

Aus dem Julius-Bernstein-Institut für Physiologie
der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
(Direktor: Professor Dr. med. Michael Gekle)

**Veränderungen der Natrium- und Kalziumkonzentrationen in gedehnten
Herzmuskeltrabekeln und Vergleich mit gedehnten isolierten Kardiomyozyten –
Röntgen-mikroanalytische Untersuchungen**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt

der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Joachim Wilhelm
geboren am 24.06.1978 in Leverkusen

Betreuerin: Professor Dr. rer. nat. Maria-Fiora Gallitelli

Gutachter: Professor Dr. rer. nat. Maria-Fiora Gallitelli, Halle (Saale)
Professor Dr. med. Michael Buerke, Halle (Saale)
Professor Dr. med. Gabriele Pfitzer, Köln

Eröffnung des Promotionsverfahrens: 06.04.2010

Datum der öffentlichen Verteidigung: 16.09.2010

Meiner Familie

Referat und Bibliographische Angaben

Dilatation des Herzens ist sowohl die Ursache kardialer Dysfunktion im Falle akuter Dilatation, z.B. nach akutem Herzinfarkt, als auch Folge langjähriger, chronischer Prozesse, z.B. im Rahmen einer Koronaren Herzerkrankung mit sich entwickelnder Herzinsuffizienz.

Die Untersuchung von Veränderungen der Herzmuskelzelle, die durch Dehnung ausgelöst werden, ist schon lange Gegenstand wissenschaftlicher Untersuchungen. Über das Verhalten der intrazellulären Natrium- und Kalziumkonzentration liegen in der Literatur widersprüchliche Angaben vor. Z.T. wird ein Anstieg der Konzentrationen berichtet, in anderen Arbeiten blieb dieser aus. In den letzten Jahren ergaben sich Hinweise darauf, dass diese Diskrepanzen möglicherweise durch unterschiedliche Arten der Dehnung erklärbar sind, End-zu-End-Dehnung versus lokale axiale Dehnung an der Plasmamembran. Außerdem erfolgten die Untersuchungen z.T. mit unterschiedlichen Messverfahren und an verschiedenen Spezies.

Ziel dieser Arbeit war es, dehnungsinduzierte Veränderungen der Natrium- und Kalziumkonzentration in Zellkompartimenten End zu End gedehnter Herzmuskeltrabekel der Ratte mittels Elektronenstrahl-Röntgen-Mikroanalyse zu untersuchen (Electron Probe Micro Analysis, EPMA). Diese misst die totalen Konzentrationen der Elemente, d.h. die Summe aus freien und gebundenen Anteilen. Die Ergebnisse wurden verglichen mit vorliegenden Daten von isolierten Kardiomyozyten der Ratte, die lokal axial, also mit einer anderen Methodik, gedehnt und ebenfalls mit EPMA analysiert wurden. Somit sollte der direkte Einfluss der Art der Dehnung auf die Elementkonzentrationen untersucht werden.

Es zeigte sich, dass beide Arten der Dehnung einen vergleichbaren Anstieg der intrazellulären Natriumkonzentration bewirken, also vermutlich die gleichen Transporter aktivieren. Ein Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration war nach lokaler axialer Dehnung in isolierten Kardiomyozyten, jedoch nicht in End zu End gedehnten Trabekeln nachweisbar. Die Zunahme der Kalziumkonzentration ist also spezifisch für lokale axiale Dehnung von isolierten Kardiomyozyten. Er wird auf zusätzlich wirkende Scherkräfte zurückgeführt.

Betrachtet man die Situationen in situ, am schlagenden Herz, die dem jeweiligen Dehnungsprotokoll am nächsten kommen, lässt sich schlussfolgern, dass die Methodik der End-zu-End-Dehnung vor allem zur Untersuchung von Vorgängen mit sanfter Dehnung und sich chronisch entwickelnden Veränderungen geeignet ist. Lokale axiale Dehnung erscheint sinnvoll zur Untersuchung von Situationen mit akuter, starker, inhomogener Dehnung.

Wilhelm, Joachim: Veränderungen der Natrium- und Kalziumkonzentrationen in gedehnten Herzmuskeltrabekeln und Vergleich mit gedehnten isolierten Kardiomyozyten – Röntgenmikroanalytische Untersuchungen
Halle (Saale), Univ., Med. Fak., Diss., 58 Seiten, 2010

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	Kardiale Dilatation – Ursache und Folge myokardialer Dysfunktion	1
1.2	Effekte von Dehnung am Herzmuskel	1
1.2.1	Physiologie und funktionelle Bedeutung der Dehnung von Myokard	1
1.2.2	Folgen pathologischer Dehnung	4
1.3	Rolle von Natrium und Kalzium bei der Signaltransduktion dehnungsinduzierter Vorgänge	5
1.3.1	Rolle von Natrium und Kalzium bei dehnungsinduzierten elektrophysiologischen Veränderungen	5
1.3.2	Rolle von Natrium und Kalzium bei dehnungsinduzierten Veränderungen der Kontraktionskraft	6
1.3.3	Rolle von Natrium und Kalzium als Transmitter beim „Cardiac Remodelling“ und bei Hypertrophie	9
1.4	Versuchsmodelle zur Untersuchung dehnungsinduzierter Veränderungen	9
1.4.1	Dehnung von isolierten Kardiomyozyten	9
1.4.2	Dehnung von Herzmuskeltrabekeln	10
1.5	Methoden zur Messung der Konzentrationen einzelner Elemente	10
2	ZIELSTELLUNG	11
3	MATERIAL UND METHODIK	12
3.1	Versuchstiere	12
3.2	Lösungen	12
3.3	Aufbau und Geräte der Versuchsanlage	12
3.4	Versuchsdurchführung und Versuchsprotokolle	15
3.4.1	Entnahme der Herzen und Präparation der Herzmuskeltrabekel	15
3.4.2	Mechanische Versuche an Herzmuskeltrabekeln	16
3.4.3	Frieren der Proben für die Kryoultramikrotomie	19
3.5	Kryoultramikrotomie und Gefriertrocknung	21
3.6	Elektronenstrahl-Röntgen-Mikroanalyse am Elektronenmikroskop	22
3.6.1	Prinzip der Elektronenstrahl-Röntgen-Mikroanalyse	22
3.6.2	Das Elektronenmikroskop	24
3.6.3	Die analysierten Kompartimente	25
3.6.4	Quantitative Analyse	25
3.6.5	Konzentrationseinheiten, Genauigkeit der Kalziummessung und Auflösung	25
3.7	Datenerfassung und statistische Auswertung	26
4	ERGEBNISSE	28
4.1	Abmessungen der Muskeln	28

4.2	Muskelmechanische Experimente	28
4.3	Morphologie und Strukturhaltung der Kryoschnitte	30
4.4	Ergebnisse der Röntgen-Mikroanalyse	33
4.4.1	Dehnungsinduzierte Veränderungen der $[Na_{ges}]_{i-dia}$	33
4.4.2	Dehnungsinduzierte Veränderungen der $[Ca_{ges}]_{i-dia}$	36
5	DISKUSSION	40
5.1	Die Methodik	40
5.1.1	Das Versuchsmodell der Herzmuskeltrabekel	40
5.1.2	Messung der Elementkonzentrationen mittels Elektronenstrahl-Röntgen-Mikroanalyse	41
5.2	Dehnungsinduzierte Veränderungen der $[Na_{ges}]_{i-dia}$ und $[Ca_{ges}]_{i-dia}$ in Kompartimenten von Herzmuskeltrabekeln und isolierten Kardiomyozyten	41
5.2.1	Dehnung bewirkt einen Anstieg der $[Na_{ges}]_{i-dia}$ in Herzmuskeltrabekeln und isolierten Kardiomyozyten	41
5.2.2	Lokale axiale Dehnung von isolierten Kardiomyozyten, nicht jedoch End-zu-End-Dehnung von Herzmuskeltrabekeln bewirkt einen signifikanten Anstieg der $[Ca_{ges}]_{i-dia}$	43
5.2.3	Unterschiede zwischen End-zu-End-Dehnung und lokaler axialer Dehnung und mögliche Mechanismen des Kalziumanstiegs	44
5.2.4	Mögliche Folgen des Anstiegs der $[Na_{ges}]_{i-dia}$ und $[Ca_{ges}]_{i-dia}$ für die Zellfunktion	48
6	SCHLUSSFOLGERUNGEN	49
7	LITERATURVERZEICHNIS	51
8	THESEN	58

VERZEICHNIS DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN UND SYMBOLE

[X]	Konzentration des Elements X, Buchstabenbezeichnungen gemäß Periodensystem der Elemente
[X ⁺]	Konzentration des Ions des Elements X
[X _{ges.}]	Gesamtkonzentration des Elements X, d.h. die Summe aus freien und gebundenen Teilen
[X] _i	Intrazelluläre Konzentration des Elements X
[X] _{i-dia}	Intrazelluläre diastolische Konzentration des Elements X
2,3-BDM	2,3-Butadion-Monoxim
Abb.	Abbildung
EDV	Enddiastolisches Volumen
EM	Elektronenmikroskop
eNOS	Endotheliale NO-Synthetase
EPMA	Electron Probe Micro Analysis, Elektronenstrahl-Röntgen-Mikroanalyse
ESV	Endsystolisches Volumen
F	Kraft
FFR	Force-frequency relationship, Kraft-Frequenz-Beziehung
FM	Sehr feiner Mikromanipulator
H	Starrer Haken
HKo	Horizontaler Kolben
IP3R	Inositoltrisphosphatrezeptoren
K	Kraftaufnehmer
keV	Kiloelektronenvolt
KHL	Krebs-Henseleit-Lösung
L _{max}	Muskellänge der maximalen isometrischen Kraftentwicklung
LN ₂	Flüssiger Stickstoff
L _{slack}	Ausgangslänge der Muskeln in ungedehntem Zustand
M	Dreidimensionaler Mikromanipulator
mM	mmol/l
mmol·(kg dw) ⁻¹	mmol per kg dry weight, mmol pro kg Trockengewicht
NCX	Na ⁺ -Ca ²⁺ -Exchanger, Natrium-Kalzium-Austauscher
NHE	Na ⁺ -H ⁺ -Exchanger, Natrium-Protonen-Austauscher
NO	Stickstoffmonoxid
P	Druck
PK	Perfusionskammer
PRP	Post-rest potentiation, Post-Pause-Potenzierung
RFR	Rapid force response, initiale schnelle Kraftzunahme nach Dehnung

RyRC	Ryanodin-receptor-Ca ²⁺ -release-channel, Ryanodin-Rezeptor-Kanal
S	Mikrometerschraube
SACs	Stretch activated channels, Dehnungs aktivierte Kanäle
SE	Standard Error, Standardfehler
SFR	Slow force response, zweite langsame Phase der Kraftzunahme nach Dehnung
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
SV	Schlagvolumen
V	Volumen
VKo	Vertikaler Kolben
WA	Wärmeaustauscher
Ve	Magnetventil

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1:	Druck-Volumen-Diagramm des Herzens bei Vorlasterhöhung	2
Abb. 2:	Druck-Volumen-Diagramm des Herzens bei Nachlasterhöhung	3
Abb. 3:	Versuchsaufbau für die muskelmechanischen Experimente	13
Abb. 4:	Schematische Darstellung eines zwischen Kraftaufnehmer und starrem Haken eingehängten Muskels	16
Abb. 5:	Originalaufzeichnung eines Versuchs der Stretch-Gruppe	19
Abb. 6:	Originalaufzeichnung des Moments des Schockgefrierens eines Herzmuskeltrabekels der Stretch-Gruppe	21
Abb. 7:	Schematische Darstellung des physikalischen Prinzips der EPMA	23
Abb. 8:	Elektronenmikroskopisches Spektrum eines Mitochondriums eines Kardiomyozyts der Ratte	24
Abb. 9:	Kraftentwicklung bei 85% von L_{max} und bei L_{max} in der Kontroll- und in der Stretch-Gruppe	29
Abb. 10:	Ergebnisse von FFR und PRP für die Kontroll- und für die Stretch-Gruppe	30
Abb. 11:	EM-Bild von drei längsgeschnittenen Zellen eines bei 85% von L_{max} gefrorenen Trabekels	31
Abb. 12:	Längsschnitte eines bei 85% von L_{max} gefrorenen Muskels der Kontroll-Gruppe und eines bei L_{max} gefrorenen Muskels der Stretch-Gruppe	32
Abb. 13:	Häufigkeitsverteilung der $[Na_{ges}]_{i-dia}$ aller Messungen in Trabekeln der Kontroll- und der Stretch-Gruppe	33
Abb. 14:	$[Na_{ges}]_{i-dia}$ in Trabekeln und isolierten Myozyten der Kontroll- und der Stretch-Gruppe in zentralem Zytosol, Kern und Kernhülle	35
Abb. 15:	Häufigkeitsverteilung der $[Ca_{ges}]_{i-dia}$ aller Messungen in Trabekeln der Kontroll- und der Stretch-Gruppe	36
Abb. 16:	$[Ca_{ges}]_{i-dia}$ in Trabekeln und isolierten Myozyten der Kontroll- und der Stretch-Gruppe in zentralem Zytosol, Kern und Kernhülle	38

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Konzentrationen der Inhaltsstoffe der Versuchslösung in mmol/l	12
Tabelle 2: Umrechnungsfaktoren von $\text{mmol} \cdot (\text{kg dw})^{-1}$ in mM	26
Tabelle 3: Abmessungen der Muskeln	28
Tabelle 4: Totale diastolische Elementkonzentrationen in Trabekeln der Kontroll- und der Stretch-Gruppe im zentralen Zytosol in $\text{mmol} \cdot (\text{kg dw})^{-1}$ und in mM	33
Tabelle 5: $[\text{Na}_{\text{ges}}]_{\text{i-dia}}$ in den einzelnen Kompartimenten der Trabekel der Kontroll- und der Stretch-Gruppe in $\text{mmol} \cdot (\text{kg dw})^{-1}$ und in mM	34
Tabelle 6: $[\text{Ca}_{\text{ges}}]_{\text{i-dia}}$ in den einzelnen Kompartimenten der Trabekel der Kontroll- und der Stretch-Gruppe in $\text{mmol} \cdot (\text{kg dw})^{-1}$ und in mM	37

1 EINLEITUNG

1.1 Kardiale Dilatation – Ursache und Folge myokardialer Dysfunktion

Die Dilatation des Herzens kann sowohl in der akuten Situation die Ursache sein für kardiale Dysfunktion als auch eine Folge von langjährigen Belastungen des Herzens.

So kann z.B. die akute Rechtsherzbelastung mit Dilatation des rechten Ventrikels im Falle einer akuten Lungenarterienembolie zum Rechtsherzversagen mit schwerwiegenden Rhythmusstörungen und kardiogenem Schock führen.

Chronische Belastungen wie z.B. langjähriger arterieller Hypertonus oder kardiale Ischämie im Rahmen einer Koronaren Herzkrankheit wiederum führen im Laufe der Zeit zu einer Dilatation des Herzens. Diese führt zu abnehmender Pumpleistung im Sinne einer Herzinsuffizienz und zu erhöhtem Auftreten von z.T. malignen Herzrhythmusstörungen. Beispielhaft für die Bedeutung dieser pathologischen Vorgänge sei hier die Herzinsuffizienz angeführt. Mit einer Prävalenz von 2-3% in der Gesamtbevölkerung und bis zu 20% in der Gruppe der 70 bis 80 jährigen [1] stellt die Herzinsuffizienz eine der wichtigsten Erkrankungen der heutigen Zeit dar. Mit 49970 Todesfällen befindet sich die Herzinsuffizienz auf Platz drei der Todesursachen in Deutschland 2007 [2].

Als Korrelat der Dilatation des gesamten Herzens ist auf zellulärer Ebene die Dehnung bzw. pathologische Überdehnung der Kardiomyozyten zu sehen. Zur Untersuchung der dehnungsinduzierten akuten und chronischen Vorgänge, die letztlich zur Dysfunktion führen, sowohl akut als auch chronisch, müssen adäquate Modelle angewandt werden.

1.2 Effekte von Dehnung am Herzmuskel

Es ist seit langem bekannt, dass der Dehnungszustand des Myokards entscheidend für dessen Funktion ist.

Am physiologisch schlagenden Herzen spielt die Dehnung vor allem bei der Regulation der Kontraktionskraft eine entscheidende Rolle. Demgegenüber ist pathologische Überdehnung der initiale Stimulus vieler verschiedener Veränderungen, die letztlich zur Störung der Funktion der Kardiomyozyten führen.

1.2.1 Physiologie und funktionelle Bedeutung der Dehnung von Myokard

Bereits seit Mitte des 20. Jahrhunderts ist bekannt, dass die Kraftentwicklung vom Dehnungszustand des Muskels und damit von der Sarkomerlänge abhängt, die optimale Sarkomerlänge für die maximale Kraftentwicklung beträgt dabei 2,0-2,2 μm [3].

Am physiologisch schlagenden Herzen liegt die wohl größte Bedeutung dieses Effekts in der Anpassung der Kontraktionskraft an unterschiedliche Vor- und Nachlast (z.B. erhöhte

Auch im Falle der Nachlasterhöhung erfolgt letztlich die Anpassung durch die Erhöhung des Schlagvolumens nach erhöhter enddiastolischer Füllung (Abb. 2).

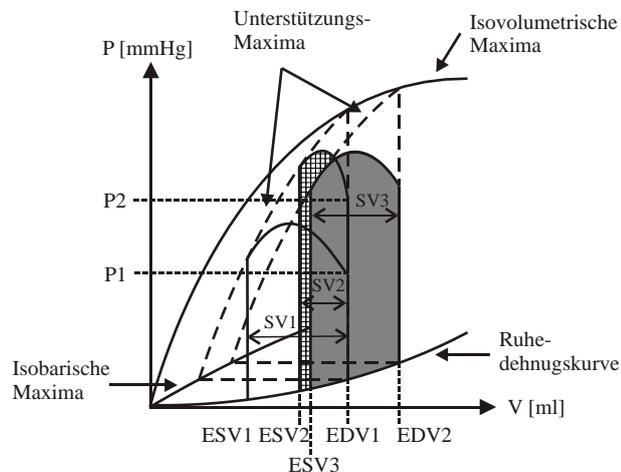


Abb. 2 – Druck-Volumen-Diagramm des Herzens bei Nachlasterhöhung. V: Volumen, P: Druck, EDV: enddiastolisches Volumen, ESV: endsystolisches Volumen, SV: Schlagvolumen.

Die erhöhte Nachlast, also der erhöhte zu überwindende Druck ($P_2 > P_1$), führt zu einer Abnahme des Schlagvolumens ($SV_2 < SV_1$) und zu einem erhöhten endsystolischen Restvolumen (ESV_2), gefolgt von einem erhöhtem enddiastolischen Volumen (EDV_2). Dies bedeutet eine stärkere Vordehnung, also eine größere Kraftentwicklung, was wiederum zu einer Erhöhung des Schlagvolumens (SV_3) und zu einer Anpassung der Situation führt.

Betrachtet man den zeitlichen Verlauf der erhöhten Kraftentwicklung der Kardiomyozyten genauer, so lassen sich zwei verschiedene Phasen unterscheiden. Zunächst kommt es als unmittelbare Reaktion zu einer Zunahme der entwickelten Kraft innerhalb von einer Kontraktion, in der Literatur oft als „rapid force response“ (RFR) bezeichnet. Diese wird im Allgemeinen als zugrunde liegender Mechanismus des Frank-Starling-Mechanismus angesehen. Während der nächsten Minuten wird diese dann gefolgt von einem weiteren Kraftzuwachs, bis schließlich ein Plateau erreicht wird. Diese Reaktion wird als „slow force response“ (SFR) bezeichnet. Beide Phasen wurden in verschiedenen Versuchsmodellen und für verschiedene Spezies beschrieben, für isolierte Papillarmuskeln [6], vollständige Herzpräparate [7] und isolierte Kardiomyozyten [8]. Auch humane Kardiomyozyten zeigen dieses Verhalten [9]. Es handelt sich hierbei somit um ein universelles Verhalten, dessen Mechanismen in der Herzmuskelzelle selbst stattfinden.

