweils unverändert blieb.

D: Exemplarisches Experiment vor und nach 5 ng/ml TNF- α .

3.2 Blockierung der NO Synthesen

Inhibition der NO-Synthesen mittels L-NAME (500 μ M) führte nach einstündiger Inkubation zu einer deutlichen Reduktion der entwickelten Kraft um $31 \pm 6 \%$ ($n= 10$) gegenüber Kontrollbedingungen (Abb 9). Die Kraft-Frequenz Beziehung blieb dabei unverändert. Neben der Wirkung auf die Mechanik war unter L-NAME ein erhöhter Sauerstoffverbrauch zu beobachten. Dies war auf eine signifikante Erhöhung des Basalverbrauches zurückzuführen, während die Ökonomie der aktiven Krafterzeugung unverändert blieb (Abb. 10).

Zugabe von TNF- α in einer Konzentration von 5 ng/ml führte nur im Frequenzbereich von 4 und 5 Hz noch zu einem tendenziellen, aber nicht signifikanten zusätzlich negativ inotropen Effekt. TNF- α bewirkte unter L-NAME eine signifikante Erhöhung des Sauerstoffverbrauches, die wie Abbildung 9 zeigt, wiederum auf eine verschlechterte Ökonomie des Kontraktionsprozesses zurückzuführen ist. Eine weitere Veränderung des Ruheenergieumsatzes gemessen am Basalsauerstoffverbrauch war nicht zu beobachten.

3.3 Blockierung der Ceramidasen

Der Ceramidase-Inhibitor NOE reduziert nach einstündiger Inkubation die entwickelten Kraft um durchschnittlich $45 \pm 4 \%$ (Abb. 12).

Nach Inhibition der Sphingosinproduktion aus Ceramid mittels NOE (5 μ M) zeigt TNF- α weiterhin einen signifikanten negativ inotropen Effekt auf die vorinkubierten Muskelstreifen, in Form einer zusätzlichen mittleren Kraftreduktion von $31 \pm 5\%$ ($n= 11$) (Abb.12).

TNF- α bewirkt unter NOE keine Erhöhung, sondern eine signifikante Erniedrigung der Steigung der Regressionsgerade. Dabei zeigte sich im Vergleich mit den Kontrollexperimenten, dass NOE die Steigung signifikant erhöht. TNF- α macht also den Effekt des Ceramidaseinhibitors qualitativ rückgängig. Weiterhin erhöhte sich unter NOE nach Zugabe von TNF- α der Basalverbrauch (Abb. 13).

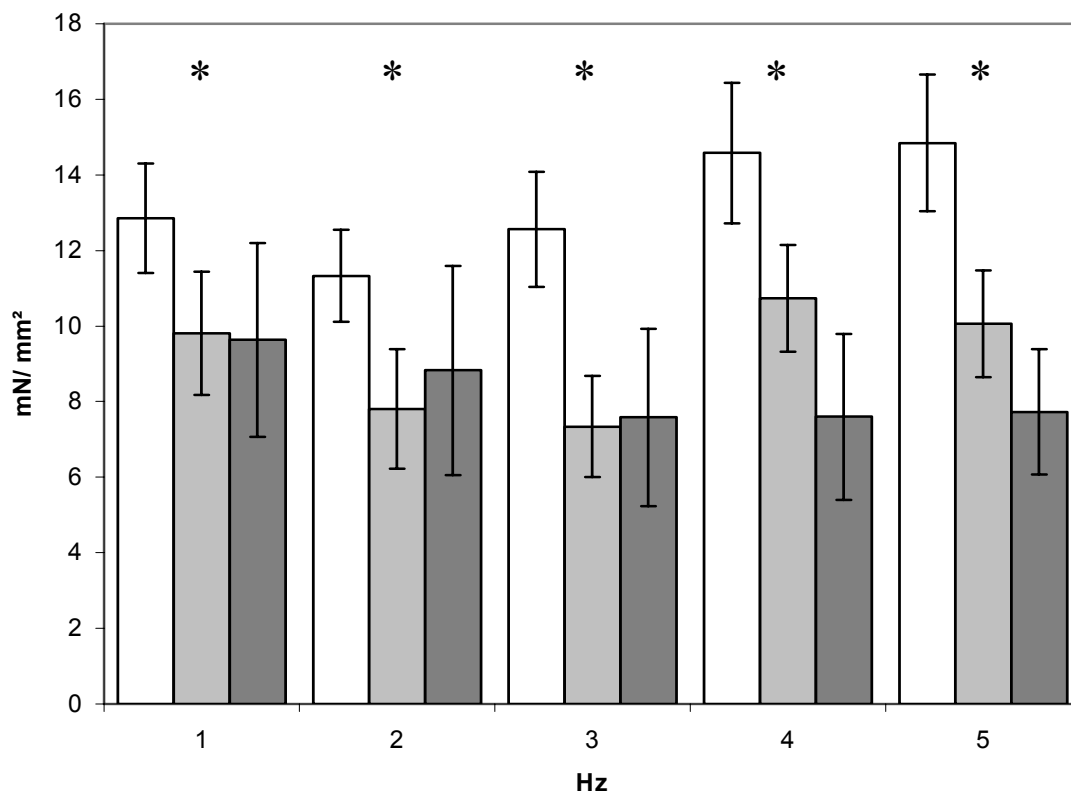


Abb. 9: Entwickelte Kraft von Kontrollstreifen (weiß, n=20), L-NAME (500µM) inkubierten (hellgrau, n=19) und zusätzlich TNF-α (5 ng/ml) stimulierten Streifen (dunkelgrau, n= 11). L-NAME bewirkte einen signifikant negativ inotropen Effekt (12,85 ± 1,44 vs 9,80 ± 1,62 mN/mm² (1 Hz), 11,33 ± 1,22 vs 7,81 ± 1,58 mN/mm² (2 Hz), 12,56 ± 1,53 vs 7,34 ± 1,33 mN/mm² (3 Hz), 14,58 ± 1,85 vs 10,74 ± 4,11 mN/mm² (4 Hz), 14,84 ± 1,81 vs 10,06 ± 1,41 mN/mm² (5 Hz), *p<0,05). TNF-α zeigte keinen weiteren signifikanten Effekt gegenüber L-NAME inkubierten Streifen.

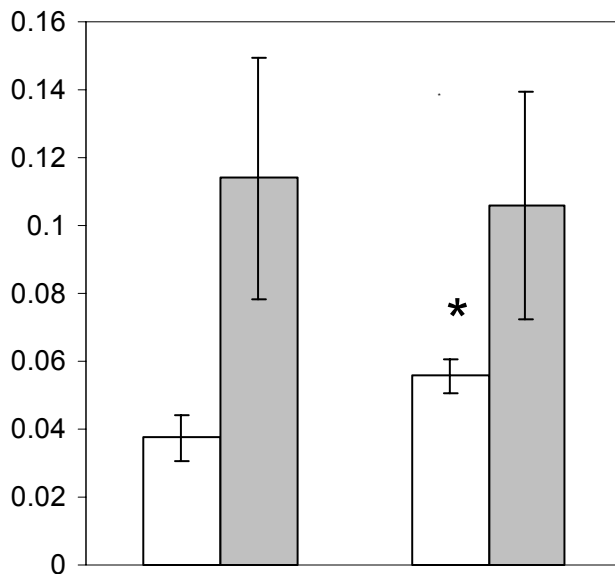


Abb. 10: Achsenabschnitt (weiße Balken) und Steigung der Regressionsgeraden ($\cdot 1000$) (graue Balken) unter Kontrolle und 500 μM L-NAME: Der Achsenabschnitt stieg signifikant an (0,037 vs 0,056 ml/ mm³/ min, n= 10, p<0,05), während die Ökonomie (Steigung 0,114, vs 0,106) unverändert blieb.

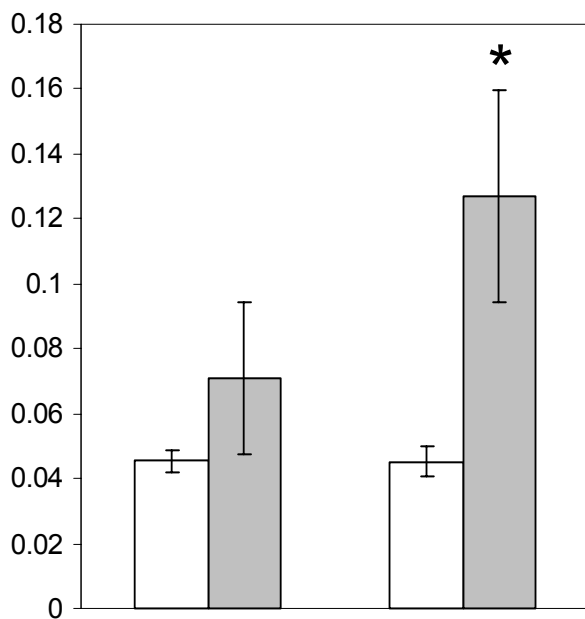


Abb. 11: Achsenabschnitt (weiße Balken) und Steigung der Regressionsgeraden ($\cdot 1000$) (graue Balken) unter L-NAME (500 μM) Vorinkubation und zusätzlicher TNF- α (5ng/ml) Stimulation: TNF- α bewirkte unter L-NAME einen signifikanten Effekt auf die Ökonomie des Kontraktionsprozesses (Steigung 0,057 vs 0,073, n=12, p< 0,05), während der Basalverbrauch unverändert blieb. (0,051 vs. 0,052 ml/mm³/min).