Auch wenn noch offene Fragen bestehen, so wurde bereits 1982 beschrieben, dass der wesentliche Mechanismus der RFR auf einer Zunahme der Kalziumsensitivität der Myofilamente zurückzuführen ist [10], später wurde vor allem die Zunahme der Sensitivität von Troponin C gegenüber Kalzium betont [11].

Unter der Dehnung kommt es zu einer Abnahme der Überlappung von Aktin und Myosin [3] und zu einer Abnahme des Abstandes der einzelnen Filamente zueinander in dem Netzwerk aus Aktin und Myosin [12]. Eine wichtige Rolle scheint dabei das Protein Titin zu spielen, das zumindest in Teilen die Abstände in dem Aktin-Myosin-Netzwerk reguliert [13]. Calaghan et al. postulieren, dass die Summe dieser Effekte zu einer erhöhten Querbrückenaktivität zwischen Aktin und Myosin führen [14]. Dieser Prozess an sich führt bereits zu einer größeren Kraftentwicklung, führt jedoch auch zu der beschriebenen Erhöhung der Kalziumsensitivität des Troponin C [11].

Demgegenüber sind die Vorgänge während der SFR nicht vollständig aufgeklärt. Eine Steigerung der Kalziumsensitivität wie während der RFR scheint nicht zu erfolgen [15]. Klar ist jedoch, dass es zu einem Anstieg des Kalziumtransienten kommt [16,17], also einer Zunahme der Amplitude der Veränderung der intrazellulären Kalziumkonzentration ($[Ca]_i$) während des Kontraktionszyklus. Wie dies jedoch genau geschieht, ist noch nicht geklärt, es bestehen verschiedene Erklärungsansätze. Genauere Ausführungen und Überlegungen zu diesem Thema folgen im weiteren Verlauf der vorliegenden Arbeit.

Es sei jedoch schon an dieser Stelle auf die grundlegende Rolle von Kalzium in den o.g. Prozessen hingewiesen.

1.2.2 Folgen pathologischer Dehnung

Neben den oben beschriebenen physiologischen Effekten kommt es im Fall von pathologischer Überdehnung zu negativen Auswirkungen, die klinisch bis hin zum Herzversagen führen können.

So ist seit langem bekannt, dass eine weitere Dehnung des Herzmuskels mit einer entsprechenden Dehnung der Sarkomere über die optimale Länge von 2,0-2,2 μm hinaus zu einer Abnahme der Kontraktionskraft führt [3].

Neben den Auswirkungen auf die Kontraktionskraft führt akute Dehnung auch zu einer Zunahme spontaner Depolarisationen [18]. Diese erhöhte Automatie kann letztlich in der Situation akuter kardialer Dehnung zu Arrhythmien und somit Funktionsverlust führen.

Während die beiden o.g. Effekte für die kardiale Dysfunktion im Falle akuter Dehnung verantwortlich sind, wie z.B. im klinischen Fall einer akuten Lungenarterienembolie, führt chronische Dehnung zu grundsätzlichen Veränderungen in der Funktionsweise der Zelle.

Viele Arbeiten der letzten Jahrzehnte zeigen, dass Dehnung zu einem „Cardiac Remodelling“ führt, worunter man die Veränderung der Funktionsweise und der Morphologie des Herzmuskelgewebes versteht. Ausgedrückt wird dies durch veränderte Genexpression und Proteinsynthese, was in Hypertrophie und gestörter Funktion endet. Viele verschiedene Wege der Signaltransduktion wurden hierbei aufgezeigt. Einen guten Überblick geben die Arbeiten [19,20].

Auch der elektrische Zustand und die Erregbarkeit der Herzmuskelzelle werden durch langdauernde Belastung verändert. So konnte für Meerschweinchen gezeigt werden, dass in hypertrophierten Herzmuskelzellen gegenüber gesunden Herzmuskelzellen weniger Dehnung angewendet werden muss, um sowohl frühzeitige als auch späte Nachdepolarisationen auszulösen [21].

Als klinisches Korrelat dieser Veränderungen ist die sich chronisch entwickelnde Herzinsuffizienz mit Verlust der Pumpleistung und erhöhter Rate an z.T. lebensgefährlichen Herzrhythmusstörungen zu sehen.

1.3 Rolle von Natrium und Kalzium bei der Signaltransduktion dehnungsinduzierter Vorgänge

Sowohl Natrium als auch Kalzium spielen Schlüsselrollen in der Signaltransduktion verschiedener Vorgänge am Herzen. Am bekanntesten ist wohl die Funktion von Natrium und Kalzium bei der Entstehung des Aktionspotenzials und von Kalzium beim Querbrückenzyklus während der Kontraktion.

Auch bei der Transduktion dehnungsinduzierter Vorgänge spielen Natrium und Kalzium eine wichtige Rolle. Unterscheiden lassen sich im Wesentlichen drei Bereiche dehnungsinduzierter Vorgänge am Herzen, die im Folgenden näher erläutert werden.

1. Rolle von Natrium und Kalzium bei dehnungsinduzierten elektrophysiologischen Veränderungen
2. Rolle von Natrium und Kalzium bei dehnungsinduzierten Veränderungen der Kontraktionskraft
3. Rolle von Natrium und Kalzium als Transmitter beim „Cardiac Remodelling“ und bei Hypertrophie

1.3.1 Rolle von Natrium und Kalzium bei dehnungsinduzierten elektrophysiologischen Veränderungen

Es ist seit langem bekannt, dass Dehnung proarrhythmogene Effekte am Herzen hat [18].

Betrachtet man die o.g. Veränderungen der Konzentrationen von Natrium und Kalzium unter Dehnung, so wird klar, dass diese auch Veränderungen des elektrischen Zustandes der Zelle bedingen.

Im Allgemeinen wird davon ausgegangen, dass Dehnung zu einer Verlängerung der Dauer des Aktionspotenzials führt [8,22] und dass es zu einer Depolarisation mit Erhöhung des Membranpotenzials kommt [23]. Relativ einfach nachzuvollziehen ist dabei die Rolle von Natrium: Dehnung erhöht den Natriumeinstrom, führt zur Depolarisation der Zellmembran und erhöht damit die Bereitschaft zu Spontandepolarisationen. Tatsächlich wurde gezeigt, dass es durch Dehnung

zu solchen Depolarisationen kommt und dass diese durch vermehrten Natriumeinstrom in die Zelle verursacht werden [23].

Kalzium dagegen spielt eine komplexere Rolle. Die durch den erhöhten Kalziumtransienten verursachten Veränderungen scheinen vor allem durch die Beeinflussung anderer transmembranärer Ströme zu erfolgen, u.a. des Natrium-Kalzium-Austauschers (Na^+ - Ca^{2+} -Exchanger, NCX) [24,25], des repolarisierenden Kaliumstroms [26] und des L-Typ-Kalziumkanals [27].

1.3.2 Rolle von Natrium und Kalzium bei dehnungsinduzierten Veränderungen der Kontraktionskraft

Wie oben bereits geschildert, lässt sich der Kraftzuwachs nach erfolgter Dehnung in zwei Phasen unterteilen, in denen jeweils auch Natrium und Kalzium unterschiedliche Rollen spielen. Auf die erhöhte Kalziumsensitivität als grundlegender Mechanismus der RFR wurde bereits weiter oben eingegangen.

Auch bei den Vorgängen während der SFR spielen Natrium und Kalzium eine wichtige Rolle, jedoch ist diese nicht so gut aufgeklärt wie die während der RFR.

Als grundlegendes Phänomen während der SFR wurde eine Zunahme des intrazellulären Kalziumtransienten identifiziert [16,17]. Es herrscht jedoch sowohl Uneinigkeit über den Zeitpunkt der Veränderungen (systolisch oder diastolisch), als auch über die Mechanismen und Transporter, die in die Steigerung dieses Transienten involviert sind.

Aus theoretischen Überlegungen heraus ergeben sich zwei Möglichkeiten, die Veränderungen der $[\text{Ca}]_i$ bedingen: Zunahme des Kalziumeinstroms von außerhalb der Zelle über die Membran und Zunahme der Kalziumfreisetzung aus intrazellulären Speichern, auch wenn diese nicht streng voneinander zu trennen sind.

Für den Kalziumeinstrom aus dem Extrazellulärraum gibt es wiederum auch zwei Möglichkeiten: 1. Passiver Transport, d.h. entlang eines Konzentrationsgefälles, durch Kanäle, die eine Leitfähigkeit für Kalziumionen besitzen. 2. Durch aktiven, Natrium abhängigen Transport: Ein Anstieg der intrazellulären Natriumkonzentration ($[\text{Na}]_i$) führt zu einer Veränderung des Membranpotenzials. Dies bewirkt, dass der NCX in umgekehrter Transportrichtung arbeitet, also vermehrt Kalzium in die Zelle transportiert wird.

Zusammenfassend stellen sich folgende Fragen:

Wann und in welchem Ausmaß kommt es zu Veränderungen der $[\text{Ca}]_i$ und $[\text{Na}]_i$?

Welche Mechanismen sind in diese Veränderungen involviert?

Betrachtet man zunächst den Zeitpunkt der Veränderungen, so findet man unterschiedliche Angaben in der Literatur. Für die End-zu-End-Dehnung isolierter Kardiomyozyten [28] und ebenso von Herzmuskeltrabekeln des Meerschweinchens [29] wurde mittels fluoreszenzoptischer Verfahren eine Zunahme der diastolischen intrazellulären Kalziumionenkonzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_{i\text{-dia}}$) gezeigt. Unter Anwendung eines anderen Dehnungsprotokolls, lokaler axialer Dehnung, konnte

in isolierten Kardiomyozyten der Maus mit energiedispersiver Röntgen-Mikroanalyse ein Anstieg der diastolischen intrazellulären Konzentration des gesamten Kalziums ($[Ca_{ges}]_{i-dia}$) gezeigt werden, also nicht nur der ungebundenen Anteile wie in o.g. Arbeiten [30]. In isolierten End zu End gedehnten Kardiomyozyten und ganzen Trabekeln der Ratte demgegenüber zeigten sich keine signifikanten Veränderungen der $[Ca^{2+}]_{i-dia}$ während der SFR [15,17,31].

Bezüglich der Rolle von Natrium konnte gezeigt werden, dass lokale axiale Dehnung zu einem Anstieg der diastolischen intrazellulären Konzentration des gesamten Natriums ($[Na_{ges}]_{i-dia}$) in isolierten Kardiomyozyten der Maus führt [30]. Für die Ratte bestehen unterschiedliche Angaben für isolierte Kardiomyozyten und ganze Herzmuskeltrabekel: In isolierten Zellen wurde kein Anstieg der diastolischen intrazellulären Natriumionenkonzentration ($[Na^+]_{i-dia}$) gesehen [17], wohl aber in ganzen Trabekeln [32]. Dass die SFR Natrium abhängig ist, wurde ebenfalls für Trabekel von Kaninchen gezeigt [33].

Betrachtet man die Mechanismen, die in die Veränderungen involviert sind, so findet man auch hier viele unterschiedliche Angaben. Einigkeit besteht lediglich darüber, dass der L-Typ-Kalziumkanal keine Rolle spielt [17,23,34].

Die am meisten diskutierten Mechanismen sind:

- Dehnungsaktivierte Kanäle (Stretch Activated Channels, SACs)
- Natrium-Protonen-Austauscher (Na^+-H^+ -Exchanger, NHE)
- Natrium-Kalzium-Austauscher (Na^+-Ca^{2+} -Exchanger, NCX)
- Kalziumfreisetzung aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum (SR)

SACs

Bei SACs handelt es sich um durch Dehnung aktivierte, nicht selektive Kationenkanäle [35], die im Wesentlichen Natriumionen, in Teilen jedoch auch Kalziumionen transportieren [36]. Die Aktivierung von SACs kann somit theoretisch auf zwei Arten zu einer Erhöhung der Kalziumkonzentration führen: Einerseits durch direkten Kalziumeinstrom durch die SACs, andererseits durch eine Erhöhung der $[Na]_i$, die eine Steigerung des Kalziumeinstroms durch den NCX in umgekehrter Transportrichtung oder zumindest eine Verminderung des Kalziumausstroms durch den NCX bedingt (s.u.).

In der Literatur findet man über die tatsächliche Bedeutung der SACs während Dehnung unterschiedliche Angaben.

In isolierten Kardiomyozyten und Herzmuskeltrabekeln der Ratte konnte gezeigt werden, dass die Blockade von SACs mit Streptomycin zu einer Abnahme der SFR führt [31], also dass diese Kanäle eine wichtige Rolle spielen. Ebenso wurde für isolierte Kardiomyozyten der Maus ein Anstieg der $[Na_{ges}]_{i-dia}$ gezeigt, der durch Blockade der SACs mit Streptomycin verhindert wurde [30].

Demgegenüber konnte bei humanen Herzmuskeltrabekeln durch Blockade der SACs keine Veränderung der SFR bewirkt werden [37,38].

NHE

Physiologischerweise werden durch den NHE ein Proton aus der Zelle heraus transportiert im Tausch gegen ein Natriumion in die Zelle hinein. Kommt es zu einer Aktivierung des NHE und somit zu einem Anstieg der $[Na]_i$, führt dies auch hier wiederum über den Weg des NCX zu einer Erhöhung der $[Ca]_i$. So wurde auch für verschiedene Spezies (Ratte, Katze, Kaninchen, Mensch) gezeigt, dass Blockade des NHE zur Abschwächung der SFR führt [31,32,33,37].

NCX

Bei normaler Zellfunktion im ungedehnten Zustand bei einem normalen Ruhemembranpotenzial werden drei Natriumionen in die Zelle hinein transportiert im Austausch gegen ein Kalziumion. Wird jedoch das Membranpotenzial positiv gegenüber dem Umkehrpotenzial des NCX und steigt die $[Na]_i$ an, so arbeitet dieser in umgekehrter Transportrichtung [39]. Da es, wie bereits beschrieben, während der Dehnung zu einem Natriumeinstrom in die Zelle und somit zu einer Depolarisation kommt, ist es denkbar, dass dies eine Umkehr der Transportrichtung des NCX und somit einen Kalziumeinstrom in die Zelle zur Folge hat. Es konnte gezeigt werden, dass der NCX in umgekehrter Transportrichtung eine wichtige Rolle bei der SFR spielt [33,40].

SR

Das Sarkoplasmatische Retikulum (SR) ist einer der wichtigsten intrazellulären Kalziumspeicher und wird als wichtigste Quelle des Aktivator-Kalziums während der Kontraktion angesehen. Man kann sich daher vorstellen, dass es auch unter Dehnung zu einer Kalziumfreisetzung aus dem SR kommt, die wiederum für die erhöhte Kraftentwicklung während der SFR verantwortlich ist.

Auch hier finden sich in der Literatur z.T. widersprüchliche Angaben. In Herzmuskeltrabekeln der Ratte führte die Blockade der Kalziumausschüttung aus dem SR zu einer Verlangsamung der SFR als Hinweis auf die Rolle des SR, ohne jedoch das Ausmaß des Kraftzuwachses zu vermindern [15]. Ebenso wurde für die Ratte gezeigt, dass Dehnung eine Zunahme der Kalziumfreisetzung aus dem SR bedingt [41]. In einer neueren Arbeit wurde im Gegensatz dazu gesehen, dass Blockade des Ryanodin-Rezeptor-Kanals (Ryanodin-Rezeptor- Ca^{2+} -release-Channel, RyRC) des SR, und damit Blockade der Kalziumfreisetzung aus dem SR, keinerlei Einfluss auf die SFR hatte [31]. Bemerkenswert ist aber, dass in o.g. Arbeiten z.T. unterschiedliche Dehnungsprotokolle eingesetzt wurden.

1.3.3 Rolle von Natrium und Kalzium als Transmitter beim „Cardiac Remodelling“ und bei Hypertrophie

Bei den Signalwegen, die zum „Cardiac Remodelling“ und zur Hypertrophie führen, spielt vor allem Kalzium eine Rolle. Es sind eine Vielzahl von Enzymen und anderen Transmittern bekannt, die Kalzium abhängig aktiviert werden. In der Regel führt die Bindung von Kalzium an das entsprechende Molekül zu einer Änderung der Konformation, was wiederum zur Aktivierung oder Deaktivierung führt.

Dass es unter Dehnung zur Aktivierung Kalzium abhängiger Signalwege kommt, wurde vielfach gezeigt, beispielhaft für die Fülle der möglichen Wege seien hier Calcineurin [42] und die Kalzium-Calmodulin-Kinase II genannt [43].

1.4 Versuchsmodelle zur Untersuchung dehnungsinduzierter Veränderungen

1.4.1 Dehnung von isolierten Kardiomyozyten

Bei der Isolation von Kardiomyozyten werden mittels verschiedener Enzyme die einzelnen Zellen aus dem gesamten Verbund des Herzmuskels herausgelöst. In der Folge erhält man „nackte“ Kardiomyozyten ohne umgebendes Bindegewebe, mit freiliegender Zellmembran. Hier wird auch eine der wichtigsten Eigenschaften solcher Modelle deutlich, bei denen nur die einzelnen Zellen gedehnt werden: Es erfolgt nur die Dehnung der Zelle selbst und es kann nur die jeweilige Zelle reagieren. Die gefundenen Reaktionen beruhen also auf Mechanismen, die in der isolierten Zelle stattfinden. Der Vorteil besteht somit darin, dass wesentlich genauer die Reaktion der Zelle selbst untersucht werden kann, ohne Einfluss anderer Strukturen. Hier besteht aber auch der Nachteil solcher Modelle. In vivo reagiert auch das gesamte Herz, d.h. auch nicht-muskuläre Strukturen werden gedehnt, die wiederum auf die Reaktion der Muskeln Auswirkungen haben können.

Die o.g. freiliegende Zellmembran ist auch Voraussetzung dafür, dass Zellen unter „Patch Clamp“ Bedingungen (Spannungsklemme) gedehnt werden können. Bei dieser Methodik wird eine Pipette mit sehr kleiner Öffnung auf die Zellmembran aufgesetzt, anschließend wird durch Erzeugen eines Vakuums der Bereich der Membran innerhalb der Öffnung der Pipette gegenüber der restlichen Membran abgedichtet und elektrisch isoliert. Benutzt man die Pipette als Elektrode können also transmembranäre Ströme in diesem Bereich gemessen werden. Diese können im Detail untersucht werden. Durch die aufgesetzte Elektrode kann ein definiertes Membranpotenzial angelegt und konstant gehalten werden. So können Ionenströme untersucht werden ohne den Einfluss eines sich änderndes Membranpotenzials.

Bezüglich der Art wie die einzelnen Zellen gedehnt werden, muss man grundsätzlich unterscheiden, ob Zellen End zu End gedehnt werden, d.h. entlang der Längsachse der Zelle, ohne

wesentliche Scherkräfte, oder ob Dehnungsprotokolle angewendet werden, bei denen Scherkräfte auftreten. Im weiteren Verlauf der vorliegenden Arbeit wird diese Methodik diskutiert, daher sei sie hier bereits kurz erwähnt: Lokale axiale Dehnung bedeutet, dass die Zelle an einem Glasstylus und der Patch-Pipette befestigt wird, beide im Abstand von ca. 30 µm. Wird der Abstand zwischen diesen vergrößert, wird vor allem das kleine Stück Membran zwischen Patch-Pipette und Stylus gedehnt, ohne dass es zu einer Dehnung der gesamten Zelle in Längsachse kommt [30].

1.4.2 Dehnung von Herzmuskeltrabekeln

Ganze Trabekel werden aus dem Herzen entnommen und gedehnt, meist zwischen einem starren Haken und einem Kraftaufnehmer, der die Kontraktion aufzeichnet. Die Dehnung erfolgt hierbei immer End zu End.

Ganze Herzmuskeltrabekel beinhalten auch nicht-muskuläre Strukturen wie Fibroblasten, die ebenfalls mit gedehnt werden und somit die Myozyten beeinflussen können, sei es durch electrophysiologische Signale, sei es durch Ausschüttung von Transmittern. Somit steht dieses Modell der Situation in vivo näher als die Dehnung isolierter Zellen, hat jedoch auch den Nachteil, dass schwer differenziert werden kann, ob der gesehene Effekt durch die Myozyten selbst oder durch andere Strukturen verursacht wird.

1.5 Methoden zur Messung der Konzentrationen einzelner Elemente

Die gängigsten Methoden zur Messung von Veränderungen der Konzentrationen einzelner Elemente sind fluoreszenzoptische Verfahren. Diese beruhen darauf, dass der Zelle ein Farbstoff zugeführt wird, dessen Emissionsspektrum sich durch Bindung von Ionen des zu untersuchenden Elements verändert. Wird dieser Farbstoff zur Fluoreszenz angeregt, so kann aus dem quantitativen Verhältnis des Lichtes, das durch die unveränderte Form emittiert wird, zu dem das durch die veränderte Form emittiert wird, auf die Menge des veränderten Farbstoffes geschlossen werden. Dieses Verhältnis gibt Information über das Ausmaß der Veränderung der Konzentration des entsprechenden Elements. Es stellt aber in jedem Fall eine indirekte Messweise dar, da die Konzentrationen nur errechnet werden können.

Eine weitere Methodik, die in der vorliegenden Arbeit angewandt wurde, ist die Konzentrationsmessung mittels Elektronenstrahl-Röntgen-Mikroanalyse (Electron Probe Micro Analysis, EPMA) am Elektronenmikroskop (EM), auf die im Methodikteil genauer eingegangen wird. Hierbei wird die Gesamtkonzentration des entsprechenden Elements, sprich die Summe aus freien und gebundenen Anteilen, gemessen. Die hohe räumliche Auflösung erlaubt es Konzentrationen in zellulären Subkompartimenten zu messen.

2 ZIELSTELLUNG

Um Auslöser chronischer Veränderungen z.B. während des „Cardiac Remodelling“ zu sein, müssen theoretisch die Veränderungen der intrazellulären Kalziumkonzentration andauernd, also nicht nur passager während der Kontraktion sein. Vereinfacht ausgedrückt muss diesen Veränderungen Zeit gegeben werden, um länger dauernde Vorgänge wie z.B. Veränderungen der Transkription zu bedingen. Dies wiederum bedeutet, dass es nicht nur zu den genannten passageren Konzentrationserhöhungen während der Systole kommt, sondern dass diese auch noch während der Diastole bestehen bleiben. Daraus ergibt sich die Frage, ob es tatsächlich unter Dehnung zum Anstieg der diastolischen Kalziumkonzentration kommt, da theoretisch vor allem diese Auslöser für chronische Veränderungen sein kann. Aus diesem Grund werden in der vorliegenden Arbeit die Veränderungen der diastolischen Konzentrationen von Natrium und Kalzium analysiert.

Aus den Erläuterungen in der Einleitung wird deutlich, dass es widersprüchliche Angaben zu dem Verhalten von Natrium und Kalzium unter Dehnung gibt, vor allem in der Diastole. Die in der Literatur beschriebenen Diskrepanzen sind dabei durch Speziesunterschiede, unterschiedliche Dehnungsprotokolle und unterschiedliche Messverfahren erklärbar.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu untersuchen, ob es unter End-zu-End-Dehnung von ganzen Herzmuskeltrabekeln der Ratte zu Veränderungen der $[Na_{ges}]_{i-dia}$ und $[Ca_{ges}]_{i-dia}$ kommt, die mittels EPMA erfasst werden können. Außerdem wird der direkte Vergleich zu vorliegenden Ergebnissen isolierter Myozyten der Ratte gezogen, die ebenfalls mittels EPMA analysiert wurden, die jedoch lokal axial an der Zellmembran gedehnt wurden. Damit sollen die Effekte zweier verschiedener Dehnungsprotokolle direkt an derselben Spezies mittels desselben Messverfahrens untersucht werden. Da die Versuche an derselben Spezies durchgeführt und Veränderungen der Elementkonzentrationen mit derselben Methodik gemessen werden, sind eventuell auftretende Unterschiede also durch die Art der Dehnung bedingt und lassen sich direkt vergleichen. Die Versuche mit isolierten Kardiomyozyten wurden durch einen anderen wissenschaftlichen Mitarbeiter unserer Arbeitsgruppe durchgeführt (Dr. Denis Kondratev) und waren nicht Gegenstand der für die vorliegende Arbeit durchgeführten Experimente. Teile der Ergebnisse fließen jedoch in den Ergebnisteil und die Diskussion ein.

Um eine eventuelle Veränderung in der Transkription hervorzurufen, muss es theoretisch auch zu einer Fortleitung des Kalziumsignals in den Zellkern, den wichtigsten Ort solcher Vorgänge kommen. Daher wird in der vorliegenden Arbeit auch untersucht, in welchen zellulären Subkompartimenten es zu Änderungen der diastolischen Konzentrationen von Natrium und Kalzium kommt. Auch hier werden die Veränderungen, die durch End-zu-End-Dehnung von Herzmuskeltrabekeln verursacht werden, mit denen verglichen, die durch lokale axiale Dehnung isolierter Kardiomyozyten hervorgerufen werden.

3 MATERIAL UND METHODIK

3.1 Versuchstiere

Alle Experimente wurden mit ca. neun Wochen alten, 250-350 g schweren männlichen Wistar-Hannover Ratten durchgeführt. Sie erfolgten gemäß den Tierschutzrichtlinien der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

3.2 Lösungen

Die Chemikalien zur Herstellung der Lösungen wurden, soweit nicht anders angegeben, von der Firma Merck bezogen. Das NaCl wurde von der Firma Roth bezogen, das zur Kardioplegie eingesetzte 2,3-Butadion-Monoxim (2,3-BDM) von der Firma Sigma.

Als Versuchslösung wurde eine modifizierte Krebs-Henseleit-Lösung (KHL) verwendet. Tabelle 1 zeigt die Konzentrationen der Inhaltsstoffe.

Tabelle 1 – Konzentrationen der Inhaltsstoffe der Versuchslösung in mmol/l.

Substanz	Konzentration [mmol/l]
NaCl	116,1
KCl	5,0
MgCl ₂	1,2
Na ₂ SO ₄	1,2
NaH ₂ PO ₄	2,0
Glukose	10,0
NaHCO ₃	20,0
CaCl ₂	0,25

Die Lösung, mit der nach der Entnahme die Herzen zunächst retrograd perfundiert wurden und in der die Trabekel präpariert wurden (nachfolgend Dissektionslösung genannt), enthielt zusätzlich 20 mmol/l 2,3-BDM. Zur Oxygenierung und zur Einstellung des pH-Werts auf 7,4 wurden die Lösungen mit einem Gasgemisch aus 95% O₂ und 5% CO₂ begast.

Die während der Versuchsdurchführung notwendige Erhöhung der Kalziumkonzentration wurde mit einer CaCl₂-Stammlösung der Konzentration 1 mol/l vorgenommen.

3.3 Aufbau und Geräte der Versuchsanordnung

Teile der Versuchsanordnung wurden von dem von Wendt-Gallitelli et al. publizierten Versuchsaufbau übernommen [44]. Abb. 3 zeigt eine Fotografie des Versuchsaufbaus.

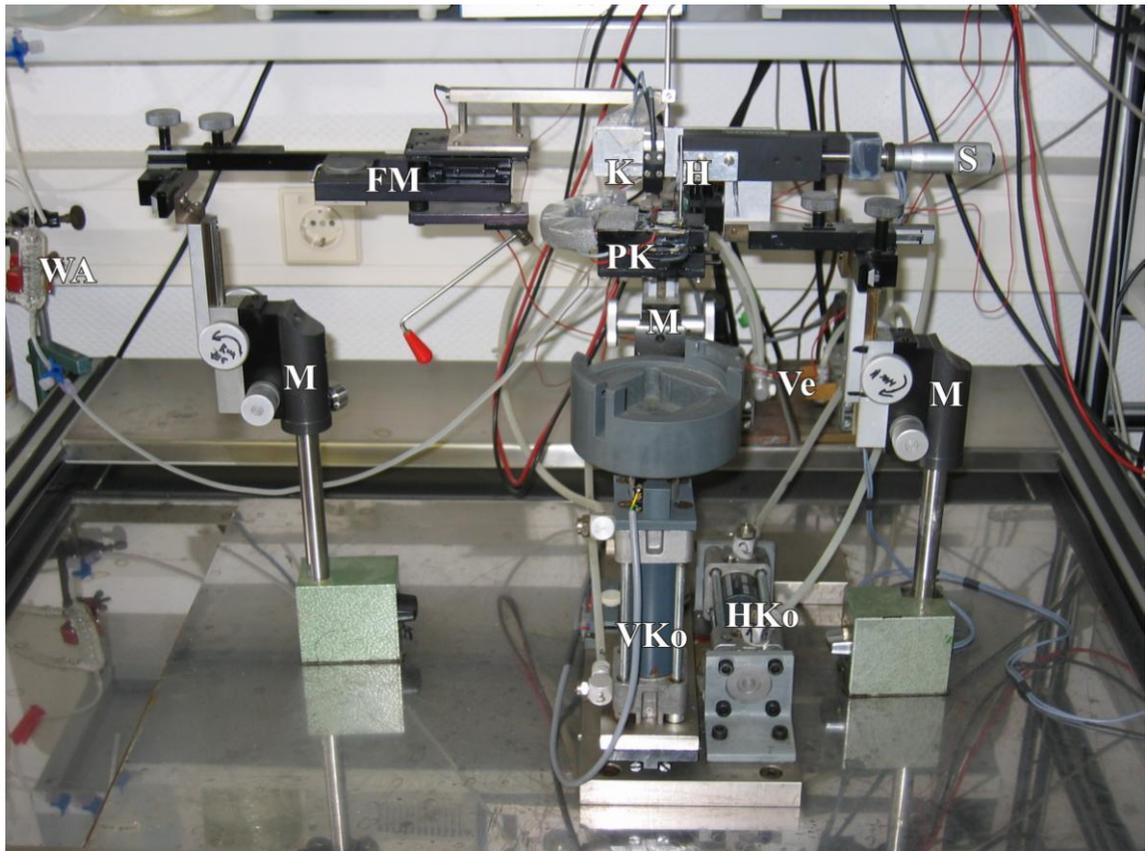


Abb. 3 – Versuchsaufbau für die muskelmehchanischen Experimente. PK: Perfusionskammer, K: Kraftaufnehmer, H: starrer Haken, S: Mikrometerschraube, M: dreidimensionale Mikro-manipulatoren, FM: sehr feiner Mikro-manipulator, VKo: vertikaler Kolben mit Halterung für das Gefäß mit dem Kühlmittel, HKo: horizontaler Kolben, im Hintergrund erkennt man den Wärmeaustauscher (WA) und Teile der Magnetventile (Ve). Einzelheiten siehe Text.

Die Perfusionskammer (PK auf dem Foto) hatte ein Volumen von ca. 1,5 ml. In ihr befand sich die eigentliche Messvorrichtung, in die die Herzmuskeltrabekel eingehängt und mit der die muskelmehchanischen Experimente durchgeführt wurden.

Die eine Seite der Aufhängung bestand aus einer L-förmig gebogenen Stahlkanüle. An ihrem horizontalen Ende war eine kleine gebogene Schlinge aus Platin-Iridium-Draht (90% Pt, 10% Ir) der Stärke 0,25 mm befestigt. Die so präparierte Kanüle war mit einem Kraftaufnehmer (K) (Kraftaufnehmer KG4, Fa. Scientific Instruments, Heidelberg, Deutschland) verbunden. Die andere Seite der Aufhängung war ein starrer Haken (H), dessen Spitze elektrolytisch reduziert worden war. Eine Mikrometerschraube (S) erlaubte eine stufenlose Veränderung des Abstands zwischen den beiden Aufhängungen.

In der Perfusionskammer waren parallel zum Muskel zwei Reizelektroden aus Platinblech angebracht.

Unter der Perfusionskammer befanden sich zwei Heizwiderstände, die von einem Temperaturregler (Fa. Diesen und Kern, Bad Bramstedt, Deutschland) gesteuert wurden. Über einen Temperaturfühler in unmittelbarer Nähe der Perfusionskammer konnte so die Temperatur der durchfließenden Lösung konstant gehalten werden.

Die Perfusionskammer und die Messvorrichtung waren getrennt voneinander an dreidimensionalen Mikromanipulatoren (M) angebracht.

Der Mikromanipulator mit der Perfusionskammer war auf einem leichtgängigen, für diesen Zweck konstruierten, Metallschlitten befestigt, der eine horizontale Verschiebung erlaubte. Diese horizontale Bewegung wurde durch einen pneumatisch betriebenen Kolben (HKo) (Fa. Bosch, Stuttgart, Deutschland) ausgelöst. Ebenfalls auf dem Metallschlitten befand sich vor der Perfusionskammer ein vertikal angebrachter pneumatischer Kolben (VKo), an dessen oberem Ende sich die Halterung für das Aluminiumgefäß mit dem flüssigen Propan zum Frieren der Muskeln befand. Gesteuert wurden die Kolben durch elektromagnetische Ventile (Ve) (Fa. Bosch, Stuttgart, Deutschland), die benötigte Druckluft wurde durch einen Kompressor aufgebaut (Silent 50, Fa. Schneider Druckluft, Reutlingen, Deutschland).

Die Halter, mit denen die Gewebeproben aufgenommen wurden, waren Aluminiumpins zum Frieren von Proben zur Kryoultramikrotomie (Objekträger mit Aufnahmebohrung, Fa. Leica, Wetzlar, Deutschland). Diese wurden auf die notwendige Breite von etwa 1,5-3 mm herunter gefeilt. Durch eine Steckverbindung wurden sie an einer Aufhängung befestigt, die ebenfalls an einem Mikromanipulator angebracht war. Mit einem weiteren, fein steuerbaren Mikromanipulator (FM) konnte diese Vorrichtung am Ende des Versuchs präzise über dem Herzmuskeltrabekel platziert werden (siehe auch 3.4.3 Frieren der Proben für die Kryoultramikrotomie).

Der Zufluss der Lösungen geschah durch hydrostatischen Druck aus höher gelagerten Bechergläsern, mit verschiedenen Dreiwegehähnen konnten die Lösungen gewechselt werden. Der Perfusionskammer vorgeschaltet war ein Wärmeaustauscher (WA). Mit einem Thermostat (Colora K2, Fa. Colora Messtechnik GmbH, Lorch, Deutschland) wurde bereits hier die Versuchslösung erwärmt.

Über eine auf Höhe des oberen Randes der Perfusionskammer angebrachte Kanüle wurde mit einer Pumpe (Ecoline VC-MS/CA, Fa. Ismatec, Wertheim, Deutschland) die benutzte Lösung abgesaugt und verworfen.

Die Aufnahme und Verarbeitung des Kraftsignals erfolgte mit einem Brückenverstärker (Brückenverstärker BAM4C, Fa. Scientific Instruments, Heidelberg, Deutschland), der mit dem Kraftaufnehmer verbunden war. Es konnten Kraftsignale im Bereich von 0-20 mN mit einer Auflösung von 15 μ N dargestellt werden. Sein Ausgangssignal wurde einerseits mit einem Oszilloskop (TDS 1012, Fa. Tektronix, Bracknell, United Kingdom) dargestellt und andererseits über eine Multifunktionskarte (PCI-703-16A, Fa. Eagle Technology, Kapstadt, Südafrika) mit einem Computer aufgezeichnet.

Die Reize zur Stimulation der Muskeln wurden mit einem Stimulator der Firma Scientific Instruments (Stimulator STIM, Fa. Scientific Instruments, Heidelberg, Deutschland) erzeugt. Dieser war sowohl mit den Platinelektroden der Perfusionskammer als auch mit dem Kraftaufnehmer und dem Halter zum Frieren der Proben verbunden.

Die Steuerung und Verschaltung der gesamten Versuchsanlage waren in einem im Institut gefertigten Steuermodul integriert. Hier war der Brückenverstärker mit dem Computer verbunden, der Stimulator mit den jeweiligen Reizelektroden. Ebenfalls wurden hier die Ventile der Kolben gesteuert und es konnte die Verzögerung zwischen dem letzten Reiz und dem Auslösen der Kolben eingestellt werden (siehe auch 3.4.3 Frieren der Proben für die Kryoultramikrotomie).

Der gesamte Versuchsaufbau war zur Verringerung von mechanischen Störungen auf einem schwingungsdämpfenden Arbeitstisch (Fa. Science Products GmbH, Deutschbaselitz, Deutschland) aufgebaut.

Ein Stereomikroskop war so angebracht, dass die Perfusionskammer vergrößert betrachtet werden konnte.

3.4 Versuchsdurchführung und Versuchsprotokolle

3.4.1 Entnahme der Herzen und Präparation der Herzmuskeltrabekel

Die Ratten wurden mit einem Gasgemisch aus 60% CO₂ und 40% O₂ narkotisiert.

Nach Erreichen einer ausreichenden Narkosetiefe wurde der Thorax vorsichtig eröffnet, sodass sich das noch schlagende Herz samt der abgehenden Gefäße darstellte. Nach intrakardialer Injektion von Heparin in den rechten Vorhof zur Antikoagulation wurde das Herz schonend unter Erhaltung der Aortenwurzel entnommen. Die entnommenen Herzen wurden mittels einer Langendorff-Apparatur über die Aortenwurzel kanüliert und retrograd mit Dissektionslösung bei Zimmertemperatur perfundiert, um die Koronargefäße von dem restlichen Blut frei zu spülen. Waren die Koronarien frei von Blut und das Herz vom makroskopischen Aspekt intakt, wurde unter einem Stereomikroskop der rechte Ventrikel durch Schnitte entlang des Kammerseptums und entlang der Pulmonalarterie bis zur Trikuspidalklappe vorsichtig eröffnet und nach Entfernung des rechten Vorhofs aufgeklappt.

Die gesamte Präparation erfolgte bei Zimmertemperatur in Dissektionslösung. Die Kardioplegie wurde durch das enthaltene 2,3-BDM erreicht und minimierte die Beschädigung der Muskeln während der Präparation. Die Kardioplegie war vollständig reversibel [45].

Für die Experimente wurden Herzmuskeltrabekel benutzt, die in ihrer ganzen Länge frei von Verzweigungen waren, um etwaige Veränderungen in der Ionenverteilung durch schnittbedingte Membranverletzungen und außerdem potentielle Ursprungsorte für Arrhythmien zu vermeiden.

Mindestens in einer Dimension (Breite bzw. Dicke der Trabekel) durfte der Durchmesser der Muskeln maximal 250 µm betragen. Dies ist notwendig, da die Versorgung der Muskeln mit Nährstoffen und Sauerstoff nur durch Perfusion von außen aus der Versuchslösung geschieht und bei größerem Durchmesser daher ein innerer Kern des Trabekels aufgrund zu großer Diffusionsstrecke minderversorgt sein kann. Darüber hinaus sind die Ergebnisse des Schockgefrierens desto besser, je feiner die Präparate sind.

Aus technischen Gründen mussten die Muskeln mindesten ca. 1,7-2,0 mm lang sein, um in der Messvorrichtung eingehängt werden zu können und um am Ende des Versuches auf den Haltern zum Frieren angebracht werden zu können. Der Großteil solcher Muskeln fand sich von der Ventrikelwand ausgehend entlang der Trikuspidalklappe.

In der Regel wurden Trabekel verwendet, die von der Ventrikelwand aus frei bis zur Klappe verliefen und mit dieser verbunden waren. So konnte das eine Ende mitsamt eines kleinen Stücks Klappe herausgeschnitten werden, das andere wurde mit einem kleinen Muskelblock aus der Wand heraus präpariert. Konnten keine Muskeln mit Klappenrest gewonnen werden, wurde an beiden Enden ein Muskelblock belassen.