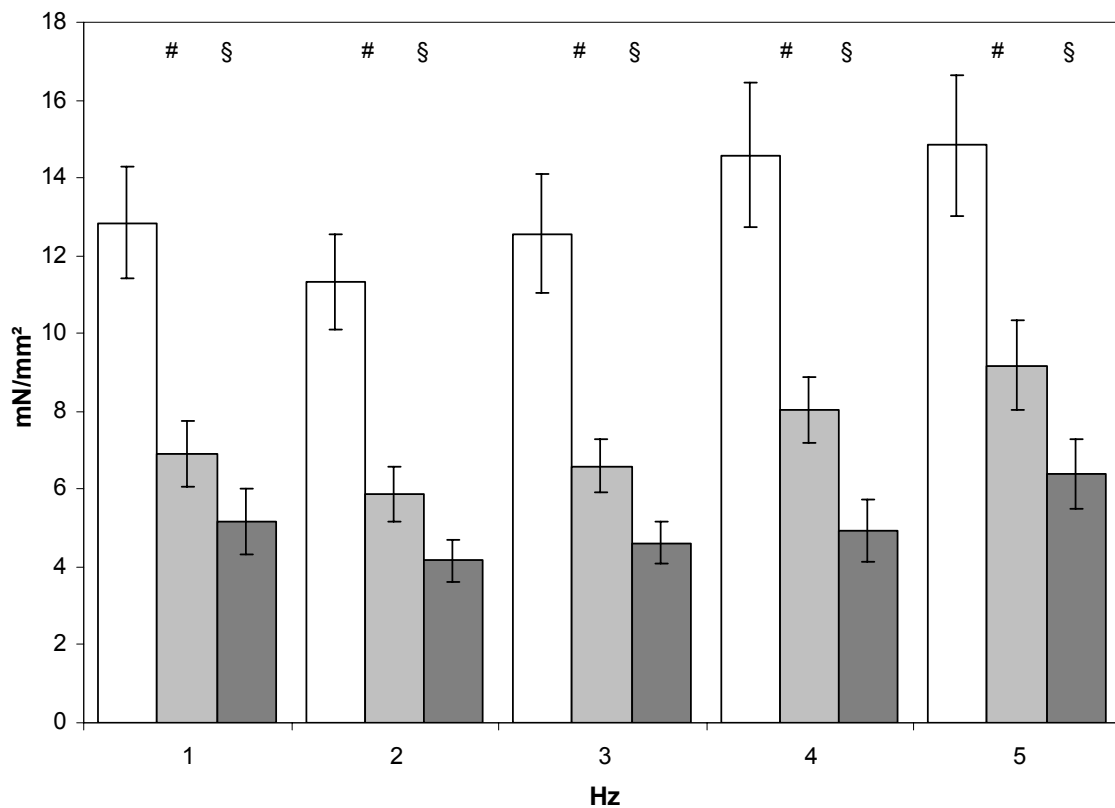


Abb. 12: NOE (5 μM) bewirkte einen negativ inotropen Effekt gegenüber Kontrollbedingungen (weiß, n=20). ($6,90 \pm 0,83 \text{ mN/mm}^2$ vs $12,85 \pm 1,44 \text{ mN/mm}^2$ bei 1 Hz; $5,88 \pm 0,71 \text{ mN/mm}^2$ vs $11,33 \pm 1,22 \text{ mN/mm}^2$ bei 2 Hz; $6,60 \pm 0,70 \text{ mN/mm}^2$ vs $12,56 \pm 1,53 \text{ mN/mm}^2$ bei 3 Hz; $8,04 \pm 0,85 \text{ mN/mm}^2$ vs $14,58 \pm 1,85 \text{ mN/mm}^2$ bei 4 Hz; $9,19 \pm 1,15 \text{ mN/mm}^2$ vs $14,84 \pm 1,81 \text{ mN/mm}^2$ bei 5 Hz; # p<0,05). Unter NOE (hellgrau, n=11) führte TNF- α (dunkelgrau, n=11) zu einer weiteren signifikanten Reduktion der entwickelten Kraft. ($6,90 \pm 0,83 \text{ mN/mm}^2$ bei 1 Hz, $5,88 \pm 0,71 \text{ mN/mm}^2$ bei 2 Hz, $6,60 \pm 0,70 \text{ mN/mm}^2$ bei 3 Hz, $8,04 \pm 0,85 \text{ mN/mm}^2$ bei 4 Hz, $9,19 \pm 1,15 \text{ mN/mm}^2$ bei 5 Hz, n=11, § p<0,05).

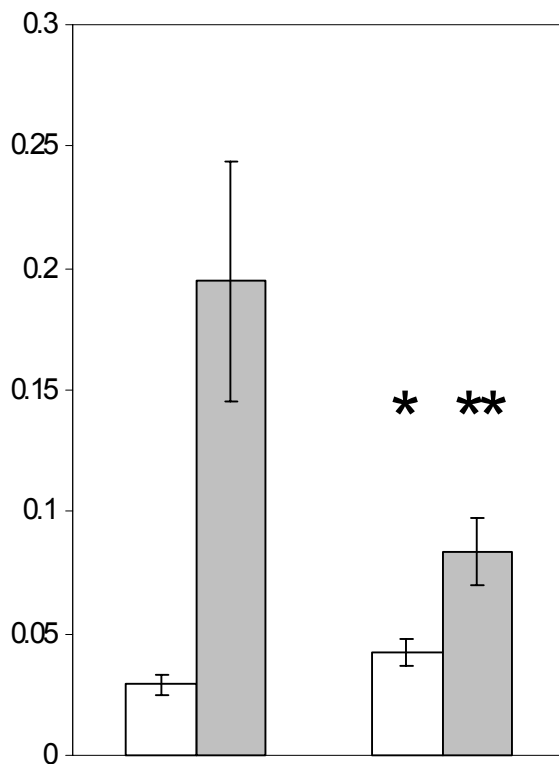


Abb. 13 : Achsenabschnitt (weiße Balken) und Steigung der Regressionsgeraden (grau) ($\cdot 1000$) unter NOE ($5\mu\text{M}$) Vorinkubation und zusätzlicher $\text{TNF-}\alpha$ (5ng/ml) Stimulation: Unter NOE erhöht $\text{TNF-}\alpha$ den Basalverbrauch ($0,029$ vs $0,042$ [$\text{ml/ mm}^3 \text{ min}$], $n= 11$, * $p<0,05$) und erniedrigt die Steigung ($n= 11$, * $p<0,05$). Die Steigung der Regressionsgeraden ist unter $\text{TNF-}\alpha$ ($0,195$ vs $0,084$) erniedrigt ($n= 11$, ** $p<0,05$), gegenüber Kontrollbedingungen ohne NOE (nicht dargestellt) unverändert.

3.4 Effekt von exogenem Sphingosin

Exogenes Sphingosin bewirkt ein analoges Muster mechanoenergetischer Veränderungen wie $\text{TNF-}\alpha$: Die Zugabe von D-Sphingosin ($1 \mu\text{M}$) zur Perfusionslösung bewirkte einen signifikanten negativ inotropen Effekt. Die mittlere entwickelte Kraft war unter Sphingosin um $58 \pm 5 \%$ ($n= 8$) verringert (Abb. 14). Weiterhin bewirkte exogenes Sphingosin einen Effekt auf die Energetik der Muskelstreifen: Bei unverändertem Basalverbrauch verschlechterte sich die Ökonomie des aktiven Kontraktionsprozesses, gemessen an der vergrößerten Steigung der Regressionsgerade, signifikant (Abb. 15).