Während der gesamten Präparation wurde darauf geachtet, keinen Zug auf die verwendeten Trabekel auszuüben und sie nicht mit den Instrumenten zu berühren, um Schäden zu minimieren.

3.4.2 Mechanische Versuche an Herzmuskeltrabekeln

Nach Entnahme wurden die Trabekel in der Perfusionskammer in die Messvorrichtung eingehängt. Zur weiteren Schonung war diese mit Dissektionslösung vorgefüllt. Dazu wurde das Ende mit dem Klappenrest (gegebenenfalls einem kleinen Muskelblock) durch die Schlaufe aus Platindraht gesteckt, sodass das andere Ende mit dem Muskelblock in der Schlaufe hängen blieb. Der Klappenrest bzw. der andere kleine Muskelblock wurde auf den Haken der zweiten Seite der Aufhängung gespießt (Abb. 4). Diese Art der Muskelaufhängung gilt als die schonendste [46].

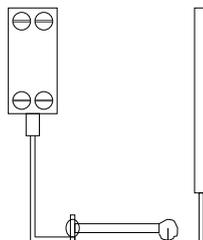


Abb. 4 – Schematische Darstellung eines zwischen Kraftaufnehmer (links) und starrem Haken (rechts) eingehängten Muskels.

Mit der Mikrometerschraube wurde der Abstand so eingestellt, dass auf den Muskel gerade noch keine Vordehnung ausgeübt wurde.

Nun wurde die Perfusion mit 0,25 mmol/l Kalzium enthaltender KHL angestellt, um die Dissektionslösung auszuwaschen und die Temperatur wurde auf 37° C erhöht. Die Stimulation wurde eingeschaltet und die Reizstärke so lange erhöht, bis deutliche Kontraktionen zu registrieren waren. Diese erreichte Reizstärke wurde um weitere 10% erhöht. In aller Regel betrug die Reizamplitude zwischen drei und fünf Volt. Die Stimulation erfolgte mit bipolaren Rechteckimpulsen von 5 ms Länge bei einer Grundfrequenz von 2 Hz.

Nachdem die Kalziumkonzentration auf 0,5 mmol/l erhöht worden war, wurde dem eigentlichen Experiment eine 60 minütige Erholungsphase vorangestellt, in der sich der Muskel von der Präparation erholen und stabilisieren konnte. Nach Ablauf dieser Zeit wurde die Kalziumkonzentration schrittweise auf die Endkonzentration von 1,25 mmol/l erhöht.

Hatte der Muskel adäquat auf die Erhöhung der Kalziumkonzentration der Lösung reagiert, d.h. war die Kraftentwicklung unter erhöhter Kalziumkonzentration wie erwartet angestiegen, und war weiterhin stabil, d.h. ohne Arrhythmien, wurde die Vordehnung durch vorsichtige Vergrößerung des Abstands der beiden Aufhängungen erhöht und die Zunahme der systolischen Kraftentwicklung beobachtet. Da es dem Muskel nicht möglich war sich zu verkürzen und die sich entwickelte Kraft aufgezeichnet wurde, lag die Situation isometrischer Kraftentwicklung bzw. Dehnung vor. In regelmäßigen Abständen wurde der Dehnungsvorgang unterbrochen, damit sich die angestiegene isometrische Kraftentwicklung des Muskels stabilisieren konnte und dieser einen stabilen Zustand erreichen konnte. Auf diese Art und Weise wurde der Muskel bis auf die Länge der maximalen systolischen Kraftentwicklung (L_{max}) gedehnt. Erkennbar ist dieser Punkt durch verschiedene Möglichkeiten, wie der Muskeln seine Reaktion auf Dehnung verändert:

- Durch weitere Dehnung nimmt die Kraft wieder ab.
- Der Muskel reagiert auf weitere Erhöhung der Vordehnung ohne eine deutliche Kraftzunahme. Dies ist dadurch zu erklären, dass im Bereich von L_{max} zunächst ein Plateau erreicht wird.
- Unter weiterer Dehnung reagiert der Muskel durch einen deutlichen Anstieg der diastolischen Kraft. Im Gegensatz zu dem kontinuierlichen aber langsamen Anstieg der diastolischen Kraft während des gesamten Dehnungsvorganges, sieht man in dieser Situation bei geringer Erhöhung der Vordehnung eine deutliche Zunahme der diastolischen Kraft.

Bereits während des Dehnungsvorganges wurden die Qualität des Muskels und sein Verhalten beurteilt. So darf vor allem zu Beginn der Dehnung die diastolische Kraft nicht bzw. nur

langsam ansteigen (s.o.), da dies sonst Ausdruck einer Kontraktur sein kann. Ebenso wurden nur Muskeln verwendet, die rhythmisch und ohne Extrasystolen zuckten. Wurden diese Kriterien während des Dehnungsprozesses erfüllt, wurden die Muskeln weiter verwendet.

Die bei L_{\max} erreichte Länge wurde mit einer in dem Okular des Stereomikroskops integrierten Skala vermessen.

Hatte der Trabekel bei L_{\max} einen stabilen Zustand erreicht, wurde er wieder auf 85% der Länge von L_{\max} entdehnt, um sich für weitere 30 min erholen zu können. Der Sinn dieses Vorgehens bestand darin, vor der Zuordnung der Muskeln zu der Kontroll- bzw. der Stretch-Gruppe vergleichbare Voraussetzungen für beide Gruppen zu schaffen.

Nach Ablauf der 30 min wurden an den Muskeln Kontraktilitätstests durchgeführt, um ein regelgerechtes Verhalten zu überprüfen und damit intakte Trabekel zu gewährleisten.

Folgende zwei Kontraktilitätstests wurden durchgeführt:

Kraft-Frequenz-Beziehung (force-frequency relationship [FFR])

Hierbei wird die Kraftentwicklung bei unterschiedlichen Stimulationsfrequenzen gemessen. Die Ratte zeigt in den Bereichen von 1-6 Hz eine frequenzabhängige Zunahme der Kraftentwicklung, d.h. es zeigt sich eine positive Frequenzinotropie [47]. Zu erklären ist dies dadurch, dass mit zunehmender Frequenz durch häufigere Membrandepolarisation auch mehr Kalzium in die Zelle einströmt und es zu einer vermehrten Kalziumspeicherung im SR kommt. Somit steht mehr Kalzium für die Kontraktion zur Verfügung, was die positive Inotropie erklärt.

In den Versuchen wurde die Kraftentwicklung bei Stimulationsfrequenzen von 1-6 Hz aufgezeichnet.

Post-Pause-Potenzierung (post-rest potentiation [PRP])

Hierbei wird die Stimulation für eine gewisse Zeit unterbrochen. Daher besteht mehr Zeit für Kalziumaufnahme aus dem Zytosol in das SR, sodass für die erste nachfolgende Kontraktion mehr Kalzium zur Verfügung steht und es zu einer stärkeren Kraftentwicklung kommt.

In den Versuchen wurde die Kraftentwicklung nach Pausen von 5, 10, 30, 60 und 120 Sekunden aufgezeichnet.

War das Verhalten der Muskeln zufriedenstellend, wurden die Muskeln entweder bei 85% von L_{\max} zum Schockgefrieren vorbereitet (Kontroll-Gruppe) oder erneut auf L_{\max} gedehnt und dann nach Erreichen der maximalen Kraftentwicklung, also nach Ablauf der SFR, zum Schockgefrieren vorbereitet (Stretch-Gruppe).

Damit ergaben sich zusammenfassend zwei verschiedene Versuchsprotokolle:

Versuchsprotokoll der Kontroll-Gruppe:

Dehnung auf L_{\max} → Entdehnung auf 85% L_{\max} → 30 minütige Erholungszeit → Durchführung von FFR und PRP → Vorbereitung zum Schockgefrieren

Versuchsprotokoll der Stretch-Gruppe:

Dehnung auf L_{\max} → Entdehnung auf 85% L_{\max} → 30 minütige Erholungszeit → Durchführung von FFR und PRP → Erneute Dehnung auf L_{\max} und Erreichen der maximalen Kraftentwicklung → Vorbereitung zum Schockgefrieren

Abb. 5 zeigt die vollständige Aufzeichnung eines Versuchs der Stretch-Gruppe.

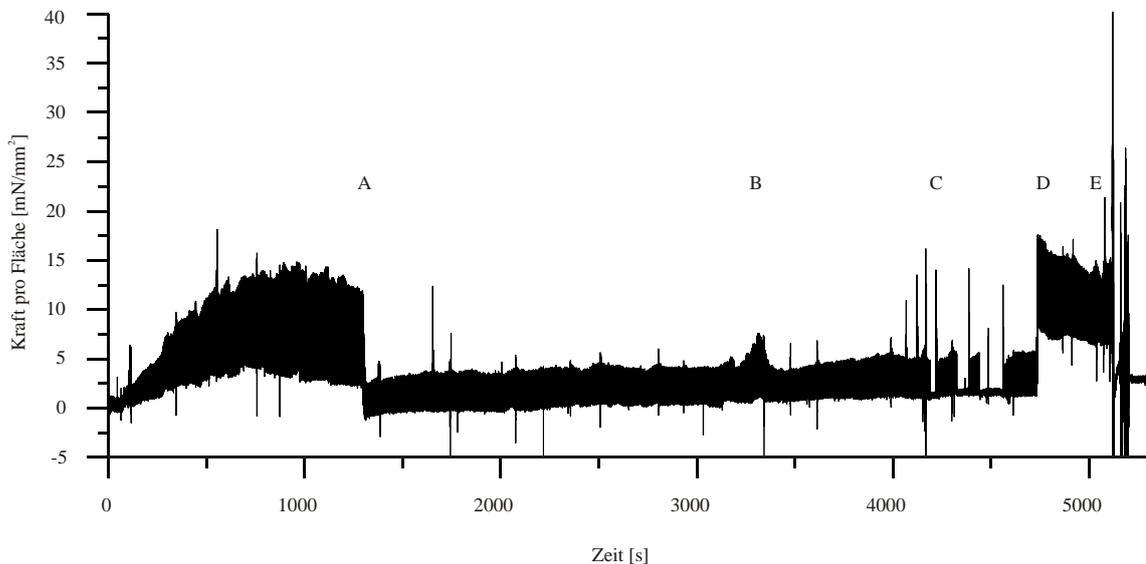


Abb. 5 – Originalaufzeichnung eines Versuchs der Stretch-Gruppe. A: Entdehnen des Muskels nach Erreichen von L_{\max} . B: FFR, C: PRP. D: erneute Dehnung. E: Moment des Schockgefrierens.

3.4.3 Frieren der Proben für die Kryoultramikrotomie

Bereits vor Ende der zweiten Erholungsphase wurde das flüssige Propan zum Schockgefrieren der Herzmuskeltrabekel vorbereitet. Da sich zeigte, dass reines Propan zu schnell und damit bereits vor Ende des Versuches fest wurde, waren dem Propan 15% Isobutan zugesetzt. Dadurch wurde der Gefrierpunkt erniedrigt, wodurch das Gasgemisch bis zum Versuchsende flüssig blieb.

Zunächst wurde das Aluminiumgefäß für das Propan/Isobutan-Gemisch in flüssigem Stickstoff (nachfolgend LN₂) auf dessen Temperatur von etwa -196°C gebracht. In das vorgekühlte Gefäß wurden ca. 100 ml des flüssigen Gasgemisches abgefüllt. Dadurch, dass das Gasgemisch durch eine ebenfalls mit LN₂ gekühlte Kupferspirale aus der Gasflasche entnommen wurde, war das Gemisch bereits zum Entnahmezeitpunkt flüssig. Da mit den Vorbereitungen zum Frieren, wie oben erwähnt, bereits vor Ende der zweiten Erholungsphase begonnen wurden, bestand genügend Zeit für das Gasgemisch, die erforderliche niedrige Temperatur zu erreichen.

Waren die jeweiligen Versuchsprotokolle beendet, wurde der an der Aufhängung befindliche Aluminiumhalter unter Sichtkontrolle durch das Stereomikroskop mit Hilfe der Mikromanipulatoren vorsichtig bis in die unmittelbare Nähe des kontrahierenden Muskels gebracht. Die Aufzeichnung des Kraftsignals wurde kontinuierlich beobachtet, um Irritationen des Trabekels rechtzeitig zu erkennen. War der Muskel nach Anbringen des Halters weiter stabil, wurde der Reizmodus umgeschaltet: Als Reizelektroden dienten nun einerseits der Aluminiumhalter und andererseits die Aufhängung mit der Platinöse. Dadurch konnte die Perfusionskammer mit den Platinelektroden entfernt werden. Der Muskel zuckte in der kurzen Zeit bis zum Frieren trotzdem weiter und konnte somit bis zum Frieren funktionell überwacht werden.

Mit demselben Programm, mit dem der Versuch am Computer aufgezeichnet wurde, wurde über das Steuermodul nun das Schockgefrieren ausgelöst. Dazu wurde nach Absenken der Perfusionskammer erst das Ventil des horizontalen Kolbens ausgelöst, wodurch der vertikale Kolben mit dem Behälter mit dem flüssigen Propan/Isobutan unter die Messvorrichtung mit dem noch zuckenden Trabekel gebracht wurde. Dann wurde das Ventil des vertikalen Kolbens ausgelöst und der Behälter mit dem Kühlmittel wurde hochgeschossen, sodass die Aufhängungen der Messvorrichtung mitsamt dem Muskel in das flüssige Gas tauchten und der Muskel schockgefroren wurde.

Um alle Muskeln zu demselben definierten Zeitpunkt des Kontraktionszyklus zu gefrieren, musste der vertikale Kolben in Abhängigkeit von dem letzten Reiz gesteuert werden. Das Ventil dieses Kolbens wurde durch Triggersignale gesteuert, die ebenfalls von dem Stimulator erzeugt wurden. Um den gewünschten Zeitpunkt des Gefrierens festlegen zu können, konnte an dem Steuermodul eine Latenzzeit zwischen dem letzten Triggersignal und der Öffnung des Ventils eingestellt werden. Da die spätdiastolischen Ionenkonzentrationen untersucht werden sollten, wurde bei einer Stimulationsfrequenz von 2 Hz der Zeitpunkt des Gefrierens auf 400 ms nach dem letzten Reiz festgelegt. Die Zeitspanne vom Öffnen des Ventils bis zum Kontakt zwischen Kühlmittel und Messvorrichtung wurde mehrfach reproduzierbar mit 100 ms gemessen, somit wurde eine Latenzzeit von 300 ms zwischen Reiz und Ventilöffnung eingestellt.

Abb. 6 zeigt in einer Originalaufzeichnung den in der Diastole gelegenen Kontakt zwischen Kühlmittel und Muskel.

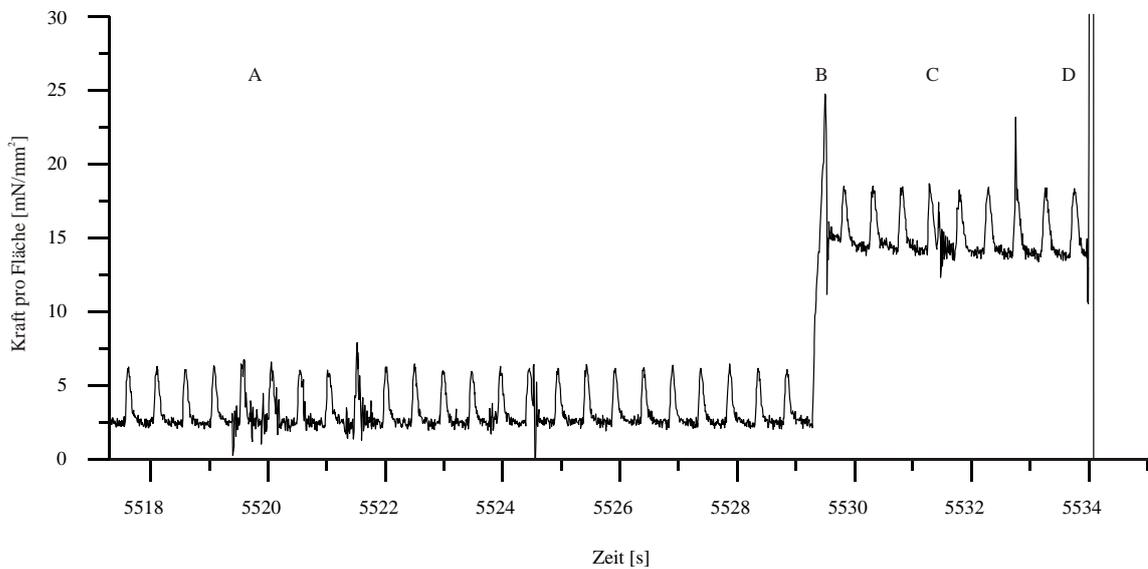


Abb. 6 – Originalaufzeichnung des Moments des Schockgefrierens eines typischen Herzmuskeltrabekels der Stretch-Gruppe. A: Erschütterungen durch das Aufsetzen des Gefäßes mit dem Kühlmittel. B: Durch das Entfernen der Perfusionskammer verursachter Sprung in der diastolischen Kraft. Wie man sieht, hat er keinen Einfluss auf die systolische Kraftentwicklung; er trat bei allen Versuchen auf. C: Erschütterungen durch die Horizontalbewegung des Schlittens. D: Eindeutig in der Diastole gelegener Kontakt des Muskels mit dem Kühlmittel.

Die so am Aluminiumhalter festgefrorenen Muskelproben wurden bis zur Kryoultramikrotomie in LN₂ gelagert.

3.5 Kryoultramikrotomie und Gefriertrocknung

Das Schneiden der gefrorenen Muskeln sowie die weitere Präparation der Kryoschnitte inklusive Gefriertrocknung und Bedampfen mit Kohlenstoff wurde durch die Medizinisch-Technische-Assistentin unseres Labors (Nicole Strätz) durchgeführt.

Zum Schneiden der Proben für die Analyse im Elektronenmikroskop wurden die Halter mit den festgefrorenen Trabekeln unter ständiger Kühlung mit LN₂ in dem Kryoultramikrotom (Reichert F4 Ultracut, früher Fa. Reichert, jetzt Fa. Leica, Wetzlar, Deutschland) montiert und mit Diamantmessern (Fa. Diatome, Biel, Schweiz) geschnitten.

Folgende Parameter wurden beim Schneiden benutzt:

Kammertemperatur: -155°C bis -165°C

Messertemperatur: -140°C bis -145°C

Probentemperatur: -145°C bis -150°C

Eingestellte Schnittdicke: $0,23\ \mu\text{m}$

Schneidegeschwindigkeit: $0,4\ \text{mm/s}$

Die Schnitte wurden auf Kupfernetze gelegt ($\varnothing\ 3,05\ \text{mm}$, 50 mesh entsprechend etwa $0,4\ \text{mm}$ Maschenweite, Fa. Stork, Eerbeek, Niederlande). Zuvor waren die Kupfernetze mit einem dünnen Pioloformfilm (Pioloform FN65, Fa. Wacker-Chemie GmbH, Burghausen, Deutschland) bezogen und mit einer $4\ \text{nm}$ dicken Kohlenstoffschicht bedampft worden. Waren die Netze mit Schnitten voll beladen, wurden sie in einer speziell angefertigten Transportvorrichtung, nach wie vor gekühlt, innerhalb des Mikrotoms gelagert. Auf diese Art wurden pro Muskel etwa 10-15 Netze mit Schnitten belegt. Nach Beendigung des Schneidevorganges wurden die mit Schnitten belegten Netze in der Transportvorrichtung unter ständiger Kühlung mit LN_2 in die Gefrier-trocknungsanlage (MED 020, früher Fa. Bal-Tec, jetzt Balzers AG, Liechtenstein) überführt. Diese war zuvor auf -180°C vorgekühlt worden. Nach Montage der Transportvorrichtung in der Gefriertrocknungsanlage wurde in dieser ein Vakuum von etwa $1 \cdot 10^{-4}\ \text{Pa}$ erzeugt. Bei der nun einsetzenden langsamen Erwärmung auf Zimmertemperatur wurden die Proben durch Sublimation des enthaltenen Wassers gefriergetrocknet. Nach Abschluss der Gefriertrocknung und Erreichen von Zimmertemperatur wurden die Netze mit einer in die Gefriertrocknungsanlage integrierten Bedampfungsanlage (EVM 030, früher Fa. Bal-Tec, jetzt Fa. Balzers AG, Liechtenstein) mit einer etwa $4\ \text{nm}$ starken Kohlenstoffschicht bedampft.