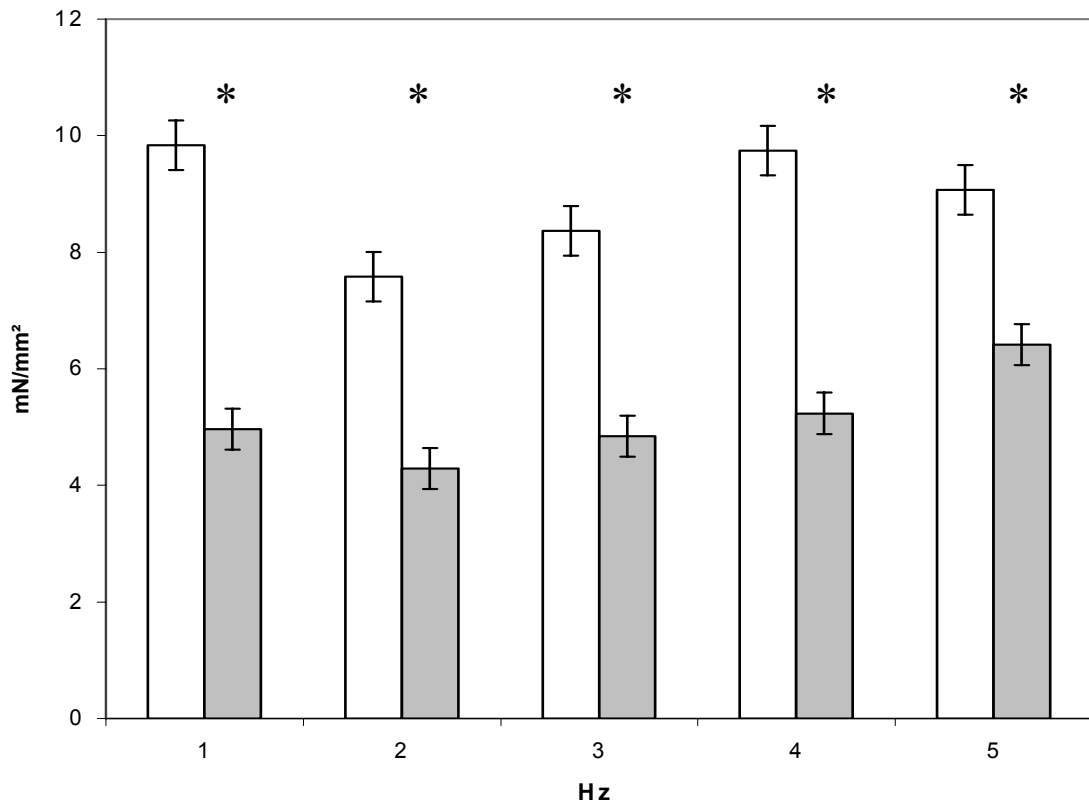


Abb. 14: D-Sphingosin (1 µM) bewirkte eine signifikante Reduktion der entwickelten Kraft $4,96 \pm 4,29$ mN/mm² (Kontr. $9,83 \pm 0,42$ mN/mm² bei 1 Hz, * p<0,05), $4,29 \pm 0,48$ mN/mm² (Kontr. $7,58 \pm 0,63$ mN/mm² bei 2 Hz, * p<0,05), $4,84 \pm 0,79$ mN/mm² (Kontr. $8,37 \pm 0,98$ mN/mm² bei 3 Hz, * p<0,05), $5,23 \pm 0,90$ mN/mm² (Kontrolle $9,74 \pm 0,13$ mN/mm² bei 4 Hz, * p<0,05), $6,42 \pm 0,91$ mN/mm² (Kontrolle $9,07 \pm 0,15$ mN/mm² bei 5 Hz, * p<0,05; n= 8).

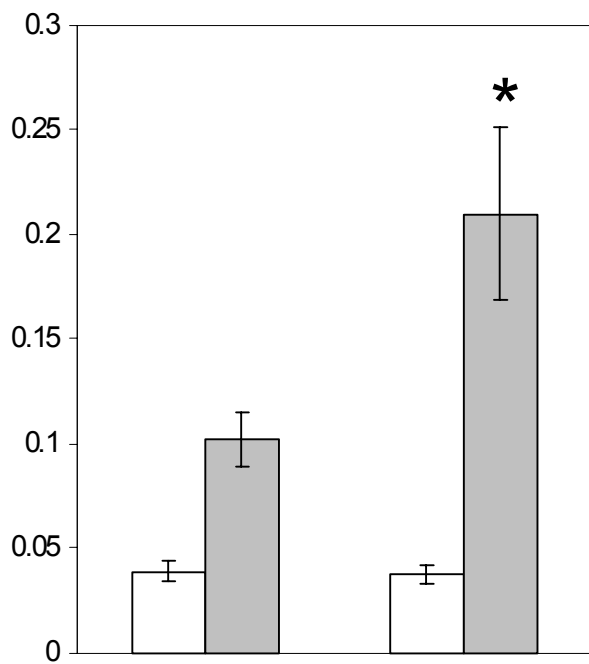


Abb. 15: Achsenabschnitt (weiße Balken) und Steigung der Regressionsgeraden ($\cdot 1000$) (graue Balken) unter Kontrollbedingungen und exogenem Sphingosin (1 μ M): Sphingosin bewirkte einen signifikanten Effekt auf die Ökonomie des Kontraktionsprozesses, gemessen an der Steigung der Regressionsgerade. (0,059 vs. 0,157, $n = 8$, $p < 0,05$), während der Basalverbrauch unbeeinflusst blieb (0,039 vs. 0,046 ml/mm²/min).

4. Diskussion

4.1 Sauerstoffverbrauchsmessung, Limitationen der Methode

Die Validierung der hier angewandten Methode zur Bestimmung des Sauerstoffverbrauchs an isolierten Herzmuskelstreifen und der daraus abgeleiteten Schlüsse auf den myokardialen Energieumsatz wurde von Keweloh und Meyer⁶⁵ durchgeführt. Die Methode erlaubt die simultane Bestimmung von Sauerstoffverbrauch und mechanischen Parametern. Das Modell der kristallin perfundierten Muskelstreifenpräparate vermeidet dabei die Nachteile von in vivo Messungen, insbesondere den Einfluss von endogenen und pharmakokinetischen Faktoren im in vivo blutperfundierten Myokard und eignet sich daher besonders für Versuche mit pharmakologisch wirksamen Substanzen. Zugleich ist die mechanische Funktion des Muskelstreifens während der Versuche frei definierbar, so dass energetische Untersuchungen unter verschiedenen kontrollierbaren Funktionszuständen möglich werden.

In vivo spielen Fettsäuren als Energiequelle eine bedeutende Rolle für den myokardialen Metabolismus. Das hier verwandte Modell verzichtet allerdings auf die Perfusion mit komplexen Substratmischungen, um Veränderungen des Sauerstoffverbrauchs allein aufgrund von Verschiebungen im relativen Anteil der metabolisierten Substrate, mit unterschiedlichen respiratorischen Quotienten, ausschließen zu können.

Die Bestimmung der Sauerstoffverbrauchswerte beinhaltet im Wesentlichen zwei mögliche Fehlerquellen: 1. Werte sind jeweils auf das Gewebevolumen bezogen angegeben. Die dazu notwendige Bestimmung des Muskelstreifenquerschnittes mittels der Skalierung im Okular ist allerdings durch Ablesefehler und die nicht absolut kreisrunde Querschnittsfläche der Streifen etwas ungenau. Dies betrifft ebenso die Angabe der entwickelten Kraft pro Querschnittsfläche.

2. Es ist hier technisch nicht möglich das polarographische System gegenüber einem externen äußeren Standart zu eichen.

Diese Einschränkungen betreffen ausdrücklich nur Aussagen bezüglich der absoluten Sauerstoffverbrauchswerte bzw. Kraftwerte; die Angaben der

vorliegenden Arbeit sollten folglich nur auf der Basis von Relativwerten betrachtet werden. Entsprechend wurden auch die wesentlichen Messungen paarig als Konsekutivmessungen an je einem Muskelstreifen, deren Anzahl jeweils mit „n“ angegeben ist, durchgeführt und so statistisch ausgewertet. Somit schränken diese Limitationen die qualitative Aussagekraft der hier dargestellten Ergebnisse keineswegs ein, da sich die wesentlichen Aussagen von konsekutiven Messungen an einem Streifen ableiten.

Für isolierte Rattenherzen konnte gezeigt werden, dass es nach einhundertminütiger ex vivo Perfusion im Langendorff-Modell zu einer signifikanten Verschlechterung der Effizienz kommt⁷³. Dieser Effekt wird durch die Bildung von Peroxynitrit, auf der Basis einer iNOS Expression im isolierten Herz bewirkt und konnte mittels Cycloheximid, einem Proteinsynthese Inhibitor, aufgehoben werden. Die Autoren der Studie spekulieren, dass es unter den Versuchsbedingungen zu einer Zytokin- und dadurch wiederum ausgelöst, starken iNOS Expression kommt. Ein solcher Mechanismus könnte auch im Streifenmodell als systemischer Fehler den TNF- α Effekt beeinflusst haben. Dagegen fand sich in der vorliegenden Arbeit aber keine Beeinflussung der myokardialen Ökonomie unter L-NAME, einem unspezifischen NOS-Inhibitor. Weiterhin konnte in Vorversuchen und nach Erfahrungen der Arbeitsgruppe Keweloh (Universität Göttingen) unter Kontrollbedingungen keine Veränderung der Ökonomie über die Zeit festgestellt werden. Dennoch sollte auch in zukünftigen Studien dieser Effekt beachtet werden und die Versuchsdauer im Streifenmodell zeitlich auf den hier gewählten Rahmen begrenzt bleiben.

Direkte Messung des Sauerstoffverbrauchs von reversibel mechanisch beeinträchtigtem („stunned“) post-ischämischem Myokard sowohl an isolierten Herzen, als auch in vivo, zeigten eine verringerte Effizienz bzw. Ökonomie der myokardialen Arbeit⁷⁴⁻⁷⁶. Diese energetischen Veränderungen sind z.T. mit dem in zahlreichen Studien beobachteten gestörtem Kalziummetabolismus und verringerter Kalziumsensitivität vereinbar^{75,77,78}. Es ist grundsätzlich nicht auszuschließen, dass durch die Präparation das Gewebe ein solches „stunning“ erfahren hat und somit auch ein systemischer Fehler bei allen mechanoenergetischen Messungen aufgetreten ist. Der Einsatz von BDM und

die Präparation in oxygenierter Lösung sollten eine potentielle ischämische Beeinträchtigung minimieren, dennoch lässt sich eine kurzfristige Ischämie während der Herzentnahme aus dem anästhesierten Tier nicht vermeiden.

Die Versuche wurden aus präparationstechnischen Gründen durchgängig mit Gewebe des rechten Ventrikels durchgeführt. Es existieren nur wenige Veröffentlichungen zur Physiologie des rechten Ventrikels. In energetischer Hinsicht wurde der rechte Ventrikel von der Arbeitsgruppe von Suga unter dem PVA-Konzept untersucht⁷⁹. Es zeigten sich keine relevanten Unterschiede zum mechanoenergetischen Verhalten des linken Ventrikels. Daher werden in der vorliegenden Arbeit alle Konzepte, die aus Studien am linken Ventrikel abgeleitet wurden, auf rechtsventrikuläres Myokard übertragen.