3.6 Elektronenstrahl-Röntgen-Mikroanalyse am Elektronenmikroskop

3.6.1 Prinzip der Elektronenstrahl-Röntgen-Mikroanalyse

Das Prinzip der energiedispersiven Elektronenstrahl-Röntgen-Mikroanalyse (EPMA) beruht auf der Eigenschaft chemischer Elemente, nach Beschuss mit Elektronenstrahlung Energie in Form von elektromagnetischer Strahlung zu emittieren.

Wird ein Atom von energiereichen Elektronen getroffen, gibt es zwei Möglichkeiten der Interaktion (Abb. 7): 1. Trifft das einfallende Elektron auf ein Elektron der inneren K-Schale eines Elementes und schlägt dieses aus seiner Schale, so springt ein Elektron einer äußeren Schale auf dessen Platz. Da sich das äußere Elektron auf einem höheren Energieniveau befindet, wird somit Energie frei, die in Form von Röntgenquanten emittiert wird. Am wahrscheinlichsten ist der Sprung von der L-Schale, es können jedoch auch Sprünge von anderen Schalen stattfinden. Daher enthält die so entstehende Röntgenstrahlung für das entsprechende Element verschiedene Linien im Energiespektrum (K_α -Linie, K_β -Linie, usw.), entsprechend den verschiedenen

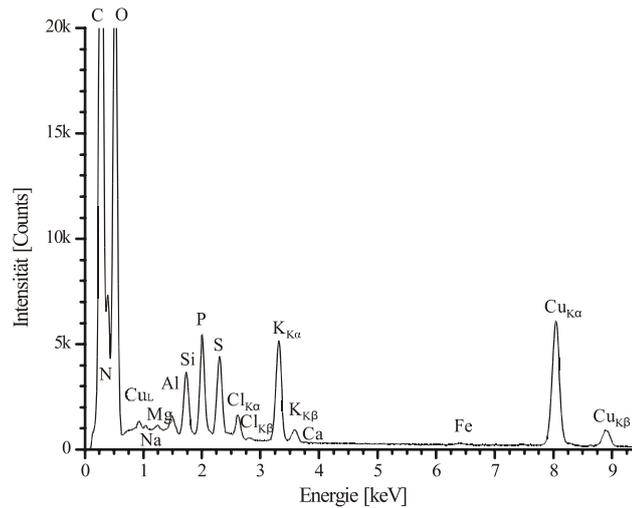


Abb. 8 – Elektronenmikroskopisches Spektrum eines Mitochondriums eines Kardiomyozyts der Ratte. Die Buchstaben bezeichnen jeweils die chemischen Elemente.

Das Spektrum besteht somit aus zwei Komponenten: Zum einen aus elementspezifischen Peaks, die der spezifischen Röntgenstrahlung entsprechen und deren Höhe proportional zur absoluten Anzahl der getroffenen Atome ist, und zum anderen aus einem Hintergrund (Kontinuum), der der unspezifischen Bremsstrahlung entspricht und somit in direkter Beziehung zur Gesamtmasse des analysierten Bereichs der Probe steht.

3.6.2 Das Elektronenmikroskop

Die Proben wurden in einem Philips CM12/STEM Elektronenmikroskop (Fa. Philips, Eindhoven, Niederlande) im Raster-Transmission-Modus analysiert. Als Strahlenquelle diente eine LaB₆-Kathode (Fa. FEI, Eindhoven, Niederlande). In den vorliegenden Untersuchungen betrug der Strahlstrom etwa 4 nA und der Strahldurchmesser 16 nm. Die Messungen erfolgten bei -110°C in einem Kryohalter für tiefe Temperaturen (Cryotransfer System Model 626, Fa. Gatan, München, Deutschland). Dieser wurde mit LN₂ gekühlt und die Temperatur mit dem zugehörigen Temperaturregler (Gatan Model 613-500 cooling holder control, Fa. Gatan, München, Deutschland) reguliert. Zur Detektion der bei der Analyse frei werdenden Röntgenquanten wurde ein energiedispersiver Germanium-Detektor der Firma Oxford Instruments mit einem sehr dünnen Folienfenster (SuperATW) (Link GEM-Detektor, Oxford Instruments, High Wycombe, United Kingdom) verwendet. Zur Datenaufnahme diente ein Analysesystem mit digitalem Signalprozessor (ISIS 300, Oxford Instruments, High Wycombe, United Kingdom). Während der Messung wurden die Proben um 30° gekippt, um das Messvolumen zu optimieren, da bei senkrecht einfallendem Elektronenstrahl kaum Quanten emittiert werden. Auf Grund der niedrigen Kalziumkonzentration in den Proben, wurde eine Messzeit von 1000 s pro Messung

verwendet, da sonst keine ausreichende Menge an emittierten Röntgenquanten erreicht werden konnte.

3.6.3 Die analysierten Kompartimente

Analysiert wurden die Kompartimente zentrales und peripheres Zytosol, zentrale und periphere Mitochondrien, Kern und Kernhülle. Als peripher wurden dabei die Regionen innerhalb von 100 nm unterhalb der Zellmembran betrachtet. Dort und in der Kernhülle sind Messungen besonders schwierig, da hierfür eine exakt senkrechte Lage der Schnitte notwendig ist. Ist dies nicht der Fall, so kann es auf Grund der oben beschriebenen Kippung zu „Verunreinigungen“ der Messung durch benachbart gelegene Bereiche kommen. Dies erklärt die geringere Anzahl von Messungen in diesen Kompartimenten. Dazu kommt bei Schnitten multizellulärer Präparate, dass diese auf Grund ihrer Größe dazu neigen, gewellt zu liegen bzw. sich vom Rand her teilweise aufzurollen. Dies macht es noch mal schwerer, vor allem im peripheren Zytosol, die benötigten senkrechten Schnitte zu finden.

Für die Analyse des Zytosols und des Kerns wurde ein Bereich von etwa $0,5 \mu\text{m} \cdot 0,5 \mu\text{m}$ gewählt, im Zytosol wurde dieser über der A-Bande der Sarkomere platziert. Zur Analyse der Kernhülle wurde ein etwa $500 \text{ nm} \cdot 20 \text{ nm}$ großer Bereich gewählt.

3.6.4 Quantitative Analyse

Die Berechnung der Elementkonzentrationen erfolgte nach der Kontinuummethode nach Hall [48]. Die Höhe der elementspezifischen Peaks ist proportional zur absoluten Anzahl der getroffenen Atome im analysierten Volumen. Das Kontinuum dagegen steht in direkter Beziehung zur Gesamtmasse des analysierten Bereichs. Somit entspricht das Verhältnis aus beiden Anteilen, also Peak/Kontinuum, dem Massenanteil eines Elementes im analysierten Volumen. Zieht man vom Gesamtkontinuum die Anteile ab, die nicht von der Probe stammen, also die Anteile der Netze, des EM usw., kann man unter Verwendung von Standards, die in Ihrer Beschaffenheit den analysierten Proben ähnlich sind, die absoluten Elementkonzentrationen berechnen. Detailliertere Darstellungen sind in [49,50,51] zu finden.

3.6.5 Konzentrationseinheiten, Genauigkeit der Kalziummessung und Auflösung

Im Gegensatz zu fluoreszenzoptischen Verfahren misst die Elektronenstrahl-Röntgen-Mikroanalyse die Gesamtkonzentrationen der Elemente, d.h. die Summe aus gebundenen und freien Anteilen. EPMA misst dabei die Gesamtmenge des Elements pro Trockengewicht, angegeben als mmol pro kg Trockengewicht ($\text{mmol per kg dry weight, mmol} \cdot (\text{kg dw})^{-1}$). Trockengewicht meint hierbei die Masse des analysierten Bereichs nach der Gefriertrocknung unter der Annahme, dass alles Wasser entzogen wurde. Geht man von einer Dichte der Zelle von 1 g/cm^3 aus und kennt man den Wasseranteil vor der Gefriertrocknung, kann man somit $\text{mmol} \cdot (\text{kg dw})^{-1}$ durch Multiplikation mit dem Trockengewichtsanteil in mmol pro Liter des entsprechenden

Kompartiments (mmol/l, mM) umrechnen [30,49,51]. Dies macht einen Vergleich der Konzentrationen der einzelnen Kompartimente untereinander und mit Angaben aus der Literatur möglich. Tabelle 2 zeigt die Umrechnungsfaktoren für die einzelnen Kompartimente.

Tabelle 2 – Umrechnungsfaktoren von $\text{mmol} \cdot (\text{kg dw})^{-1}$ in mM für die einzelnen Zellkompartimente.

Zellkompartiment	Umrechnungsfaktor
Zytosol	0,227
Mitochondrien	0,556
Zellkern	0,149
Kernhülle	0,5

Bei der Genauigkeit der Kalziummessungen ergibt sich bei den vorliegenden Anzahlen der Einzelmessungen ein minimal nachweisbarer statistisch signifikanter Unterschied von 0,5-0,8 $\text{mmol} \cdot (\text{kg dw})^{-1}$. Die Tatsache, dass bei einer sehr homogenen Kalziumkonzentration innerhalb einer Population von Organellen dieser Unterschied auf 0,2 $\text{mmol} \cdot (\text{kg dw})^{-1}$ fällt [49] zeigt, dass bei niedrigen Konzentrationen mehr die biologische Variabilität als die Messgenauigkeit des Messsystems der limitierende Faktor für die Genauigkeit der Messungen ist.

Die für die Messung notwendige Auflösung wird vor allem durch die Dicke der Kryoschnitte von 25-60 nm begrenzt. So können Strukturen mit einem Durchmesser kleiner als die Schnitt-dicke (z.B. Membranvesikel) nur schwer dargestellt werden. Dünnere Schnitte sind jedoch nicht zu verwenden, da die Anzahl der emittierten Röntgenquanten zu klein wäre. Für die in der vorliegenden Arbeit primär zu diskutierenden Kompartimente Zytosol, Kern und Kernhülle ergeben sich jedoch keine durch die Schnitt-dicke bedingten Grenzen der Auflösung.

3.7 Datenerfassung und statistische Auswertung

Die Signale des Kraftaufnehmers wurden über den Brückenverstärker auf einen PC übertragen. Mit einem in unserem Institut zu diesem Zweck geschriebenen Programm wurden die Signale alle 8 ms eingelesen, graphisch dargestellt und zur späteren Auswertung abgespeichert. Durch Eingabe von Dicke und Breite des Trabekels wurden die Signale in Kraft pro Fläche umgerechnet unter Annahme eines ovalen Querschnitts der Muskeln. Die Auswertung erfolgte mittels eines passenden, ebenfalls in unserem Institut geschriebenen Programms. Die genannten Programme waren in der Programmiersprache Delphi geschrieben. Die statistische und graphische Verarbeitung der Kraftwerte erfolgte in Origin 6.1.

Die quantitativen Messungen der Röntgen-Mikroanalyse wurden mit dem zum Analysesystem gehörenden Link ISIS-300 Programm von Oxford Instruments und einem in unserem Institut erstellten Programm (MSQuant) eingelesen und verarbeitet [49,52].

Die statistische Auswertung der quantitativen Daten erfolgte mit dem SAS Statistik Packet (SAS Inst., North Carolina, USA). Um Konzentrationsunterschiede auf Grund von Zell-zu-Zell und Tier-zu-Tier Varianz zu beachten, wurde eine ANOVA-Varianzanalyse mit einem generellen linearen Model für unbalancierte ANOVA durchgeführt. Erwies sich der global F-Test als statistisch signifikant mit $p < 0,05$, wurden Unterschiede zwischen einzelnen Gruppen durch paarweisen Vergleich mit dem Tukey-Kramer-Test überprüft. Generell wurde ein $p < 0,05$ als statistisch signifikant angenommen.

Angegeben wurden jeweils Mittelwert \pm Standardfehler (Standard Error, SE).

4 ERGEBNISSE

Analysiert wurden sieben Herzmuskeltrabekel in der Kontrollgruppe und sechs Herzmuskeltrabekel in der Stretch-Gruppe.

4.1 Abmessungen der Muskeln

Tabelle 3 zeigt die Mittelwerte für Dicke und Breite der Querschnittsfläche, Ausgangslänge (L_{slack}) und L_{max} der Muskeln der Kontroll- und der Stretch-Gruppe.

Tabelle 3 – Abmessungen der Muskeln. Angegeben sind jeweils Mittelwert \pm SE.

Gruppe	Dicke [μm]	Breite [μm]	L_{slack} [mm]	L_{max} [mm]
Kontrolle	164,20 \pm 14,30	292,86 \pm 46,84	2,57 \pm 0,37	3,49 \pm 0,40
Stretch	133,33 \pm 10,54	216,67 \pm 27,89	2,00 \pm 0,15	2,73 \pm 0,19

Die Unterschiede in Dicke und Breite und L_{slack} der Gruppen sind statistisch nicht signifikant. Daher ist davon auszugehen, dass diese Unterschiede keinen Einfluss auf die Unterschiede der Elementgehalte der jeweiligen Gruppen haben. Im Mittel bedeutete die Dehnung auf L_{max} eine Längenzunahme des Muskels um 39,75% gegenüber L_{slack} in der Kontroll-Gruppe und eine Zunahme um 36,89% in der Stretch-Gruppe. Auch wenn in Tabelle 3 Unterschiede der Mittelwerte von L_{max} zu sehen sind, so sind diese nicht statistisch signifikant. Auch die prozentuale Längenzunahme war nicht signifikant unterschiedlich zwischen den beiden Gruppen.

4.2 Muskelmechanische Experimente

Während der Versuchsprotokolle wurden das Verhalten der isometrischen Kraftentwicklung unter Veränderung der Vorlast und das kontraktile Verhalten der Muskeln in oben beschriebenen Kontraktilitätstests untersucht und beurteilt.

Durch Erreichen der maximalen isometrischen Kraftentwicklung und damit von L_{max} wurde der Endpunkt des Dehnungsvorganges definiert, sodass die beiden funktionellen Zustände L_{max} und 85% von L_{max} beurteilt werden konnten. Abb. 9 zeigt die isometrische Kraftentwicklung bei 85% von L_{max} und bei L_{max} für die Kontroll- und die Stretch-Gruppe.

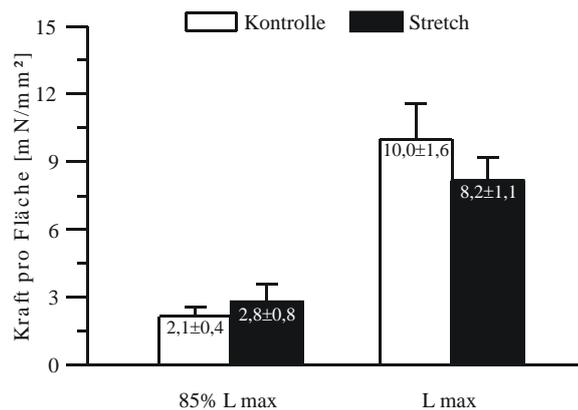


Abb. 9 – Kraftentwicklung bei 85% von L_{\max} und bei L_{\max} in der Kontroll- und in der Stretch-Gruppe. Angegeben sind jeweils Mittelwert \pm SE.

Wie man sieht, war die Kraftentwicklung in den beiden Gruppen jeweils annähernd gleich, der Unterschied erwies sich als statistisch nicht signifikant. Ebenfalls ist die deutlich höhere Kraftentwicklung bei L_{\max} zu erkennen.

Bei der Auswertung von FFR wurde die Kraftentwicklung bei der jeweiligen Testfrequenz (1-6 Hz) ins Verhältnis zu der Kraftentwicklung bei der Grundstimulationsfrequenz von 2 Hz gesetzt. Die Kraft wurde jeweils über zehn Kontraktionen gemittelt. Bei der Auswertung von PRP wurde die Kraftentwicklung der ersten Kontraktion nach der Reizpause ins Verhältnis zu der Kraftentwicklung vor der Reizpause gesetzt, diese wurde ebenfalls über zehn Schläge gemittelt. Abb. 10 zeigt die Ergebnisse der jeweiligen Protokolle. Auch wenn die Graphen erkennbare Unterschiede zeigen, so sind diese jedoch nicht statistisch signifikant. Die Unterschiede sind am ehesten durch die relativ geringe Anzahl an Muskeln bedingt mit z.T. recht hohen interindividuellen Unterschieden.

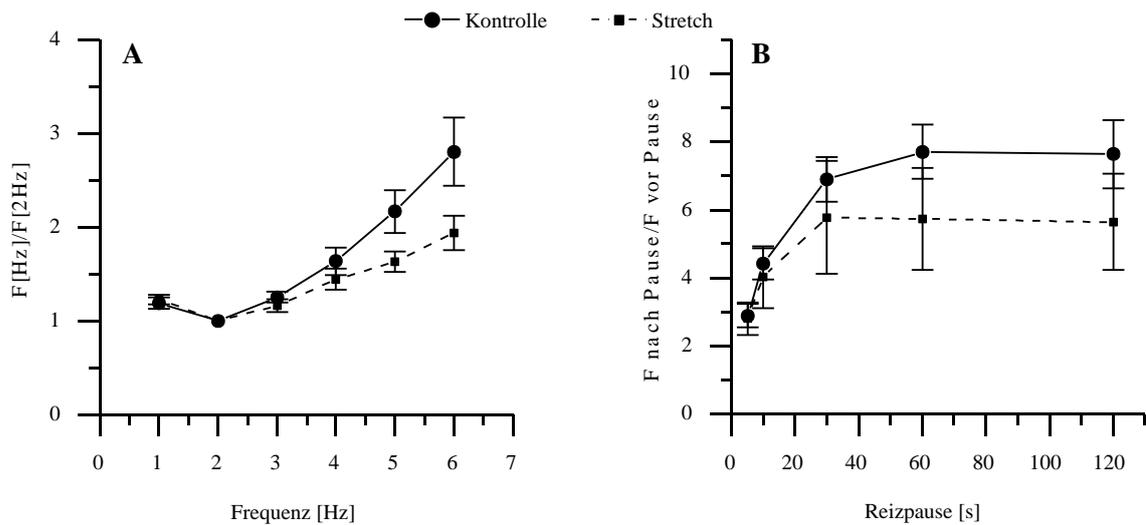


Abb. 10 – Ergebnisse von FFR (A) und PRP (B) für die Kontroll- und für die Stretch-Gruppe. Angegeben sind jeweils die Vielfachen der Kraftentwicklung im Vergleich zur Kraftentwicklung bei der Grundfrequenz von 2 Hz (A) bzw. zur Kraftentwicklung vor der Reizpause (B), Mittelwert \pm SE.

Zusammenfassend lassen die Ergebnisse der Kraftentwicklung und der Kontraktilitätstests erkennen, dass die Muskeln ein regelgerechtes und in beiden Gruppen vergleichbares Verhalten zeigten. Somit lässt sich schlussfolgern, dass die Muskeln funktionell zufriedenstellend waren und es zwischen den beiden Gruppen keine Unterschiede gab, die eventuelle Unterschiede in der Elementverteilung beeinflussen könnten.

4.3 Morphologie und Strukturhaltung der Kryoschnitte

Für die Analyse der Elementkonzentrationen in den Kryoschnitten ist es notwendig, dass beim Schockgefrieren das enthaltene Zellwasser so schnell gefriert, dass keine größeren Eiskristalle entstehen, die die Morphologie der Muskeln zerstören. In Abb. 11 ist die gut erhaltene Morphologie der Zellen zu erkennen.

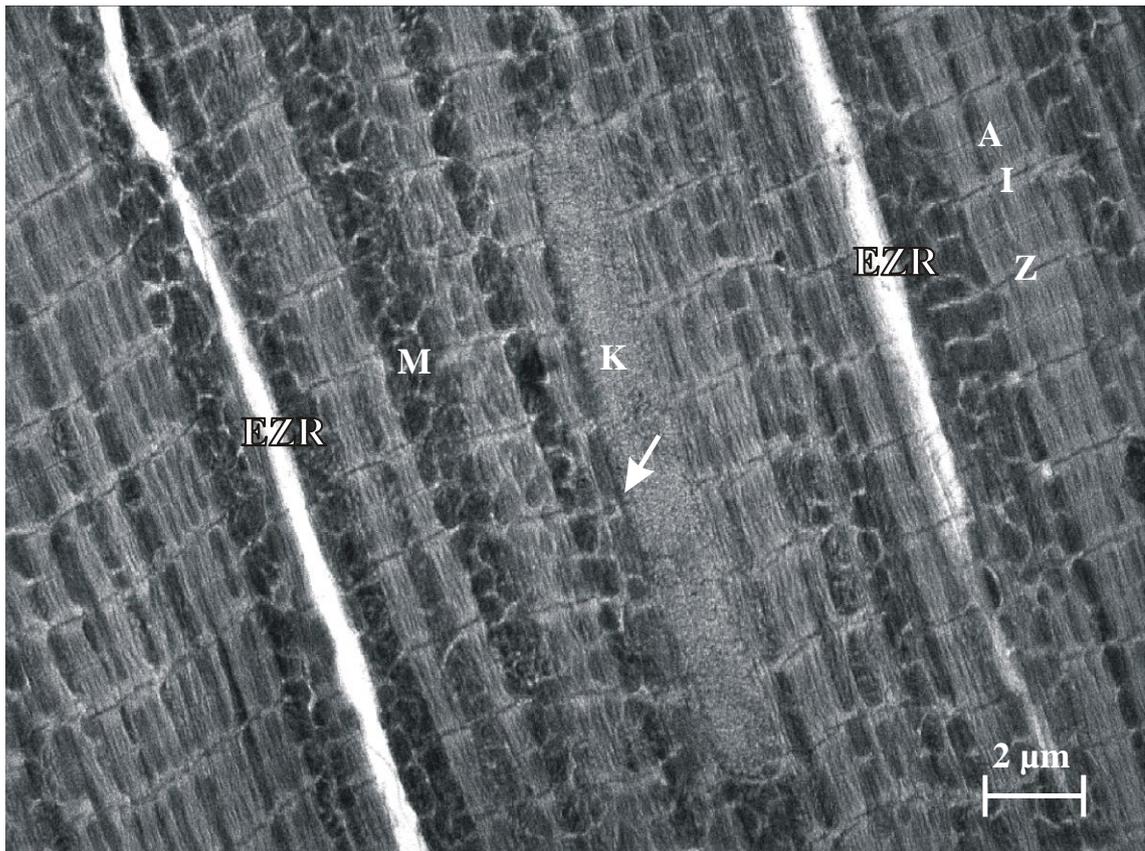


Abb. 11 – EM-Bild von drei längsgeschnittenen Zellen eines bei 85% von L_{\max} gefrorenen Trabekels. K: Zellkern, M: Mitochondrien, EZR: Extrazellulärraum, Z: Z-Streifen, I: I-Bande, A: A-Bande mit gut zu erkennender M-Linie, der Pfeil zeigt die Kernhülle.

In den nicht zusätzlich kontrastierten Schnitten sind alle Zellkompartimente gut abgrenzbar und die Sarkomere mit ihren verschiedenen Banden gut zu erkennen. Sie liegen zum übergroßen Teil in einer Linie, sodass von einer strukturellen Schädigung während des Versuches oder während des Frierens nicht auszugehen ist. Der Eigenkontrast entsteht bei der Gefrietrocknung durch den ursprünglich unterschiedlichen Wassergehalt der Zellkompartimente im hydrierten Zustand.

Ebenfalls in den Kryoschnitten wurde der Effekt der Dehnung auf die Sarkomerlänge beurteilt. Abb. 12 zeigt im Vergleich Ausschnitte eines Trabekels der Kontroll-Gruppe (A) und der Stretch-Gruppe (B) bei gleicher Vergrößerung. In beiden Fällen ist die A-Bande mit $1,6 \mu\text{m}$ gleich lang. Deutlich zu erkennen sind jedoch die größere Sarkomerlänge und die breitere I-Bande des bei L_{\max} gefrorenen Muskels. In vorliegendem Fall beträgt die Sarkomerlänge $1,9 \mu\text{m}$ in (A) und $1,98 \mu\text{m}$ in (B), die Breite der I-Bande beträgt $0,63 \mu\text{m}$ in (A) und $0,74 \mu\text{m}$ in (B). Somit ist die Sarkomerlänge des bei 85% von L_{\max} gefrorenen Muskels in vorliegendem Beispiel etwa 5% kürzer als die des bei L_{\max} gefrorenen Muskels.

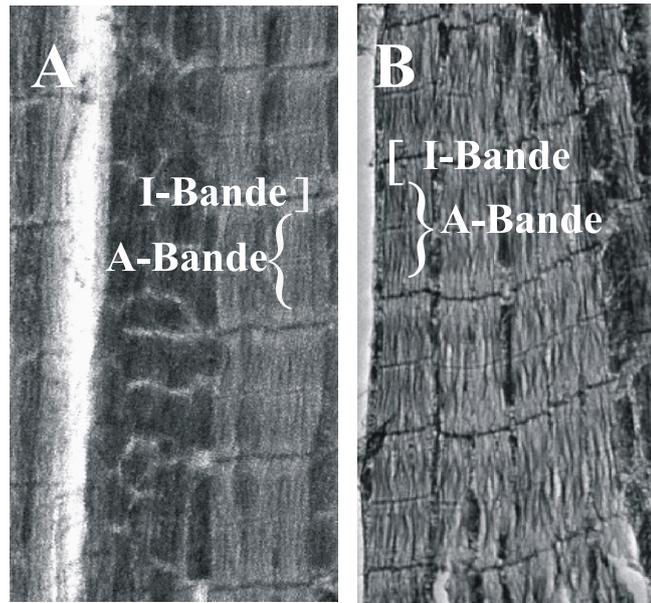


Abb. 12 – Längsschnitte eines bei 85% von L_{\max} gefrorenen Muskels der Kontroll-Gruppe (A) und eines bei L_{\max} gefrorenen Muskels der Stretch-Gruppe (B) bei gleicher Vergrößerung.

Die offensichtliche Diskrepanz zwischen den um 5% kürzeren Sarkomeren im Gegensatz zu den um 15% kürzeren vollständigen Trabekeln lässt sich dadurch erklären, dass in den Trabekeln auch nicht-muskuläre dehnbare Strukturen wie zum Beispiel bindegewebige Anteile vorkommen.

4.4 Ergebnisse der Röntgen-Mikroanalyse

Tabelle 4 zeigt beispielhaft für das zentrale Zytosol die diastolischen Gesamtkonzentrationen von Natrium, Magnesium, Phosphor, Schwefel, Chlor, Kalium und Kalzium der Trabekel der Kontroll- und der Stretch-Gruppe. Man sieht den signifikanten Anstieg von $[Na_{ges}]_{i-dia}$ und $[Cl_{ges}]_{i-dia}$ und den damit einhergehenden Abfall von $[K_{ges}]_{i-dia}$ unter Dehnung mit $p < 0,001$.

Tabelle 4 – Totale diastolische Elementkonzentrationen in Trabekeln der Kontroll- und der Stretch-Gruppe im zentralen Zytosol in $mmol \cdot (kg\ dw)^{-1}$ und in mM. Angegeben sind Mittelwert \pm SE. N: Anzahl der Messungen. * $p < 0,001$.

	Kontrolle (n=17)		Stretch (n=27)	
	$mmol \cdot (kg\ dw)^{-1}$	mM	$mmol \cdot (kg\ dw)^{-1}$	mM
Na	77,78 \pm 4,99	17,68 \pm 1,13	111,18 \pm 7,91*	25,27 \pm 1,80
Mg	74,32 \pm 3,33	16,89 \pm 0,76	74,22 \pm 2,60	16,87 \pm 0,59
P	294,94 \pm 12,40	67,03 \pm 2,82	274,71 \pm 16,05	62,43 \pm 3,65
S	259,53 \pm 17,58	58,98 \pm 4,00	256,87 \pm 16,57	58,38 \pm 3,77
Cl	145,84 \pm 6,15	33,15 \pm 1,40	166,89 \pm 4,40*	37,93 \pm 1,00
K	613,15 \pm 13,62	139,35 \pm 3,10	537,68 \pm 17,83*	122,20 \pm 4,05
Ca	1,64 \pm 0,41	0,37 \pm 0,09	2,49 \pm 0,50	0,57 \pm 0,11

4.4.1 Dehnungsinduzierte Veränderungen der $[Na_{ges}]_{i-dia}$

Um zunächst den Einfluss von Dehnung auf den Natriumgehalt der gesamten Zelle darzustellen, zeigt Abb. 13 die Häufigkeitsverteilung der $[Na_{ges}]_{i-dia}$ sämtlicher Messungen in allen o.g. Kompartimenten d.h. global für die gesamte Zelle.

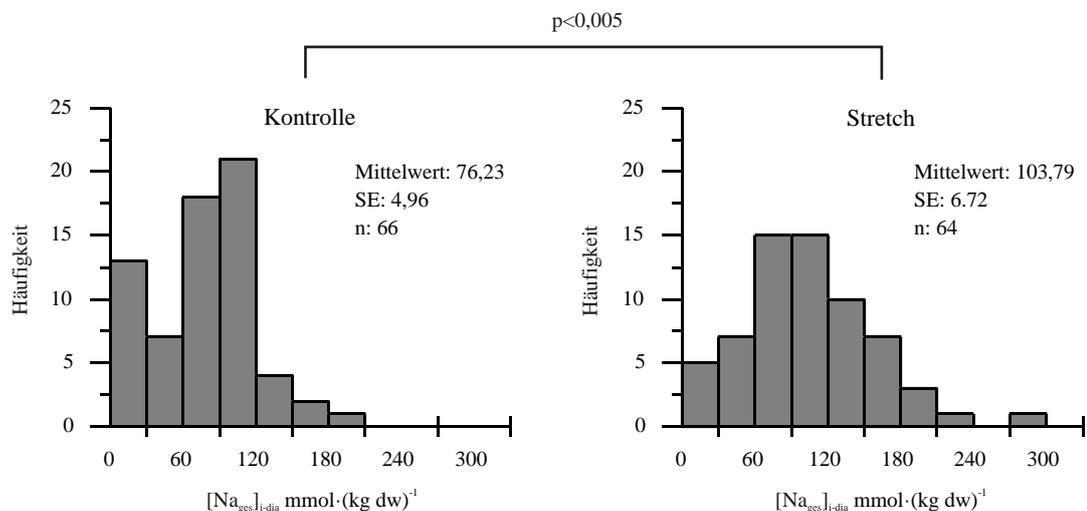


Abb. 13 – Häufigkeitsverteilung der $[Na_{ges}]_{i-dia}$ aller Messungen in Trabekeln der Kontroll- und der Stretch-Gruppe. N: Anzahl der Messungen.

Man erkennt, dass höhere Natriumkonzentrationen in gedehnten Muskeln häufiger sind. Ebenso sieht man den Anstieg der mittleren Gesamtnatriumkonzentration von $76,23 \text{ mmol} \cdot (\text{kg dw})^{-1}$ in der Kontroll-Gruppe auf $103,79 \text{ mmol} \cdot (\text{kg dw})^{-1}$ in der Stretch-Gruppe, der Unterschied erwies sich als statistisch signifikant mit $p < 0,005$. Somit bewirkt Dehnung einen signifikanten Anstieg der globalen zellulären Natriumkonzentration.

In Tabelle 5 sind die mittleren diastolischen Gesamtkonzentrationen von Natrium der Trabekel der Kontroll- und der Stretch-Gruppe getrennt nach den einzelnen Zellkompartimenten dargestellt.

Tabelle 5 – $[\text{Na}_{\text{ges}}]_{\text{i-dia}}$ in den einzelnen Kompartimenten der Trabekel der Kontroll- und der Stretch-Gruppe in $\text{mmol} \cdot (\text{kg dw})^{-1}$ und in mM. Angegeben sind Mittelwert \pm SE. N: Anzahl der Messungen. * $p < 0,001$.

	Kontrolle			Stretch		
	n	$\text{mmol} \cdot (\text{kg dw})^{-1}$	mM	n	$\text{mmol} \cdot (\text{kg dw})^{-1}$	mM
Peripheres Zytosol	5	$141,75 \pm 20,72$	$32,22 \pm 4,71$	4	$182,95 \pm 48,37$	$41,58 \pm 10,99$
Zentrales Zytosol	17	$77,78 \pm 4,99$	$17,68 \pm 1,13$	27	$111,18 \pm 7,91^*$	$25,27 \pm 1,80$
Kern	15	$102,80 \pm 5,69$	$15,34 \pm 0,85$	16	$123,37 \pm 8,27^*$	$18,41 \pm 1,23$
Kernhülle	8	$83,33 \pm 4,84$	$41,66 \pm 2,42$	7	$80,79 \pm 9,14$	$40,40 \pm 4,57$
Periphere Mitochondrien	3	$93,82 \pm 31,36$	$52,12 \pm 17,42$	1	19,82	11,01
Zentrale Mitochondrien	18	$28,36 \pm 2,45$	$15,76 \pm 1,36$	9	$38,93 \pm 11,08$	$21,63 \pm 5,54$

Man sieht den statistisch signifikanten Anstieg der $[\text{Na}_{\text{ges}}]_{\text{i-dia}}$ im zentralen Zytosol und im Kern mit $p < 0,001$.

Zur besseren Veranschaulichung sind in Abb. 14 die $[\text{Na}_{\text{ges}}]_{\text{i-dia}}$ in den für die Diskussion besonders wichtigen Kompartimenten zentrales Zytosol, Kern und Kernhülle der Herzmuskeltrabekel dargestellt und zusätzlich sind im direkten Vergleich in unserer Arbeitsgruppe erhobene Daten von isolierten Kardiomyozyten dargestellt (Daten der Myozyten und Versuchsprotokolle siehe [53]).

□ Kontrolle ■ Stretch * p<0,05 ** p<0,01 *** p<0,001

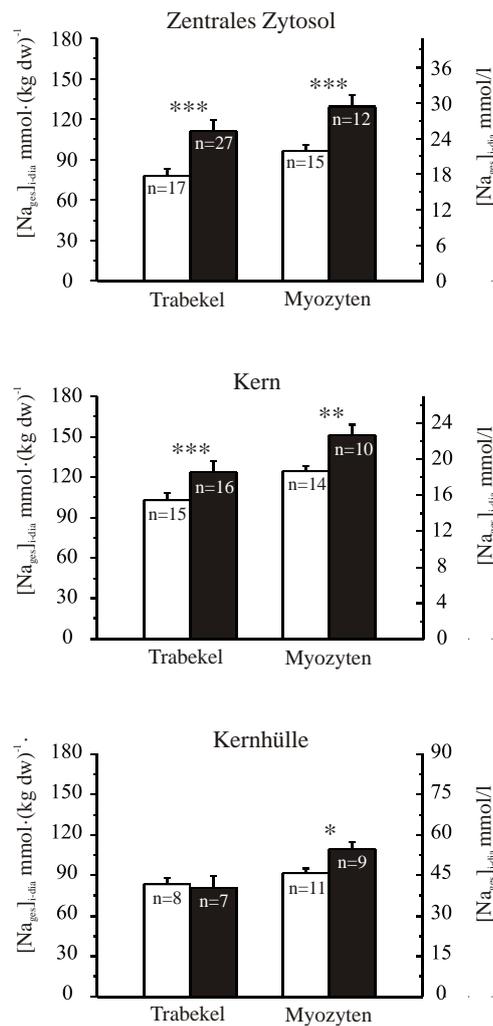


Abb. 14 – $[Na_{ges}]_{i-dia}$ in Trabekeln und isolierten Myozyten der Kontroll- und der Stretch-Gruppe in zentralem Zytosol, Kern und Kernhülle. Angegeben sind jeweils Mittelwert \pm SE. N: Anzahl der Messungen.

Dehnung bewirkte sowohl in Trabekeln als auch in Einzelmyozyten einen statistisch signifikanten Anstieg der $[Na_{ges}]_{i-dia}$ im zentralen Zytosol und im Zellkern.

Im zentralen Zytosol von Trabekeln betrug der Anstieg 43% (von $77,78 \pm 4,99$ auf $111,18 \pm 7,91$ $mmol \cdot (kg dw)^{-1}$), $p < 0,001$, im zentralen Zytosol von Einzelmyozyten 34% (von $96,39 \pm 4,22$ auf $129,17 \pm 8,83$ $mmol \cdot (kg dw)^{-1}$), $p < 0,001$.

Im Kern von Trabekeln betrug der Anstieg 20% (von $102,80 \pm 5,69$ auf $123,37 \pm 8,27$ $mmol \cdot (kg dw)^{-1}$), $p < 0,001$, im Kern von Einzelmyozyten 21% (von $124,37 \pm 3,85$ auf $150,89 \pm 8,31$ $mmol \cdot (kg dw)^{-1}$), $p < 0,01$.

In der Kernhülle war in den Trabekeln unter Dehnung kein Anstieg der $[Na_{ges}]_{i-dia}$ zu beobachten. Demgegenüber betrug jedoch in Einzelmyozyten der Anstieg 20% (von $91,57 \pm 3,82$ auf $109,43 \pm 5,67$ $mmol \cdot (kg dw)^{-1}$), $p < 0,05$.

Im peripheren Zytosol ergab sich sowohl in Trabekeln als auch in Einzelmyozyten ein nicht signifikanter Anstieg der $[Na_{ges}]_{i-dia}$: Von $141,75 \pm 20,72$ $mmol \cdot (kg dw)^{-1}$ ($n=5$) auf $182,95 \pm 48,37$ $mmol \cdot (kg dw)^{-1}$ ($n=4$) in Trabekeln und von $155,54 \pm 12,88$ $mmol \cdot (kg dw)^{-1}$ ($n=13$) auf $232,21 \pm 31,49$ $mmol \cdot (kg dw)^{-1}$ ($n=10$) in Einzelmyozyten.

4.4.2 Dehnungsinduzierte Veränderungen der $[Ca_{ges}]_{i-dia}$

Um zunächst den Einfluss von Dehnung auf den Kalziumgehalt der gesamten Zelle darzustellen, zeigt Abb. 15 die Häufigkeitsverteilung der $[Ca_{ges}]_{i-dia}$ sämtlicher Messungen in allen o.g. Kompartimenten d.h. global für die gesamte Zelle.