4.2 Effekte von TNF- α auf Mechanik und Energetik

Der Hersteller des hier verwandten rekombinanten Zytokins gibt für Assays unter Zellkulturbedingungen eine EC₅₀ von 10-20 pmol/ml an. Es konnte in der vorliegenden Studie mit diesem Produkt gezeigt werden, dass TNF- α ab einer Konzentration von 50 pg/ml binnen Minuten zu einer signifikanten Verschlechterung der Ökonomie des myokardialen Kontraktionsprozesses führt. Die tatsächlich erreichte Konzentration an den Myozyten des Streifengewebes sollte wegen der schlechteren Diffusionsbedingungen und potentieller unspezifischer Bindung an Komponenten des Versuchsaufbaues allerdings etwas geringer sein, als formal angegeben. Die in der vorliegenden Arbeit verwandten Konzentrationen liegen jeweils rund um den Faktor zehn bis hundert über den Mittelwerten der unter den Bedingungen der chronischen Herzinsuffizienz und bei Patienten mit hypertrophischer Kardiomyopathie in humanem Plasma beobachteten Werte. Die beiden Erkrankungen zeigten in einer Untersuchung von Matsumori¹⁴ die niedrigsten bzw. die höchsten systemischen TNF- α Konzentrationen, welche bei Herzerkrankungen gefunden werden. Gerade hinsichtlich der sehr hohen Konzentrationen in der Arbeit von Miyano et al.⁴⁵, im Rahmen der erstmals ein energetischer Effekt von TNF- α beobachtet wurde, sollen diese Angaben verdeutlichen, dass die hier

beobachteten Effekte durchaus unter in vivo Bedingungen relevant sein können. Übertragen auf das Tiermodell Ratte wurden quantitativ vergleichbare Konzentrationen von mehreren pg/ml im Infarktmodell bis zu einigen ng/ml nach Lipopolysaccharidinfusion beobachtet^{7,19}. Bezüglich der wirksamen TNF- α Konzentrationen ist bislang allerdings nicht befriedigend geklärt, wie hoch die tatsächlichen Konzentrationen oder Aktivitäten in vivo lokal im Myokardgewebe anzusetzen sind und inwieweit andererseits die Plasmaspiegel Ausdruck der myokardialen TNF- α Expression und Wirkung sind. Es ist aber anzunehmen, dass im Rahmen der lokalen Expression im Gewebe weitaus höhere Konzentrationen wirksam werden. Andererseits modulieren freie TNF- α bindende Proteine, so die solublen TNF- α Rezeptorformen, in unbekannter Art die Bindung und Wirkung von TNF- α an seinen Zelloberflächenrezeptoren^{3,4,80}. Der Auftrag gegen FTI erlaubt es den Sauerstoffverbrauch als Parameter des Energieumsatzes weiter zu untergliedern. Grundsätzlich setzt sich dieser aus drei maßgeblichen Beiträgen zusammen⁵⁸: I. Dem Basalverbrauch des Gewebes, II. dem Energieaufwand für den Kalziumumsatz im Rahmen der elektromechanischen Kopplung und III. dem für die Kraft- bzw. Spannungserzeugung auf myofilamentärer Ebene. Die beiden letzteren Faktoren machen zusammen den Hauptanteil aus und variieren unter verschiedenen Kontraktionsbedingungen und pathologischen Bedingungen⁵⁸. Die inverse Steigung der MVO₂-FTI Regressionsgerade stellt ein Maß für die Ökonomie der mechanischen Arbeit dar. Der suprabasale Sauerstoffverbrauch setzt sich aus dem Aufwand für die elektromechanische Kopplung, also im Wesentlichen die Kalziumextrusion aus dem Zytosol mittels der sarkoplasmatischen Kalzium-ATPasen und des Natrium-Kalzium Austauschers der Plasmamembran, und dem Energieumsatz für die aktive Spannungserzeugung auf Querbrückenebene zusammen. Daher lässt sich Ökonomie des Kontraktionsvorganges auch für jede Frequenz als Quotient aus FTI und suprabasalem Sauerstoffverbrauch ausdrücken. .

Aus der Beobachtung, dass TNF- α die Steigung der MVO₂-FTI Regressionsgeraden vergrößert, lässt sich also ableiten, dass der erhöhte Sauerstoffverbrauch bei, wegen des gleichzeitig beobachteten negativ

inotropen Effektes, verringerter mechanischer Arbeit, auf einer verschlechterten Ökonomie der chemomechanischen Konversion beruht. Die Ökonomie des Kontraktionsprozesses wird von Faktoren bestimmt, die den spezifischen Energiebedarf der Querbrückenaktivität oder des Kalziumstoffwechsels beeinflussen⁵⁸. Veränderungen auf der Ebene der mitochondrialen ATP-Bereitstellung und des Basalumsatzes der Zelle können also die hier beobachteten Veränderungen nicht erklären. Dies entspricht der Beobachtung von Arbeit von Miyano et al.⁴⁵, die bei Versuchen an einem isolierten blutperfundierten Kaninchenherzen eine unveränderten Steigung der MVO_2 -PVA Relation bei erhöhtem Achsenabschnitt beobachteten. Da im Rahmen des PVA-Konzepts, der Achsenabschnitt den Basalumsatz und den spannungsunabhängigen Sauerstoffaufwand widerspiegelt, schloss man auf eine Veränderung im Bereich des Erregungs-Kontraktions-Zyklus als Ursache für den erhöhten spezifischen Sauerstoffverbrauch. In der genannten Studie wurden allerdings etwa tausendfach höhere Konzentrationen von humanem TNF- α kontinuierlich infundiert, wobei sich darunter kein deutlicher Effekt auf die Kontraktilität zeigte. Weiterhin beobachtete man⁸¹ an Kardiomyozyten nach chronischer Exposition mit TNF- α (> 24 h) einen Effekt auf den mitochondrialen Atmungskettenkomplex I verbunden mit einem verringertem Sauerstoffumsatz. Gerade diese Arbeit weist darauf hin, dass möglicherweise unter längerfristiger TNF- α Exposition nicht nur bezüglich der mechanischen Effekte, sondern auch der Energetik, zusätzliche Mechanismen relevant werden können - hier sei v.a. die iNOS Expression genannt. Solche potentiellen Auswirkungen chronischer Zytokinstimulation wurden in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht.

Mechanoenergetische Veränderungen auf der Ebene der Ökonomie des aktiven Kontraktionsprozesses wurden bislang insbesondere für insuffizientes Myokardgewebe untersucht⁸². Hier konnte gezeigt werden, dass eine Veränderung der Myosin- und Troponinisotypenexpression, sowie ein verändertes Troponin-Phosphorylierungsmuster mit Alterationen der myokardialen Ökonomie einhergehen⁸³. Gerade die Entdeckung, dass die Proteinkinase ASK-1, ein Bestandteil TNF- α abhängiger Signalwege, Troponin-T phosphorylieren kann und so zur mechanischer Dysfunktion führt, könnte

neben dem möglicherweise veränderten Kalziumumsatz einen weiteren Ansatzpunkt für die Erklärung der in der vorliegenden Arbeit beobachteten Effekte liefern.

Die Energetik unter $\text{TNF-}\alpha$ sollte auf der Ebene der energiereichen Phosphate weiter untersucht werden. Um diese mittels HPLC quantifizieren zu können müssen die Proben schockgefroren werden, was mit den Streifenpräparaten aus technischen Gründen nicht möglich ist. Daher wurden mit Rattenherzen Versuche in einer Langendorff Apparatur unternommen und das Gewebe dann per „freez-clamp“ schockgefroren. Die HPLC-Analyse der ATP/ADP- und Phosphokreatin/ Kreatin- Ratio erbrachte keine signifikante Veränderung nach $\text{TNF-}\alpha$ Stimulation. Da aber gleichzeitig auch unter hohen Konzentrationen kein signifikanter mechanischer Effekt nachgewiesen werden konnte, ist es wahrscheinlich, dass $\text{TNF-}\alpha$ nicht in wirksamer Konzentration im Myokard vorhanden war. Möglicherweise kommt es an den vergleichsweise grossen Oberflächen des Perfusionssystems der Langendorff-Apparatur zur Adsorption des zugesetzten Zytokins. Daher wurde auf eine weitere Darstellung im Ergebnisteil verzichtet.

4.3 NO-vermittelte Effekte

Der negativ inotrope Effekt von $\text{TNF-}\alpha$ wird, soweit bislang bekannt, in der Herzmuskelzelle durch zwei Signaltransduktionswege vermittelt⁴. Oral⁴³ konnte zeigen, dass die schnelle Wirkung durch Sphingosin vermittelt wird. Daneben scheint, wie schon länger bekannt, NO bei der Vermittlung verzögerter Effekte eine Rolle zu spielen. Auf der Basis der bisherigen Veröffentlichungen bleibt unsicher, inwieweit der schnelle Effekt auf die Mechanik auch NO-vermittelt ist, was von Finckel et al.⁴¹ beobachtet wurde. Insbesondere ist hierbei unklar, ob und wie durch $\text{TNF-}\alpha$ konstitutiv aktive NO-Synthasen reguliert werden. Eine unüberprüfte Hypothese wäre, dass durch die Veränderungen des intrazellulären Kalziummetabolismus, die für den mechanischen Effekt ursächlich zu sein scheint, kalziumsensitive NO-Synthasen beeinflusst werden.