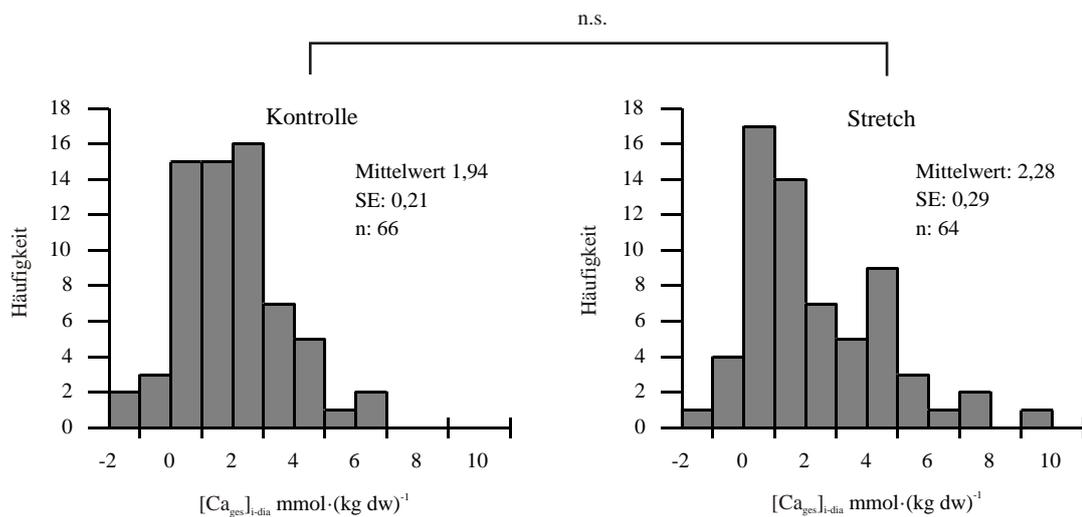


Abb. 15 – Häufigkeitsverteilung der $[Ca_{ges}]_{i-dia}$ aller Messungen in Trabekeln der Kontroll- und der Stretch-Gruppe. N: Anzahl der Messungen.

Auch wenn man sieht, dass höhere Kalziumkonzentrationen in der Stretch-Gruppe tendenziell häufiger sind und die mittlere Gesamtkalziumkonzentration mit $2,28 \pm 2,33$ $mmol \cdot (kg dw)^{-1}$ gegenüber $1,94 \pm 1,68$ $mmol \cdot (kg dw)^{-1}$ in der Kontroll-Gruppe erhöht ist, so erwies sich dieser Unterschied als statistisch nicht signifikant.

In Tabelle 6 sind die mittleren diastolischen Gesamtkonzentrationen von Kalzium der Trabekel der Kontroll- und der Stretch-Gruppe getrennt nach den einzelnen Zellkompartimenten dargestellt.

Tabelle 6 – $[Ca_{ges}]_{i-dia}$ in den einzelnen Kompartimenten der Trabekel der Kontroll- und der Stretch-Gruppe in $mmol \cdot (kg\ dw)^{-1}$ und in mM. Angegeben sind Mittelwert \pm SE. N: Anzahl der Messungen.

	Kontrolle			Stretch		
	n	$mmol \cdot (kg\ dw)^{-1}$	mM	n	$mmol \cdot (kg\ dw)^{-1}$	mM
Peripheres Zytosol	5	4,06 \pm 0,88	0,92 \pm 0,20	4	4,66 \pm 1,89	1,06 \pm 0,43
Zentrales Zytosol	17	1,64 \pm 0,41	0,37 \pm 0,09	27	2,49 \pm 0,50	0,57 \pm 0,11
Kern	15	2,75 \pm 0,36	0,41 \pm 0,05	16	2,63 \pm 0,41	0,39 \pm 0,06
Kernhülle	8	2,02 \pm 0,60	1,01 \pm 0,30	7	1,24 \pm 0,34	0,62 \pm 0,17
Periphere Mitochondrien	3	0,71 \pm 1,03	0,39 \pm 0,57	1	0,35	0,19
Zentrale Mitochondrien	18	1,12 \pm 0,26	0,62 \pm 0,14	9	0,97 \pm 0,55	0,54 \pm 0,31

Statistisch signifikante Unterschiede konnten nicht gemessen werden.

Zur besseren Veranschaulichung sind in Abb. 16 die $[Ca_{ges}]_{i-dia}$ in den für die Diskussion besonders wichtigen Kompartimenten zentrales Zytosol, Kern und Kernhülle der Herzmuskeltrabekel dargestellt und zusätzlich sind im direkten Vergleich in unserer Arbeitsgruppe erhobene Daten von isolierten Kardiomyozyten dargestellt (Daten der Myozyten und Versuchsprotokolle siehe [53]).

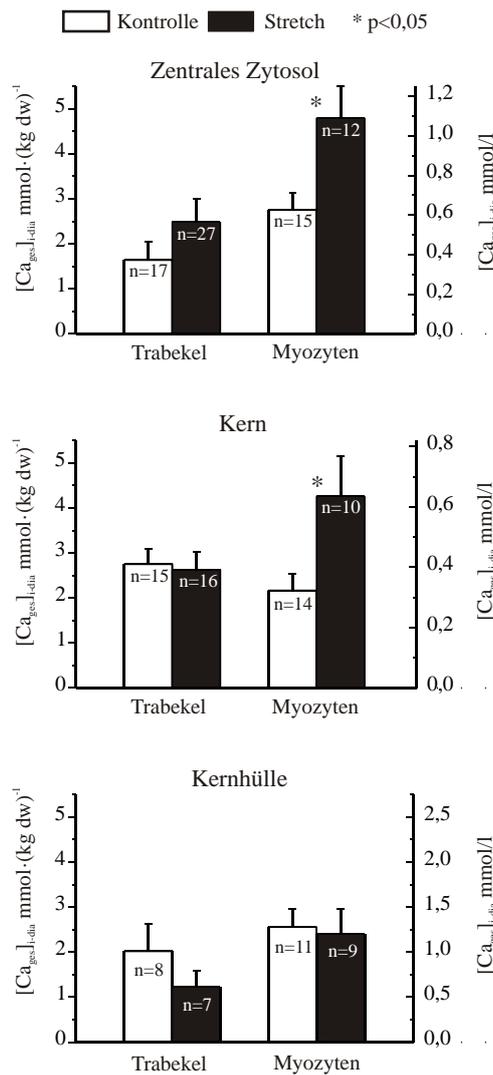


Abb. 16 – $[\text{Ca}_{\text{ges}}]_{\text{i-dia}}$ in Trabekeln und isolierten Myozyten der Kontroll- und der Stretch-Gruppe in zentralem Zytosol, Kern und Kernhülle. Angegeben sind jeweils Mittelwert \pm SE. N: Anzahl der Messungen

In Gegensatz zu Trabekeln bewirkte die Dehnung in Einzelmyozyten einen statistisch signifikanten Anstieg der $[\text{Ca}_{\text{ges}}]_{\text{i-dia}}$ im zentralen Zytosol und im Kern.

Im zentralen Zytosol betrug dieser Anstieg 75% (von $2,75 \pm 0,39$ auf $4,81 \pm 0,72 \text{ mmol} \cdot (\text{kg dw})^{-1}$), $p < 0,05$. Der Anstieg um 51% (von $1,64 \pm 0,41$ auf $2,49 \pm 0,50 \text{ mmol} \cdot (\text{kg dw})^{-1}$) in Trabekeln war statistisch nicht signifikant auf dem Signifikanzniveau von 5% ($p < 0,15$).

Im Kern betrug der Anstieg in Myozyten 96% (von $2,17 \pm 0,37$ auf $4,26 \pm 0,89 \text{ mmol} \cdot (\text{kg dw})^{-1}$), $p < 0,05$. In Trabekeln blieb ein Anstieg der $[\text{Ca}_{\text{ges}}]_{\text{i-dia}}$ im Kern aus.

Weder in Trabekeln noch in Einzelmyozyten konnte Dehnung einen signifikanten Anstieg der $[\text{Ca}_{\text{ges}}]_{\text{i-dia}}$ in der Kernhülle bewirken.

Im peripheren Zytosol ergab sich sowohl in Trabekeln als auch in Einzelmyozyten ein geringer, nicht signifikanter Anstieg der $[Ca_{ges}]_{i-dia}$. Sie erhöhte sich von $4,06 \pm 0,88 \text{ mmol} \cdot (\text{kg dw})^{-1}$ (n=5) auf $4,66 \pm 1,89 \text{ mmol} \cdot (\text{kg dw})^{-1}$ (n=4) in Trabekeln und von $4,15 \pm 0,55 \text{ mmol} \cdot (\text{kg dw})^{-1}$ (n=13) auf $4,79 \pm 0,85 \text{ mmol} \cdot (\text{kg dw})^{-1}$ (n=10) in Einzelmyozyten.

5 DISKUSSION

5.1 Die Methodik

5.1.1 Das Versuchsmodell der Herzmuskeltrabekel

Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Versuchsmodell der End-zu-End-Dehnung von Herzmuskeltrabekeln ist ein gut etabliertes, in z.T. unterschiedlichen Varianten vielfältig eingesetztes Modell zur Untersuchung von dehnungsinduzierten Veränderungen in Herzmuskelzellen bzw. in Herzmuskelgewebe (für Beispiele siehe [15,31,32,33]). Da jedoch alle Versuchsmodelle die Bedingungen in situ immer nur zu einem gewissen Maß widerspiegeln, muss man sich während der Arbeit immer der Einschränkungen des jeweiligen Modells bewusst sein.

In den vorliegenden Versuchen wurde die Vordehnung der Trabekel erhöht, das entspricht einer Erhöhung der Vorlast in situ, und das Verhalten während isometrischen Kontraktionen untersucht, was am ehesten den isovolumentrischen Kontraktionen während der Anspannungsphase des Kontraktionszyklus des schlagenden Herzens entspricht. Damit ergeben sich deutliche Unterschiede zu der Situation am intakten kontrahierenden Herzen. Im physiologischen Arbeitsdiagramm des Herzens durchläuft der Kontraktionszyklus hintereinander zunächst eine isovolumentrische und dann eine auxotonische Phase, während der sich die Spannung der Muskulatur und das Volumen gleichzeitig ändern, gefolgt von der diastolischen Erschlaffung (siehe Lehrbücher der Physiologie, z.B. [54]). Weder die von uns durchgeführten Versuche mit isometrischen Kontraktionen noch Versuche mit isotonischen Kontraktionen, wie sie von anderen Arbeitsgruppen durchgeführt werden [55], spiegeln die Situation am intakten schlagenden Herzen exakt wider. Das vorliegende Modell gibt jedoch eine Phase des Kontraktionszyklus gut wider. Ein zweiter zu diskutierender Punkt ist die angewendete Art der Dehnung. Zu unterscheiden ist dabei eine kurzzeitige Erhöhung der Vordehnung, also akute Vorlasterhöhung am schlagenden Herzen, von länger dauernder Dehnung, die am ehesten chronischer Dehnung bzw. Dilatation des Herzens entspricht. Somit ist klar, dass unsere kurzzeitige Dehnung eher die Akutsituation widerspiegelt, wohingegen zur Untersuchung chronischer Veränderungen, z.B. Transkriptionsänderung oder Apoptose, Modelle herangezogen werden müssen, bei denen eine länger andauernde Dehnung durchgeführt wird, damit die entsprechenden Veränderungen eintreten und messbar werden (z.B. [56,57]). In beiden Situationen ist jedoch Dehnung der initiale Reiz für die Veränderungen. So kann auch die Untersuchung von Prozessen während kurzzeitiger Dehnung wichtige Informationen über Vorgänge liefern, die letztlich zu chronischen Veränderungen führen.

5.1.2 Messung der Elementkonzentrationen mittels Elektronenstrahl-Röntgen-Mikroanalyse

Durch die hohe räumliche Auflösung der EPMA lassen sich auch Elementkonzentrationen in subzellulären Kompartimenten messen. So ist es möglich, Veränderungen in den verschiedenen Zellkompartimenten getrennt zu untersuchen und miteinander zu vergleichen. Zum Zeitpunkt des Schockgefrierens werden jedoch alle Vorgänge in der Zelle unterbrochen, sodass dynamische Untersuchungen nicht möglich sind. Auf Grund der Möglichkeit in den einzelnen Kompartimenten präzise zu messen, wurde jedoch in der vorliegenden Arbeit diese Einschränkung in Kauf genommen.

Im Gegensatz zu fluoreszenzoptischen Verfahren, die die Konzentrationen freier Ionen messen, misst EPMA die Gesamtkonzentration von Elementen, das heißt die Summe aus freien und gebundenen Anteilen.

Natrium liegt in Zellen zum größten Teil in Form freier Ionen vor, somit ist es nachvollziehbar, dass die von uns gemessenen Konzentrationen mit den durch andere Methoden gemessenen Aktivitäten freier Natriumionen vergleichbar sind (Zusammenfassung siehe [58]).

Intrazelluläres Kalzium hat ein anderes Verhältnis des freien zum gebundenen Anteil. Der größte Teil liegt in gebundener Form vor, ca. im Verhältnis 1000:1 gegenüber den freien Anteilen [59]. Seine Funktion übt Kalzium wiederum durch eben diese Bindung an Liganden wie Troponin C [58], Calmodulin [43] oder Calcineurin [42] aus. Somit liefert die Messung der totalen Kalziumkonzentration, also der Summe aus freiem und gebundenem Kalzium, wertvolle Informationen zusätzlich zu Daten aus fluoreszenzoptischen Messungen.

5.2 Dehnungsinduzierte Veränderungen der $[Na_{ges}]_{i-dia}$ und $[Ca_{ges}]_{i-dia}$ in Kompartimenten von Herzmuskeltrabekeln und isolierten Kardiomyozyten

5.2.1 Dehnung bewirkt einen Anstieg der $[Na_{ges}]_{i-dia}$ in Herzmuskeltrabekeln und isolierten Kardiomyozyten

Wie oben beschrieben, bewirkte Dehnung einen signifikanten Anstieg der $[Na_{ges}]_{i-dia}$ im zentralen Zytosol und im Zellkern sowohl der Trabekeln als auch der isolierten Kardiomyozyten, das Ausmaß des Anstiegs war vergleichbar bei Trabekeln und isolierten Kardiomyozyten (Tabelle 5, Abb. 14, S. 32 ff). Somit ist erkennbar, dass die beiden unterschiedlichen Dehnungsprotokolle einen vergleichbaren Anstieg der $[Na_{ges}]_{i-dia}$ hervorrufen. Dieser Anstieg findet nicht nur im Zytosol statt, sondern wird auch in den Zellkern weitergeleitet.

Es liegt daher nahe zu folgern, dass die unterschiedlichen Arten der Dehnung zumindest teilweise dieselben Mechanismen aktivieren, die zu einem Anstieg der $[Na_{ges}]_{i-dia}$ führen.

Die wichtigsten Transporter und Kanäle, die hierbei eine Rolle spielen, sind:

- SACs
- NHE

SACs

An isolierten Kardiomyozyten der Ratte wurde gezeigt, dass unter Voltage-Clamp-Bedingung Dehnung durch Aktivierung von SACs einen Einwärtsstrom (I_{SAC}) bewirkt und dass dieser Strom zum größten Teil durch Natriumionen verursacht wird [60]. Ebenfalls für die Ratte wurde gezeigt, dass es durch End-zu-End-Dehnung, sowohl von Trabekeln als auch von isolierten Kardiomyozyten, während der SFR zur Aktivierung von SACs kommt [31]. Für die Maus konnte unter lokaler axialer Dehnung ein Anstieg der $[Na_{ges}]_{i-dia}$ gezeigt werden, der durch Blockade von SACs durch Streptomycin verhindert werden konnte [30]. Demgegenüber konnte bei Herzmuskeltrabekeln des Kaninchens [33] und des Menschen [37,38] keine Beteiligung von SACs an der SFR nachgewiesen werden.

Bei der Ratte führt also Dehnung sowohl von isolierten Kardiomyozyten als auch von Herzmuskeltrabekeln zu einer Aktivierung der SACs, die somit einen möglichen Mechanismus für den von uns gemessenen Anstieg der $[Na_{ges}]_{i-dia}$ darstellt. Die in der Literatur beschriebene Abschwächung des dehnungsinduzierten Anstiegs der $[Na]_i$ durch Blockade der SACs mit Streptomycin [30] liefert einen weiteren Hinweis hierauf. Speziesunterschiede zeigen jedoch, dass sich dies nicht verallgemeinern lässt.

NHE

Wiederholt wurde die Aktivierung des NHE und die damit einhergehende Erhöhung der $[Na^+]_i$ während der SFR in Herzmuskeltrabekeln verschiedener Spezies beschrieben [32,33,37]. Auch im direkten Vergleich von isolierten Kardiomyozyten und intakten Herzmuskeltrabekeln der Ratte wurde für beide Versuchsmodelle die Aktivierung des NHE durch End-zu-End-Dehnung gesehen [31].

In unserer Arbeitsgruppe konnte jedoch gezeigt werden, dass in isolierten Kardiomyozyten der Maus der durch lokale axiale Dehnung ausgelöste Anstieg der $[Na_{ges}]_{i-dia}$ auch noch nach Blockade des NHE mit 10 μ M Cariporid (HOE 642) nachweisbar war [61]. Es ist also fraglich, ob es unter diesen Bedingungen zu einer Aktivierung des NHE kommt, der einen Anstieg der $[Na_{ges}]_{i-dia}$ nach sich zieht. Der NHE wird sowohl in den gut perfundierten Einzelzellen mit geringer Perfusionsstrecke für Sauerstoff und Nährstoffe als auch in Trabekeln mit größerer Diffusionsstrecke und minderperfundiertem Kern aktiviert [31]. Es kann geschlussfolgert werden, dass eventuelle pH-Unterschiede zwischen den Versuchsmodellen allein keine ausreichende

Erklärung für gesehene Unterschiede liefern. Sowohl die unterschiedlichen Dehnungsprotokolle als auch eventuell hier existierende Speziesunterschiede könnten diesen Unterschied erklären. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass beide Dehnungsprotokolle, lokale axiale Dehnung isolierter Kardiomyozyten und End-zu-End-Dehnung ganzer Herzmuskeltrabekel, einen signifikanten Anstieg der $[Na_{ges}]_{i-dia}$ bewirken und dass dieser bei beiden Modellen vergleichbar ist. Wir schlussfolgern, dass die durch uns gesehenen Veränderungen der $[Na_{ges}]_{i-dia}$ bei der Ratte ein universelles Phänomen ist, weitestgehend unabhängig von der Art der Dehnung. SACs scheinen hierbei eine wichtige Rolle zu spielen. Die tatsächliche Rolle des NHE ist nicht vollständig klar, auch wenn es starke Hinweise auf eine Aktivierung unter Dehnung gibt. Die genannten differenten Angaben in der Literatur weisen auf Unterschiede zwischen einzelnen Spezies hin.

Darüber hinaus zeigen unsere Versuche, dass beide Arten der Dehnung nicht nur einen generellen Anstieg der $[Na_{ges}]_{i-dia}$ bewirken, sondern dass sich dieser Anstieg bis in tiefe Bereiche der Zelle, zentrales Zytosol und Zellkern, fortsetzt. Auch dieses Phänomen scheint unabhängig von der Art der Dehnung zu sein.

5.2.2 Lokale axiale Dehnung von isolierten Kardiomyozyten, nicht jedoch End-zu-End-Dehnung von Herzmuskeltrabekeln bewirkt einen signifikanten Anstieg der $[Ca_{ges}]_{i-dia}$

Lokale axiale Dehnung bewirkte einen signifikanten Anstieg der diastolischen $[Ca_{ges}]_{i-dia}$ im zentralen Zytosol und im Zellkern von isolierten Kardiomyozyten (Tabelle 6, Abb. 16, S.35 ff). Der Anstieg der $[Ca_{ges}]_{i-dia}$ um 51% im zentralen Zytosol von Herzmuskeltrabekeln verblieb statistisch nicht signifikant. Im Zellkern von Herzmuskeltrabekeln konnte kein Anstieg der $[Ca_{ges}]_{i-dia}$ verzeichnet werden. Im peripheren Zytosol wurde sowohl in isolierten Kardiomyozyten als auch in Trabekeln ein geringer nicht signifikanter Anstieg der $[Ca_{ges}]_{i-dia}$ gegenüber der jeweiligen Kontrolle verursacht.