In den vorliegenden Versuchen bewirkte TNF- α keinen statistisch signifikanten, aber bei Stimulationsfrequenzen von 4 und 5 Hz tendenziell sichtbaren Effekt auf die Krafterzeugung des Herzmuskelstreifens nach Inkubation mit dem unselektiven NOS Inhibitor L-NAME. Daraus kann hinsichtlich der Relevanz von NO für den schnellen negativ inotropen Effekt keine abschließende Aussage getroffen werden. Die nicht signifikante weitere Kraftreduktion bei hohen Frequenzen, nach Inhibition der NO-Synthasen könnte für eine nicht vollständige Hemmung der NOS, andererseits aber für einen zusätzlichen NO-unabhängigen Effekt sprechen. Eventuell ist die schnelle Kraftreduktion also durch mehrere, evtl. frequenzabhängige Mechanismen bedingt. So konnte in einer weiteren Arbeit⁸⁴ der mechanische Effekt von TNF- α sowohl mittels NOE, als auch L-NAME beeinflusst werden.

Die relativ hohe, negativ inotrop wirkende Konzentration von L-NAME wurde gewählt um für die energetische Untersuchung eine möglichst vollständige Inhibition der NO Produktion zu erreichen. Anderweitig wurde ebenfalls gezeigt, dass die pharmakologische Inhibition der konstitutiven NO Synthese zu einer verschlechterten mechanischen Funktion führt⁴⁶. Es handelt sich also bei der hier beobachteten Kraftreduktion unter L-NAME wohl nicht um einen substanzspezifischen toxischen Effekt, sondern um einen wirkungsspezifischen Effekt der NOS Inhibition.

Auf der Ebene des Sauerstoffverbrauchs führte die L-NAME Inkubation alleine zu einer signifikanten Erhöhung des Basalverbrauchs und steigerte so den spezifischen Sauerstoffverbrauch des Herzmuskelstreifens. Dabei ist bekannt, dass das hoch diffusible NO den Energiestoffwechsel der Herzmuskelzelle beeinflusst. Als Quelle kommt dabei neben den NOS der Herzmuskelzelle v.a. endotheliale NO Produktion in Frage⁸⁵. In früheren Studien wurde sowohl ein inhibitorischer als auch ein steigernder Effekt auf den Sauerstoffverbrauch beobachtet. Der Einfluss scheint dabei über Veränderungen der Substratutilisation⁸⁶ und durch direkte Wirkung auf die mitochondriale Atmungskette⁸⁷ zustande zu kommen. Die Erkenntnisse hierzu sind allerdings schwer zu interpretieren, da in vivo NO insbesondere auch Kontraktilität und regionale Perfusion moduliert. Mehrere in vivo und in vitro Studien konnten

zeigen, dass NOS Inhibitoren den basalen Sauerstoffverbrauch des Gewebes steigern und andererseits NO einen attenuierenden Einfluss auf die mitochondriale Funktion besitzt⁸⁵.

Auf mit L-NAME inkubierte Muskelstreifen übt TNF- α in der vorliegenden Studie einen qualitativ ähnlichen energetischen Effekt aus, wie auf natives Gewebe. Dies erlaubt den Schluss, dass der energetische Effekt von TNF- α nicht NO vermittelt zu sein scheint. Gegen eine NO abhängige Wirkung spricht auch, dass man auf der Basis der bisherigen Studien zum Einfluss von NO auf die myokardiale Energetik hier eher einen erhöhten spezifischen Energiebedarf auf Grund einer Beeinflussung der Kreatinkinase⁶⁷, der mitochondrialen Funktion oder der vorgeschalteten Substratutilisation⁴⁶ – alles Faktoren die tendenziell den Basalverbrauch verändern sollten – erwarten würde.

Im Weiteren wurde daher die mögliche Rolle des Sphingosin Signalweges hinsichtlich seiner Bedeutung für die Regulation des Sauerstoffverbrauchs untersucht.

4.4 Sphingolipid-vermittelte Effekte

TNF- α stimuliert die Bildung von Ceramid aus membranständigem Sphingomyelin und darüber hinaus dessen intrazelluläre Metabolisierung zu Sphingosin; die intrazellulären Konzentrationen von Ceramid und v.a. Sphingosin sind unter TNF- α Stimulation rasch erhöht⁴³. Beide Substanzen besitzen regulatorische Funktion in der Herzmuskelzelle⁴⁸. Sphingosin inhibiert ebenso wie TNF- α ⁵⁰ L-Kalziumströme und verkürzt die monophasische Aktionspotentialdauer an Kardiomyozyten⁴⁹. Oral et al.⁴³ konnten sowohl den schnellen negativ inotropen Effekt an Kardiomyozyten durch den Ceramidase Inhibitor NOE aufheben, als auch diesen mit exogenem Sphingosin nachahmen. Stamm²¹ et al. induzierten myokardiale TNF- α Expression durch Lipopolysaccharid Infusion und konnten die dadurch erzielte mechanische Funktionsbeeinträchtigung und Reduzierung des systolischen Kalziums an Rattenherzen mit NOE beeinflussen. Beide Arbeiten schlossen auf eine Sphingosin vermittelte Beeinflussung der Kalziumtransienten als Ursache für

den negativ inotropen Effekt. Gleichzeitig zeigte die Arbeit von Oral, dass das Phosphorylierungsprodukt von Sphingosin, Sphingosin-1-Phosphat für diese Effekte keine Rolle spielt.

NOE selbst wirkt dosisabhängig negativ inotrop, wobei unbekannt ist, ob dieser Effekt auf die Hemmung des Ceramid Abbaues zurückgeht, was zu einer gewissen Ceramid-Akkumulation führen dürfte⁴³, oder es sich hier um einen anderen unspezifischen toxischen Effekt der Substanz handelt. Hierbei ist zu erwähnen, dass Ceramid per se, ähnlich wie Sphingosin, bei der Inhibition von L-Typ Kalziumströmen eine Rolle zu spielen scheint⁸⁸. Die gewählte NOE Konzentration stellt einen Kompromiss zwischen unerwünschtem Einfluss auf die kontraktile Funktion und inhibitorischer Aktivität dar, nachdem unter einer 1 μM NOE Konzentration eine Reduktion der TNF- α abhängigen Sphingosinproduktion um 75 %, mit einem konsekutiven Anstieg der intrazellulären Ceramid Konzentration, beobachtet wurde⁴³. Es bleibt zu diskutieren, warum in der vorliegenden Arbeit eine Kraftreduktion auch unter der Konzentration von 5 μM NOE, also einer potentiell stärkeren Ceramidase Inhibition bestehen blieb. Im Zusammenhang mit dem aufgehobenen Effekt unter L-NAME spricht dies für eine Beteiligung von NO für die Vermittlung des raschen mechanischen Effekts. Dieser Befund stimmt mit den Ergebnissen von Finkel⁴¹ überein. Cain⁸⁴ dagegen konnte die negativ inotrope Wirkung sowohl mit NOE als auch mit L-NAME aufheben.

Versuche mit NOE sind grundsätzlich wegen der in seiner Bedeutung schwer einzuschätzende Ceramid-Akkumulation schwierig zu interpretieren. Hier fehlen bislang für die weitere differenzierte Aufklärung des signalaktiven Sphingolipid Abbauweges selektive Sphingomyelinase Inhibitoren. Somit ließe sich auch die unerwünschte Ceramidakkumulation⁴³ unter NOE vermeiden.

Ceramid interagiert mit den mitochondrialen Atmungskettenenzymen in Herzmuskelzellen. Die bislang veröffentlichten Erkenntnisse zur Wirkung von Ceramiden sind aber insofern interpretationsbedürftig, als die Wirkung von exogenen, kurzkettigen und damit zellpermeablen, Ceramiden möglicherweise nicht den längerkettigen biologisch relevanten entspricht⁸⁹. Weiterhin zeigte unlängst eine Arbeit, dass der negativ inotrope Effekt von zellpermeablem C₂-

Ceramid durch den Ceramidaseinhibitor NOE aufgehoben werden kann⁴⁹. Dies deutet darauf hin, dass die unter C₂-Ceramid beobachtete Wirkung eher auf daraus gebildetes Sphingosin zurückzuführen ist und somit Untersuchungen mit exogenem Ceramid von eingeschränkter Aussagekraft wären. Daher wurde auch hier auf Experimente mit exogenem Ceramid verzichtet. Der Einfluss auf die mitochondriale Funktion könnte aber den tendenziellen, nicht signifikanten Anstieg des Basalverbrauchs unter NOE und v.a den signifikanten Anstieg nach zusätzlicher TNF- α Stimulation erklären.

Nach Inkubation mit NOE besitzt TNF- α keinen signifikanten Effekt auf die Steigung der Regressionsgerade mehr. Dies gilt sowohl im Vergleich zu NOE als auch zur unabhängigen Kontrollgruppe. Allerdings besitzt NOE an sich einen signifikanten Einfluss auf die Steigung der Regressionsgerade, der durch TNF- α qualitativ gegenteilig beeinflusst wird.

Des Weiteren konnte erstmals gezeigt werden, dass, neben dem mechanischen Effekt, auch der auf die Steigung der Regressionsgeraden, also auf die Effizienz der chemomechanischen Konversion, durch exogenes Sphingosin qualitativ und quantitativ nachgeahmt wird. Die Konzentration an exogenem Sphingosin entspricht in etwa der in TNF- α stimulierten Zellen⁴³. Daher kann aus den vorliegenden Ergebnissen geschlossen werden, dass Sphingosin als Mediator für die Vermittlung des energetischen Effektes von TNF- α eine zentrale Rolle spielt. Bislang ist nur wenig über Angriffspunkte für Sphingosin bekannt. Sphingosin scheint v.a. inhibitorisch auf die Kalziumfreisetzung zu wirken, was den negativ inotropen Effekt erklären würde⁴⁸. Verringerte intrazelluläre Kalziumtransienten implizieren aber keine Veränderung der Ökonomie des Kontraktionsprozesses. Von Seiten des Kalziummetabolismus kann sich aber durchaus ein veränderter Energiebedarf ergeben, da die endsystolische Kalziumextrusion aus dem Zytoplasma hohe Mengen an ATP verbraucht. Als die beiden wesentlichen Effektoren müssen hier die sarkoplasmatische Kalzium-ATPase und der plasmamembranständige Na⁺/Ca²⁺-Austauscher genannt werden, die mit unterschiedlicher ATP/ Ca²⁺ Stöchiometrie arbeiten. In energetischer Hinsicht wurde deren Einfluss, insbesondere für insuffizientes Myokard, im wesentlichen nur theoretisch

erörtert^{90,91}. Veränderungen der myokardialen Ökonomie werden andererseits hauptsächlich mit Vorgängen auf myofilamentärer Ebene korreliert⁵⁸. Sphingolipid-vermittelte Veränderungen der kontraktilen Proteine sind allerdings bisher noch nicht bekannt. Die Untersuchung, ob Sphingolipide kontraktile Elemente regulieren bietet daher ein Feld für weitere Forschung.

4.5 Relevanz der Ergebnisse für in vivo Situationen

Inwieweit sind solche akuten TNF- α Effekte, wie sie in der vorliegenden Studie untersucht wurden in vivo relevant? Hierzu wurde in der Einleitung schon dargestellt, dass es im Myokard unter verschiedenen Bedingungen sehr rasch zur Expression bzw. Freisetzung des Zytokins kommt. Allen voran sind hier Ischämie-/ Reperfusionvorgänge zu nennen. Hierbei kommt es zur akuten Freisetzung von TNF- α im Myokard⁷. Ein Vorgang, der vermutlich nicht nur zur Entwicklung des Zellschadens im Ischämiegebiet beiträgt, sondern auch zu einer mechano-energetischen Funktionsbeeinträchtigung des vitalen Restmyokards führt. Entsprechend konnte jüngst im Infarktmodell der Ratte gezeigt werden, dass anti-TNF- α Therapie (einmalige Gabe von sTNF-RII) u.a. die mechanische Dysfunktion in der ersten Woche günstig beeinflusst⁹². Zeitgleich mit Fertigstellung der vorliegenden Arbeit zeigten Thielmann et al.⁹³, dass es nach experimenteller Mikroembolisation am Hundeherzen in vivo zu einer akuten mechanischen Funktionsstörung kommt. Dabei konnte im Myokardgewebe eine signifikante Erhöhung der TNF- α und Sphingosin Konzentrationen gemessen werden. Die Autoren schließen aus ihren Befunden, dass es dabei zu einer Signalkaskade kommt, innerhalb der NO TNF- α vorgeschaltet und Sphingosin dem Zytokin nachgeschaltet ist.

Beide Studien unterstreichen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass TNF- α ein nicht zu vernachlässigender Mediator der akuten mechanischen Dysfunktion im Myokard darstellt. Neben direkt negativ inotroper Wirkung wurde hier ein weiterer Mechanismus gezeigt, durch den es, insbesondere unter limitiertem Sauerstoffangebot, zu zusätzlicher mechanischer Funktionsstörung kommt. Damit erscheint die hier gezeigte Signalkaskade durchaus ein

relevantes Ziel für therapeutische Interventionen unter solchen pathologischen Situationen zu sein.

5. Zusammenfassung

Es konnte erstmals gezeigt werden, dass TNF- α in pathophysiologisch relevanten Konzentrationen neben seiner bekannten negativ inotropen Wirkung, einen deutlichen Effekt auf die myokardiale Energetik im Myokard der Ratte besitzt. Dieser wurde anhand des Sauerstoffverbrauchs an Muskelstreifenpräparaten quantifiziert. Der erhöhte Energieumsatz bei gleichzeitig reduzierter myokardialer Arbeit, d.h. der gesteigerte spezifische Sauerstoffverbrauch, basiert auf einer verschlechterten Ökonomie des Kontraktionsprozesses. Diese schnelle Wirkung auf die myokardiale Energetik ist durch einen Sphingolipid-Signaltransduktionsweg vermittelt. Dagegen spielt wohl für den mechanischen Effekt von TNF- α sowohl NO, als auch Sphingosin eine Rolle.

6. Literatur

1. Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, B W. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis. *Proc Natl Acad Sci.* 1975;72(9):3666-70.
2. Beutler B, Greenwald D, Hulmes JD, Chang M, Pan YC, Mathison J, Ulevitch R, A C. Identity of tumour necrosis factor and the macrophage-secreted factor cachectin. *Nature.* 1985;316(6028):552-4.
3. Bolger AP, SD A. Tumour necrosis factor in chronic heart failure: a peripheral view on pathogenesis, clinical manifestations and therapeutic implications. *Drugs.* 2000;60(6):1245-57.
4. DR M. Tumor necrosis factor in the heart. *Am J Physiol.* 1998;274 (3 Pt 2):R577-95.
5. Arbustini E, Grasso M, Diegoli M, Bramerio M, Foglieni AS, Albertario M, Martinelli L, Gavazzi A, Goggi C, Campana C ea. Expression of tumor necrosis factor in human acute cardiac rejection. An immunohistochemical and immunoblotting study. *Am J Pathol.* 1991;139(4):709-15.
6. Tracey KJ, Vlassara H, A C. Cachectin/tumour necrosis factor. *Lancet.* 1989;20:1122-6.
7. Irwin MW, Mak S, Mann DL, Qu R, Penninger JM, Yan A, Dawood F, Wen WH, Shou Z, P. L. Tissue expression and immunolocalization of tumor necrosis factor-alpha in postinfarction dysfunctional myocardium. *Circulation.* 1999;99(11):1492-8.
8. Torre-Amione G, Kapadia S, Lee J, Durand JB, Bies RD, Young JB, DL. M. Tumor necrosis factor-alpha and tumor necrosis factor receptors in the failing human heart. *Circulation.* 1996;93(4):704-11.
9. Levine B, Kalman J, Mayer L, Fillit HM, M P. Elevated circulating levels of tumor necrosis factor in severe chronic heart failure. *N Engl J Med.* 1990;26:236-41.
10. SC Smith, Allen P. Neutralization of endogenous tumor necrosis factor ameliorates the severity of myosin-induced myocarditis. *Circ Res.* 1992;70:856-863.
11. Kumar A, Haery C, JE P. Myocardial dysfunction in septic shock. *Crit Care Clin.* 2000;16(2):251-87.
12. Meldrum D, Cleveland J, Cain B, Meng X, Harken A. Increased myocardial tumor necrosis factor-alpha in a crystalloid-perfused model of cardiac ischemia-reperfusion injury. *Ann Thorac Surg.* 1998;65:439-43.

13. Sack M. Tumor necrosis factor-alpha in cardiovascular biology and the potential role for anti-tumor necrosis factor-alpha therapy in heart disease. *Pharmacol Ther.* 2002;94(1-2):123.
14. Matsumori A, Yamada T, Suzuki H, Matoba Y, S S. Increased circulating cytokines in patients with myocarditis and cardiomyopathy. *Br. Heart J.* 1994;72:561-566.
15. Ferrari R, Bachetti T, Confortini R, Opasich C, Febo O, Corti A, Cassani G, O V. Tumor necrosis factor soluble receptors in patients with various degrees of congestive heart failure. *Circulation.* 1995;92(6):1479-86.
16. Heba G, Krzeminski T, Porc M, Grzyb J, Ratajska A, A. D-K. The time course of tumor necrosis factor-alpha, inducible nitric oxide synthase and vascular endothelial growth factor expression in an experimental model of chronic myocardial infarction in rats. *J Vasc Res.* 2001;38(3):288-300.
17. Baumgarten G KP, Nozaki N, Sivasubramanian N, Mann DL, Vallejo JG. In vivo expression of proinflammatory mediators in the adult heart after endotoxin administration: the role of toll-like receptor-4. *J Infect Dis.* 2001;183(11):1617-24.
18. Baumgarten G, Knuefermann P, Kalra D, Gao F, Taffet GE, Michael L, Blackshear PJ, Carballo E, Sivasubramanian N, DL M. Load-dependent and -independent regulation of proinflammatory cytokine and cytokine receptor gene expression in the adult mammalian heart. *Circulation.* 2002;105(18):2192-7.
19. Meng X, Ao L, Meldrum DR, Cain BS, Shames BD, Selzman CH, Banerjee A, AH H. TNF-alpha and myocardial depression in endotoxemic rats: temporal discordance of an obligatory relationship. *Am J Physiol.* 1998;275(2):502-8.
20. Wright G, Singh IS, Hasday JD, Farrance IK, Hall G, Cross AS, TB R. Endotoxin stress-response in cardiomyocytes: NF-kappaB activation and tumor necrosis factor-alpha expression. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002;282(3):872-9.
21. Stamm C, Cowan DB, Friehs I, Noria S, del Nido PJ, Jr MF. Rapid endotoxin-induced alterations in myocardial calcium handling: obligatory role of cardiac TNF-alpha. *Anesthesiology.* 2001;95(6):1396-405.
22. Grandel U, Fink L, Blum A, Heep M, Buerke M, Kraemer HJ, Mayer K, Bohle RM, Seeger W, Grimminger F, U S. Endotoxin-induced myocardial tumor necrosis factor-alpha synthesis depresses contractility of isolated rat hearts: evidence for a role of sphingosine and

- cyclooxygenase-2-derived thromboxane production. *Circulation*. 2000;102(22):2758-64.
23. Shames BD, Barton HH, Reznikov LL, Cairns CB, Banerjee A, Harken AH, X M. Ischemia alone is sufficient to induce TNF-alpha mRNA and peptide in the myocardium. *Shock*. 2002;17(2):114-9.
 24. Squadrito F, Altavilla D, Zingarelli B, Loculano M, Calapai G, Campo GM, Miceli A, AP C. Tumor necrosis factor involvement in myocardial ischaemia-reperfusion injury. *Eur J Pharmacol*. 1993;237(2-3):223-30.
 25. Maekawa N, Wada H, Kanda T, Niwa T, Yamada Y, Saito K, Fujiwara H, Sekikawa K, M S. Improved myocardial ischemia/reperfusion injury in mice lacking tumor necrosis factor-alpha. *J Am Coll Cardiol*. 2002;39(7):1229-35.
 26. Frangogiannis NG, Youker KA, Rossen RD, Gwechenberger M, Lindsey MH, Mendoza LH, Michael LH, Ballantyne CM, Smith CW, ML E. Cytokines and the microcirculation in ischemia and reperfusion. *J Mol Cell Cardiol*. 1998;30(12):2567-76.
 27. Wei M, Kuukasjarvi P, Laurikka J, Pehkonen E, Kaukinen S, Laine S, M T. Inflammatory cytokines and soluble receptors after coronary artery bypass grafting. *Cytokine*. 2001;15(4):223-8.
 28. Wan S, AP Y. Cytokines in myocardial injury: impact on cardiac surgical approach. *Eur J Cardiothorac Surg*. 1999;16 Suppl:107-11.
 29. Zhang DX, Fryer RM, Hsu AK ZA, Gross GJ, Campbell WB, PL L. Production and metabolism of ceramide in normal and ischemic-reperfused myocardium of rats. *Basic Res Cardiol*. 2001;96(3):267-74.
 30. Kapadia SR, Oral H, Lee J, Nakano M, Taffet GE, DL M. Hemodynamic regulation of tumor necrosis factor-alpha gene and protein expression in adult feline myocardium. *Circ Res*. 1997;81(2):187-95.
 31. Palmieri EA, Benincasa G, Di Rella F, Casaburi C, Monti MG, De Simone G, Chiariotti L, Palombini L, Bruni CB, Sacca L, A C. Differential expression of TNF-alpha, IL-6, and IGF-1 by graded mechanical stress in normal rat myocardium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002;282(3):926-34.
 32. Kapadia S, Lee J, Torre-Amione G, Birdsall HH, Ma TS, DL M. Tumor necrosis factor-alpha gene and protein expression in adult feline myocardium after endotoxin administration. *J Clin Invest*. 1995;96(2):1042-52.
 33. Shioi T, Matsumori A, S S. Persistent expression of cytokine in the chronic stage of viral myocarditis in mice. *Circulation*. 1996;94(11):2930-7.

34. Habib FM, Springall DR, Davies GJ, Oakley CM, Yacoub MH, JM P. Tumour necrosis factor and inducible nitric oxide synthase in dilated cardiomyopathy. *Lancet*. 1996;347(9009):1151-5.
35. Krown KA, Page MT, Nguyen C, Zechner D, Gutierrez V, Comstock KL, Glembotski CC, Quintana PJ, RA S. Tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis in cardiac myocytes. Involvement of the sphingolipid signaling cascade in cardiac cell death. *J Clin Invest*. 1996;98(12):2854-65.
36. Bozkurt B, Kribbs SB, Clubb FJ Jr, Michael LH, Didenko VV, Hornsby PJ, Seta Y, Oral H, Spinale FG, DL M. Pathophysiologically relevant concentrations of tumor necrosis factor-alpha promote progressive left ventricular dysfunction and remodeling in rats. *Circulation*. 1998;97(14):1382-91.
37. Jacobs M, Staufenberger S, Gergs U, Meuter K, Brandstatter K, Hafner M, Ertl G, W S. Tumor necrosis factor-alpha at acute myocardial infarction in rats and effects on cardiac fibroblasts. *J Mol Cell Cardiol*. 1999;31(11):1949-59.
38. Lecour S, Smith RM, Woodward B, Opie LH, Rochette L, MN S. Identification of a novel role for sphingolipid signaling in TNF alpha and ischemic preconditioning mediated cardioprotection. *J Mol Cell Cardiol*. 2002;34(5):509-18.
39. Yamashita N, Hoshida S, Otsu K, Taniguchi N, Kuzuya T, M H. The involvement of cytokines in the second window of ischaemic preconditioning. *Br J Pharmacol*. 2000;131(3):415-22.
40. Gulick T, Chung MK, Pieper SJ, Lange LG, GF S. Interleukin 1 and tumor necrosis factor inhibit cardiac myocyte beta-adrenergic responsiveness. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989;86(17):6753-7.
41. Finkel MS, Oddis CV, Jacob TD, Watkins SC, Hattler BG, RL S. Negative inotropic effects of cytokines on the heart mediated by nitric oxide. *Science*. 1992;257(5068):387-9.
42. Goldhaber JI, Kim KH, Natterson PD, Lawrence T, Yang P, JN. W. Effects of TNF-alpha on [Ca²⁺]_i and contractility in isolated adult rabbit ventricular myocytes. *Am J Physiol*. 1996;271(4 Pt 2):1449-55.
43. Oral H, Dorn GW 2nd, DL M. Sphingosine mediates the immediate negative inotropic effects of tumor necrosis factor-alpha in the adult mammalian cardiac myocyte. *J Biol Chem*. 1997;272(8):4836-42.
44. Sugishita K, Kinugawa K, Shimizu T, Harada K, Matsui H, Takahashi T, Serizawa T, O K. Cellular basis for the acute inhibitory effects of IL-6 and TNF-

- alpha on excitation-contraction coupling. *J Mol Cell Cardiol.* 1999;31(8):1457-67.
45. Miyano Hiroshi M, ShishidoToshiaki M, Kawada TM, PhD,, MiyashitaHiroshi M, Sato Takayuki M, Sugimachi Masaru M, Sunagawa Kenji MD P. Acute effect of tumor necrosis factor-alpha is minimal on mechanics but significant on energetics in blood-perfused canine left ventricles. *Critical Care Medicine.* 1999;27:168-176.
 46. Kojda G, K K. Regulation of basal myocardial function by NO. *Cardiovasc Res.* 1999;41(3):514-23.
 47. Wiegmann K, Schutze S, Kampen E, Himmler A, Machleidt T, M K. Human 55-kDa receptor for tumor necrosis factor coupled to signal transduction cascades. *J Biol Chem.* 1992;267(25):17997-8001.
 48. Levade T, Auge N, Veldman RJ, Cuvillier O, Negre-Salvayre A, R S. Sphingolipid mediators in cardiovascular cell biology and pathology. *Circ Res.* 2001;89(11):957-68.
 49. Friedrichs GS, Swillo RE, Jow B, Bridal T, Numann R, Warner LM, Killar LM, K S. Sphingosine modulates myocyte electrophysiology, induces negative inotropy, and decreases survival after myocardial ischemia. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2002;39(1):18-28.
 50. Krown KA, Yasui K, Brooker MJ, Dubin AE, Nguyen C, Harris GL, McDonough PM, Glembotski CC, Palade PT, RA S. TNF alpha receptor expression in rat cardiac myocytes: TNF alpha inhibition of L-type Ca²⁺ current and Ca²⁺ transients. *FEBS Lett.* 1995;376(1-2):24-30.
 51. Rohde E. Über den Einfluß der mechanischen Bedingungen auf die Tätigkeit und den Sauerstoffverbrauch des Warmblüterherzens. *Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.* 1912;68:401-403.
 52. Challoner. Respiration in myocardium. *Nature.* 1968;217.
 53. Bedford GK, MA C. High-performance liquid chromatographic method for the simultaneous determination of myocardial creatine phosphate and adenosine nucleotides. *J Chromatogr.* 1984;305(1):183-7.
 54. Zhang J, Ugurbil K, From AH, RJ. B. Use of magnetic resonance spectroscopy for in vivo evaluation of high-energy phosphate metabolism in normal and abnormal myocardium. *J Cardiovasc Magn Reson.* 2000;2(1):23-32.

55. Loken MK, Hawkins RA, Gupta NC, MP F. Positron emission tomography (PET): a unique approach for the imaging of in vivo metabolism. *Nebr Med J.* 1989;74(11):333-9.
56. Mulieri LA, Luhr G, Trefry J, NR A. Metal-film thermopiles for use with rabbit right ventricular papillary muscles. *Am J Physiol.* 1977;233(5):146-56.
57. Barr R, Lopaschuk G. Methodology for measuring in vitro/ex vivo cardiac energy metabolism. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 2000;43:141-52.
58. Suga H. Ventricular energetics. *Physiol. Rev.* 1990;70:247-277.
59. Schipke J. Cardiac efficiency. *Basic Res cardiol.* 1994;89:207-240.
60. Landesberg A, Sideman S. Regulation of energy consumption in cardiac muscle: analysis of isometric contractions. *Am J Physiol.* 1999;276:H998-H1011.
61. Fenn WO. The gas exchange of isolated muscles during stimulation and recovery. *Am. J. Physiol.* 1927;83:309-322.
62. Clark IC Jr, Wolf R, Granger D, Z T. Continus recording of blood oxygen tensions by polarography. *J. Appl. Physiol.* 1953;6:189-193.
63. Lee K. A new technique for the simultaneous recording of oxygen consumption and contraction of muscle, The effect of Ouabain on cat papillary muscle. *J. Pharmacol. Exptl. Therap.* 1953;109:304-312.
64. Lambert CR, P P. Indices of myocardial oxygen consumption for isotonic contractions. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 1979;5:331-339.
65. Meyer M, Keweloh B, Guth K, Holmes JW, Pieske B, Lehnart SE, Just H, G 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 Cardiol.* 1998;30(8):1459-70.
66. Kirstein M, Rivet-Bastide M, Hatem S, Benardeau A, Mercadier JJ, R F. Nitric oxide regulates the calcium current in isolated human atrial myocytes. *J Clin Invest.* 1995;95(2):794-802.
67. Kelm M, Schafer S, Dahmann R, Dolu B, Perings S, Decking UK, Schrader J, Strauer, Bedford GK, MA C. Nitric oxide induced contractile dysfunction is related to a reduction in myocardial energy generation. *Cardiovasc Res.* 1997;36(2):185-94.
68. Keweloh B. Die Diffusionsmethode Ein neues Verfahren zur Messung des Sauerstoffverbrauches an isolierten Myokardstreifen. *Inaugural Dissertation zur*

Erlangung des Medizinischen Doktorgrades an der Medizinischen Fakultät der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg i. Br. 1996.

69. Alderton WK, Cooper CE, RG K. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J.* 2001;593-615.
70. Coroneos E, Martinez M, McKenna S, M K. Differential regulation of sphingomyelinase and ceramidase activities by growth factors and cytokines. Implications for cellular proliferation and differentiation. *J Biol Chem.* 1995;270(40):23305-9.
71. Sabbadini R, McNutt W, al JGe. Sphingosine is endogenous to cardiac and skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun.* 1993;193(2):752-8.
72. Janssen PM, Zeitz O, Keweloh B, Siegel U, Maier LS, Barckhausen P, Pieske B, Prestle J, Lehnart SE, G H. Influence of cyclosporine A on contractile function, calcium handling, and energetics in isolated human and rabbit myocardium. *Cardiovasc Res.* 2000;47(1):99-107.
73. Ferdinandy P, Panas D, R. S. Peroxynitrite contributes to spontaneous loss of cardiac efficiency in isolated working rat hearts. *Am.J.Physiol. (Heart Circ. Physiol.)*. 1999;276:H1861-H1867.
74. Sunderdiek U, Schmitz-Spanke S, Korbmacher B, Gams E, Schipke J. Left ventricular dysfunction and disturbed O₂-utilization in stunned myocardium: influence of ischemic preconditioning. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2001;20:770-6.
75. Trines S, Slager C, Onderwater T, Lamers J, Verdouw P, Krams R. Oxygen wastage of stunned myocardium in vivo is due to an increased oxygen cost of contractility and a decreased myofibrillar efficiency. *Cardiovasc Res.* 2001;51:122-30.
76. Schipke J, Sunderdiek U, Korbmacher B, Schwanke U, Arnold G. Utilization of oxygen by the contractile apparatus is disturbed during reperfusion of post-ischaemic myocardium. *Eur Heart J.* 1995;16:1476-81.
77. Duncker D, Schulz R, Ferrari R, Garcia-Dorado D, Guarnieri C, Heusch G, Verdouw P. "Myocardial stunning" remaining questions. *Cardiovasc Res.* 1998;38:549-58.
78. Lee S, Araki J, Imaoka T, Maesako M, Iribe G, Miyaji K, Mohri S, Shimizu J, Harada M, Ohe T, Hirakawa M, Suga H. Energy-wasteful total Ca²⁺ handling underlies increased O₂ cost of contractility in canine stunned heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000;278:H1464-72.

79. Yamada O, Kamiya T, Suga H. Right ventricular mechanical and energetic properties. *Jpn Circ J*. 1989;53:1260-8.
80. Dibbs Z, Thornby J, White BG, DL M. 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(7):1935-42.
81. Zell R, Geck P, Werdan K, Boekstegers P. TNF-alpha and IL-1 alpha inhibit both pyruvate dehydrogenase activity and mitochondrial function in cardiomyocytes: evidence for primary impairment of mitochondrial function. *Mol Cell Biochem*. 1997;177:61-7.
82. Hasenfuss G, Mulieri L, Blanchard E, Holubarsch C, Leavitt B, Ittleman F, Alpert N. Energetics of isometric force development in control and volume-overload human myocardium. Comparison with animal species. *Circ Res*. 1991;68:836-46.
83. Kameyama T, Chen Z, Bell S, Van BP, Maughan D, Le WM. Mechanoenergetic alterations during the transition from cardiac hypertrophy to failure in Dahl salt-sensitive rats. *Circulation*. 1998;98:2919-29.
84. Cain BS, Meldrum DR, Dinarello CA, Meng X, Joo KS, Banerjee A, AH H. Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta synergistically depress human myocardial function. *Crit. Care. Med*. 1999;27(7):1309-18.
85. Trochu J, Bouhour J, Kaley G, Hintze T. Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of cardiac oxygen metabolism: implications in health and disease. *Circ Res*. 2000;87:1108-17.
86. Recchia F, McConnell P, Loke K, Xu X, Ochoa M, Hintze T. Nitric oxide controls cardiac substrate utilization in the conscious dog. *Cardiovasc Res*. 1999;44:325-32.
87. Xie Y-W, Shen W, Zhao G, Xu X, Wolin MS, Hintze TH. Role of Endothelium-Derived Nitric Oxide in the Modulation of Canine Myocardial Mitochondrial Respiration In Vitro: Implications for the Development of Heart Failure. *Circ Res*. 1996;79:381-387.
88. Schreur KD, S L. Involvement of ceramide in inhibitory effect of IL-1 beta on L-type Ca²⁺ current in adult rat ventricular myocytes. *Am J Physiol*. 1997;272(6 Pt 2):2591-8.
89. Di Paola M, Cocco T, Lorusso M. Ceramide interaction with the respiratory chain of heart mitochondria. *Biochemistry*. 2000;39:6660-8.

90. Hasenfuss G, Pieske B. Calcium cycling in congestive heart failure. *J Mol Cell Cardiol.* 2002;34:951-69.
91. Shimizu J, Araki J, Mizuno J, Lee S, Syuu Y, Hosogi S, Mohri S, Mikane T, Takaki M, Taylor T, Suga H. A new integrative method to quantify total Ca²⁺ handling and futile Ca²⁺ cycling in failing hearts. *Am J Physiol.* 1998;275:H2325-33.
92. Berthonneche C, Sulpice T, Boucher T, Gouraud L, de Leiris J, O'Connor SE, Herbert J-M, P J. New insights into the pathological role of TNF- α in early cardiac dysfunction and subsequent heart failure after infarction in rats. *Am J Heart Circ Physiol.* 2004;287:H340-H350.
93. Thielmann M, Dörge H, Martin C, Belosjorow S, Schwanke U, van de Sand A, Konietzka I BA, Krüger A, Schulz R, G H. Myocardial dysfunction With Coronary Microembolization. *Circ Res.* 2002;90:807-813.

Danksagung

Im Rahmen dieser Arbeit bin ich zu besonderem Dank verpflichtet

Herrn Prof. Dr. G. Ertl als Doktorvater für die Überlassung des Themas und die Bereitstellung aller Ressourcen in der Medizinischen Universitätsklinik, sowie die Unterstützung bei der Publikation von Teilergebnissen der vorliegenden Dissertation im American Journal of Physiology und der Präsentation auf mehreren wissenschaftlichen Tagungen

Herrn Priv. Doz. Dr. Andreas Bonz als verantwortlichem Betreuer und Organisator der Arbeit, der jederzeit für alle Fragen zur Verfügung stand und mich immer in allen Dingen unterstützte. Insbesondere möchte ich sein freundschaftliches Verhältnis zu allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe und sein Engagement auch über die Belange der Promotionsarbeit hinaus hervorheben.

Herrn Prof. Dr. G. Hasenfuss für die Erlaubnis in den Forschungslabors der Abteilung für Kardiologie/ Angiologie der Universität Göttingen zu hospitieren

Herrn Dr. B. Keweloh und E. Domeier (Abteilung für Kardiologie/ Angiologie der Universität Göttingen) für die Betreuung beim Erlernen der Methode

Frau Barbara Weckler und Helga Wagner für ihre Hilfe bei den Langendorff Versuchen bzw. bei der HPLC

Frau Andrea Leupold, Verena Popp, und Katharina Blaß für die Unterstützung und gute Atmosphäre im Labor

Dem Freistaat Bayern, für die Gewährung eines Studienstipendiums nach dem Bayerischen Begabtenförderungsgesetz

Meinen Eltern, die mir das Studium ermöglicht haben

Ulrich D.W. Hofmann

Zweierweg 46
97074 Würzburg
Tel. 0931/7845955

Geburtsdatum/-Ort	29.10.1977 Kulmbach
Familienstand	ledig
1984 bis 1988	Grundschule Kulmbach
1988 bis 1997	Markgraf-Georg-Friedrich Gymnasium Kulmbach (Abschluß mit Abitur)
1997-1998	Zivildienst Klinikum Kulmbach
Oktober 1998	Studium Humanmedizin an der Universität Würzburg
August 2000	Ärztliche Vorprüfung
August 2001	1. Staatsexamen
August 2003	2. Staatsexamen
Mai 2005	3. Staatsexamen, Approbation als Arzt
Seit Juli 2005	Wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Medizinischen Klinik I, Kardiologie, Universitätsklinikum Würzburg

Würzburg, den 01.02.2006