Somit ist zu erkennen, dass sich die $[Ca_{ges}]_{i-dia}$ anders als die $[Na_{ges}]_{i-dia}$ in den beiden Dehnungsmodellen unterschiedlich verhält. Die von uns gewonnenen Daten der Trabekel, die keinen signifikanten Anstieg der $[Ca_{ges}]_{i-dia}$ zeigen, bestätigen die von anderen Arbeitsgruppen mittels fluoreszenzoptischen Verfahren gewonnenen Erkenntnisse, welche keinen Anstieg der $[Ca^{2+}]_{i-dia}$ nachweisen konnten. End-zu-End-Dehnung von Kardiomyozyten der Ratte verursacht in der Phase der SFR sowohl in isolierten Zellen als auch in Herzmuskeltrabekeln zwar eine Vergrößerung des Kalziumtransienten während der Kontraktion, ein Anstieg der $[Ca^{2+}]_{i-dia}$ jedoch bleibt aus [15,17]. Auch während der RFR, in der die Vergrößerung des Kalziumtransienten noch nicht stattfindet, kommt es zu keiner Erhöhung der $[Ca^{2+}]_{i-dia}$ [15,17].

Der Anstieg der $[Ca_{ges}]_{i-dia}$ durch lokale axiale Dehnung wurde auch in isolierten Kardiomyozyten der Maus nachgewiesen, die nach dem gleichen Protokoll, lokale axiale Dehnung, gedehnt wurden [30].

Durch den direkten Vergleich der beiden Dehnungsprotokolle an derselben Spezies wird deutlich, dass die Unterschiede durch die Art der Dehnung bedingt werden. Demzufolge ist der Anstieg der $[Ca_{ges}]_{i-dia}$ spezifisch für lokale axiale Dehnung. Offensichtlich werden hierbei Mechanismen aktiviert, die durch End-zu-End-Dehnung nicht aktiviert werden, diese werden weiter unten diskutiert. Diese Annahme wird dadurch unterstützt, dass die elektrophysiologische Reaktion von einzelnen Zellen auf homogene Dehnung relativ gering ist im Vergleich zu der Reaktion, die durch lokale axiale Dehnung ausgelöst wird [62].

Des Weiteren zeigt sich, dass lokale axiale Dehnung von isolierten Kardiomyozyten, anders als End-zu-End-Dehnung, die $[Ca_{ges}]_{i-dia}$ nicht nur im Zytosol anzuheben vermag, sondern auch ein Signal darstellt, das einen Anstieg der $[Ca_{ges}]_{i-dia}$ in tiefen Bereiche der Zelle, bis in den Kern bewirken kann.

5.2.3 Unterschiede zwischen End-zu-End-Dehnung und lokaler axialer Dehnung und mögliche Mechanismen des Kalziumanstiegs

Vergleicht man die beiden angewandten Arten der Dehnung, so ergeben sich offensichtliche Unterschiede, die potentiell verschiedene Reaktionen hervorrufen können.

Bedeutende Unterschiede liegen in der Mechanik der beiden Arten der Dehnung.

End-zu-End-Dehnung, sowohl wenn man sie bei Herzmuskeltrabekeln als auch wenn man sie bei isolierten Kardiomyozyten anwendet, bedeutet, dass die Zellen weitestgehend entlang der Längsachse gedehnt werden und dass der Zug von den beiden Enden aus erfolgt. Somit wirkt die ausgeübte Kraft weitestgehend gleichmäßig in Längsrichtung auf die gesamte Zelle. Dem gegenüber erfolgt bei der lokalen axialen Dehnung eine Dehnung direkt an der Plasmamembran über ca. 30 μm [53]. Es ist nachvollziehbar, dass die lokale axiale Dehnung mit der unmittelbaren Kraftereinwirkung auf einen kurzen Abschnitt der Membran mit hoher Wahrscheinlichkeit einen deutlich stärkeren Reiz für die Zelle darstellt als End-zu-End-Dehnung. Bei intakten Trabekeln kommt noch hinzu, dass es in Trabekeln auch nicht-muskuläre Bestandteile gibt, die eine eigene Compliance besitzen und somit einen Teil der Kraft aufzunehmen vermögen. Es ist denkbar, dass der beschriebene stärkere Reiz an der Plasmamembran zusätzliche Mechanismen zu aktivieren vermag bzw. die durch Dehnung aktivierten Mechanismen in größerem Ausmaß aktiviert werden.

Neben der stärkeren Kraftereinwirkung bestehen auch Unterschiede in der Geometrie der Kraftereinwirkung. Wie beschrieben bewirkt End-zu-End-Dehnung eine weitestgehend homogene Dehnung. Lokale axiale Dehnung an der Plasmamembran verursacht jedoch offensichtlich auch zusätzliche Scherkräfte an der Membran [21,63]. Diese Scherkräfte scheinen in der Lage zu

sein, zusätzliche Mechanismen zu aktivieren. Im Folgenden werden zunächst grundsätzliche Möglichkeiten für einen Kalziumanstieg diskutiert. Nachfolgend wird darauf eingegangen, welche Mechanismen in Frage kommen, z.B. Ionenkanäle oder Transporter, die durch die stärkere und geometrisch andere Krafteinwirkung unter lokaler axialer Dehnung aktiviert werden.

Zur Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration bestehen zwei grundsätzliche Möglichkeiten: Einerseits der Einstrom von Kalziumionen von extrazellulär nach intrazellulär durch die Plasmamembran und andererseits die Freisetzung aus intrazellulären Speichern. In der Literatur werden dabei vor allem die Rollen folgender Kanäle, Transporter und Kalziumspeicher diskutiert:

- SACs
- NCX
- SR

Keine Rolle spielen L-Typ-Kalziumkanäle [17].

SACs

Für SACs wurde gezeigt, dass sie zumindest zu einem Teil auch Kalziumionen transportieren [36]. Somit besteht prinzipiell die Möglichkeit, dass es durch Dehnung zu einem, wenn auch vergleichsweise geringen, Kalziumeinstrom durch SACs kommt. Es müssen hierbei jedoch verschiedene Punkte beachtet werden. Wie bereits oben beschrieben, führt Dehnung sowohl in lokal axial gedehnten Kardiomyozyten der Maus [30] als auch in End zu End gedehnten isolierten Kardiomyozyten und Herzmuskeltrabekeln der Ratte zur Aktivierung von SACs [31]. Jedoch vermag nur lokale axiale Dehnung eine Erhöhung der $[Ca_{ges}]_{i-dia}$ zu bewirken [53]. Es wäre denkbar, dass lokale axiale Dehnung durch eine stärkere Aktivierung der SACs einen messbaren Anstieg der $[Ca]_i$ bewirkt. In isolierten Kardiomyozyten der Maus bewirkte lokale axiale Dehnung auch nach Blockade der SACs mit Streptomycin noch einen Anstieg der $[Ca_{ges}]_{i-dia}$ im zentralen Zytosol [30]. Nur im peripheren Zytosol direkt unter der Membran konnte der Kalziumanstieg geblockt werden. In der Maus scheint es somit, als ob die Aktivierung von SACs unter lokaler axialer Dehnung, wenn überhaupt, nur für einen Kalziumanstieg im peripheren Zytosol verantwortlich ist, also in direkter Nachbarschaft der Kanäle. Zusammenfassend lässt sich zumindest für das zentrale Zytosol und den Zellkern sagen, dass Aktivierung von SACs nicht den Anstieg der $[Ca_{ges}]_{i-dia}$ bewirkt.

NCX

Eine weitere theoretische Möglichkeit des Kalziumeinstroms über die Membran ist der NCX in umgekehrter Transportrichtung.

In der Tat konnte gezeigt werden, dass der NCX in umgekehrter Transportrichtung eine wichtige Rolle bei der SFR spielt [33,40]. Die Umkehr der Transportrichtung des NCX ist, wie bereits erwähnt, abhängig von einer erhöhten intrazellulären Natriumkonzentration [39]. Da es jedoch trotz eines Anstiegs der $[Na_{ges}]_{i-dia}$ in vergleichbarem Ausmaß nur in dem Versuchsmodell der lokalen axialen Dehnung zu einer Erhöhung der $[Ca_{ges}]_{i-dia}$ kommt, scheint der NCX in umgekehrter Transportrichtung nicht für die Erhöhung der $[Ca_{ges}]_{i-dia}$ im zentralen Zytosol verantwortlich zu sein. Gestützt wird diese Annahme auch dadurch, dass es unter lokaler axialer Dehnung von Kardiomyozyten der Maus in der Tiefe der Zelle zu einem Anstieg der $[Ca_{ges}]_{i-dia}$ kommt, auch wenn der dehnungsinduzierte Anstieg der $[Na_{ges}]_{i-dia}$ durch Zugabe von Streptomycin geblockt wird [30]. Der NCX im umgekehrter Transportrichtung scheint somit lediglich eine Erhöhung des Kalziumtransienten während der Kontraktion zu verursachen [40], nicht jedoch eine Erhöhung der $[Ca_{ges}]_{i-dia}$.

Die erwähnten Möglichkeiten zum Transport von Kalzium von extrazellulär nach intrazellulär scheinen somit keinen entscheidenden Anteil am Anstieg der $[Ca_{ges}]_{i-dia}$ unter lokaler axialer Dehnung zu haben, zumindest in den tiefen Bereichen zentrales Zytosol und Zellkern. Man kann postulieren, dass bei lokaler axialer Dehnung die zusätzlich wirkenden Scherkräfte und die allgemein wahrscheinlich stärker wirkenden Kräfte eine Freisetzung von Kalzium aus intrazellulären Speichern, also dem SR, verursachen können und dass diese persistiert und zu einer Erhöhung der $[Ca_{ges}]_{i-dia}$ führt.

SR

Über die dehnungsaktivierte Kalziumausschüttung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum werden in der Literatur unterschiedliche Angaben gemacht. Petroff et al. zeigten für isolierte Kardiomyozyten der Ratte, dass Dehnung die endotheliale NO-Synthetase (eNOS) aktiviert und somit vermehrt NO produziert wird. In der Folge wurde eine erhöhte Aktivität des RyRC gezeigt, die zu einer erhöhten Kalziumausschüttung aus dem SR und einer Vergrößerung des Kalziumtransienten führte [41]. Dem gegenüber stehen Untersuchungen von Calaghan et al., in denen im Rattenmodell weder für NO noch für das SR eine Rolle bei der SFR gesehen wurde. Die dehnungsinduzierte Erhöhung des Kalziumtransienten wurde durch die o.g. Mechanismen nicht beeinflusst [31]. Allerdings wurden in den beiden Arbeiten unterschiedliche Dehnungsprotokolle angewendet.

Festzuhalten ist außerdem, dass es bei Petroff et al. zwar zu einer erhöhten Aktivität des RyRC kam, die zu einer Erhöhung des Kalziumtransienten führte, wie in vielen anderen Publikationen

konnte jedoch keine Erhöhung der zytoplasmatischen $[Ca]_{dia}$ nachgewiesen werden. Somit bleibt es in letzter Konsequenz Spekulation, dass der von uns gesehene Kalziumanstieg unter lokaler axialer Dehnung durch Ausschüttung aus dem SR zustande kommt. Es wäre also wünschenswert, eventuelle Veränderungen der $[Ca_{ges}]$ im SR als wichtigstem intrazellulärem Speicher des Aktivator-Kalziums direkt zu messen. Auf Grund der geringen Größe der SR-Vesikel (weniger als 20 nm Durchmesser in Kardiomyozyten) ist dies trotz der mit unserer Methodik erreichten hohen räumlichen Auflösung nicht exakt möglich. Eine Verfälschung der Messwerte durch Überlappung des SR mit angrenzenden Strukturen kann nicht ausgeschlossen werden, daher haben wir auf entsprechende Messungen verzichtet.

Unter lokaler axialer Dehnung stieg auch die $[Ca_{ges}]_{i-dia}$ im Zellkern an. Demgegenüber blieb der Kalziumanstieg im Zellkern von End zu End gedehnten Herzmuskeltrabekeln vollständig aus. Somit zeigt sich, dass lokale axiale Dehnung einen Reiz darstellt, der nicht nur im Zytosol sondern auch im Zellkern einen Anstieg der $[Ca_{ges}]_{i-dia}$ verursacht. Daraus ergeben sich die Fragen, wie es zu dem Anstieg der $[Ca_{ges}]_{i-dia}$ im Zellkern kommt und ob es zu einer freien Diffusion von Kalzium aus dem Zytosol in den Kern kommt oder ob durch Dehnung Kalzium aus perinukleären Speichern in den Kern freigesetzt wird.

Es ist bekannt, dass die Kernhülle einen Kalziumspeicher darstellt und dass es auch hier ähnliche Kalziumtransportmechanismen wie am SR gibt, wie z. B. den schon besprochenen RyRC sowie Inositoltrisphosphatrezeptoren (IP3R), deren Aktivierung zu einer Kalziumfreisetzung führen können [64,65]. Käme es jedoch unter Dehnung zu einer Kalziumfreisetzung aus der Kernhülle, wäre eine Erniedrigung der Kalziumkonzentration in der Kernhülle zu erwarten. Da wir jedoch eine unveränderte $[Ca_{ges}]_{i-dia}$ in der Kernhülle sahen, ist nicht davon auszugehen, dass es zu dieser Freisetzung kommt, sondern dass Kalzium aus dem Zytosol in den Kern diffundiert. Aus dem beschriebenen fehlenden Anstieg der $[Ca_{ges}]_{i-dia}$ in der Kernfülle lässt sich darüber hinaus schlussfolgern, dass die Kernhülle kein Diffusionshindernis im Sinne einer Kalziumspeicherung darstellt. Wäre dies der Fall, wäre ein Anstieg der $[Ca_{ges}]_{i-dia}$ in der Kernhülle zu erwarten, den wir nicht sahen. Dieser Anstieg war jedoch unter lokaler axialer Dehnung von isolierten Kardiomyozyten der Maus zu sehen [30]. Somit lassen sich hier Speziesunterschiede bezüglich der Rolle der Kernhülle im Kalziumhaushalt der Zelle nicht ausschließen. Bemerkenswert ist jedoch, dass es in Kardiomyozyten der Maus unter lokaler axialer Dehnung zu einem stärkeren Anstieg der $[Ca_{ges}]_{i-dia}$ im zentralen Zytosol kommt als in Kardiomyozyten der Ratte (100% versus 75%) [30,53]. Somit lässt sich spekulieren, dass das Verhalten der Kernhülle von der Höhe des Anstiegs der Kalziumkonzentration abhängt und dass bei einem stärkeren Anstieg diese durch Kalziumaufnahme eine Pufferfunktion einnehmen könnte, um den Kern vor Kalziumüberladung zu schützen.

Für das Modell der lokalen axialen Dehnung isolierter Kardiomyozyten der Ratte lässt sich also schlussfolgern, dass der gesehene Anstieg der $[Ca_{ges}]_{i-dia}$ im Zellkern vor allem durch freie Diffusion durch die Kernhülle zustande kommt und als Folge der durch Dehnung verursachten Erhöhung der $[Ca_{ges}]_{i-dia}$ im Zytosol anzusehen ist.

5.2.4 Mögliche Folgen des Anstiegs der $[Na_{ges}]_{i-dia}$ und $[Ca_{ges}]_{i-dia}$ für die Zellfunktion

Anstieg der $[Na_{ges}]_{i-dia}$

Da es in beiden Dehnungsprotokollen zu einem Anstieg der $[Na_{ges}]_{i-dia}$ kommt, postulieren wir, dass in beiden Versuchsmodellen die Folgen dieses Anstiegs für die Zellfunktion die gleichen sein können.

Das Ruhemembranpotenzial von Zellen, nicht nur von Kardiomyozyten, wird vor allem durch den transmembranären elektrochemischen Gradienten von Natriumionen bedingt und generell führt Natriumeinstrom mit Anstieg der $[Na]_i$ zu einer Verschiebung des Ruhemembranpotenzials in Richtung positiverer Werte. Eine der Folgen für Kardiomyozyten ist, dass die Zellmembran dadurch erregbarer wird und es zu spontanen Depolarisationen kommen kann [23]. Der daraus resultierende Effekt, dass es unter Dehnung zu spontanen Extrasystolen kommt, ist seit langem bekannt [18]. Neben diesem Effekt kann es durch die erhöhte $[Na]_i$ auch zu einer Umkehr der Transportrichtung des NCX kommen [39], was auch während der SFR geschieht [40].

Anstieg der $[Ca_{ges}]_{i-dia}$

Nur lokale axiale Dehnung vermag die $[Ca_{ges}]_{i-dia}$ signifikant anzuheben, somit sind die Folgen dieses Anstiegs nur für die lokale axiale Dehnung isolierter Kardiomyozyten zu betrachten.

Generell birgt eine dauerhafte Kalziumakkumulation die Gefahr, dass es zu Kontrakturen und damit zum Funktionsverlust der Kardiomyozyten kommt. Darüber hinaus hat eine erhöhte $[Ca]_i$ generell einen proarrhythmogenen Effekt [66], insbesondere nehmen auch dehnungsinduzierte Arrhythmien bei steigender $[Ca]_i$ zu [67].

6 SCHLUSSFOLGERUNGEN

Eine der Fragen dieser Arbeit war, ob es unter End-zu-End-Dehnung von Herzmuskeltrabekeln und lokaler axialer Dehnung von isolierten Kardiomyozyten der Ratte zu einem Anstieg der $[Na_{ges}]_{i-dia}$ und $[Ca_{ges}]_{i-dia}$ kommt.

Es wurde gezeigt, dass es bei beiden Modellen zu einem signifikanten, im Ausmaß vergleichbaren Anstieg der $[Na_{ges}]_{i-dia}$ kommt. Somit scheint der Natriumanstieg unter Dehnung ein generelles Phänomen zu sein, unabhängig davon, ob isolierte Zellen oder ganze Trabekel gedehnt werden und unabhängig von der Art der Dehnung, lokale axiale Dehnung oder End-zu-End-Dehnung. Beide Methoden scheinen also die gleichen, für den Natriumanstieg verantwortliche Kanäle zu aktivieren. Als wahrscheinlichste Möglichkeit erscheint die Aktivierung von SACs.

Anders dagegen ist das Verhalten der $[Ca_{ges}]_{i-dia}$. Es zeigte sich, dass lokale axiale Dehnung von isolierten Kardiomyozyten einen signifikanten Anstieg der $[Ca_{ges}]_{i-dia}$ bewirkt, nicht jedoch End-zu-End-Dehnung von Herzmuskeltrabekeln. Es wurde hier erstmals der Einfluss von unterschiedlichen Arten der Dehnung bei derselben Spezies durch dieselbe Messmethode direkt verglichen. Somit lässt sich schlussfolgern, dass der Anstieg der $[Ca_{ges}]_{i-dia}$ ein für lokale axiale Dehnung allgemeiner Effekt ist. Die Ergebnisse an Trabekeln bestätigen Angaben aus der Literatur, bei denen ebenfalls kein Anstieg der $[Ca]_{i-dia}$ unter Dehnung zu verzeichnen war [15,31]. Lokale axiale Dehnung ist offensichtlich in der Lage zusätzliche Mechanismen zu aktivieren, die für den Kalziumanstieg verantwortlich sind, diese werden jedoch durch End-zu-End-Dehnung nicht aktiviert. Ursächlich hierfür sind vermutlich durch lokale axiale Dehnung zusätzlich wirkende Scherkräfte. Es wird postuliert, dass die wahrscheinlichste Möglichkeit für den Kalziumanstieg eine Kalziumausschüttung aus dem SR ist, der endgültige Nachweis konnte jedoch nicht erbracht werden.

Wie oben ausführlich dargestellt, bestehen zwischen den beiden Modellen sowohl in der Art der Dehnung als auch beim Effekt auf die Funktion der Zelle deutliche Unterschiede. Daraus ergibt sich die Frage, wie die beiden Modelle im direkten Vergleich zu bewerten sind bzw. welches Modell für welche Fragestellung herangezogen werden sollte.

Welcher Situation in situ kommt das jeweilige Modell also am nächsten?

Bei lokaler axialer Dehnung kommt es zu einer vergleichsweise starken, direkten Krafteinwirkung mit einer großen Scherkraftkomponente. Dem entsprechend spiegelt die lokale axiale Dehnung am ehesten eine Situation wider, in der die Herzmuskulatur akut, stark und inhomogen gedehnt wird. Solche Situationen sind denkbar, wenn es zu einer akuten Erhöhung der mechanischen Vorlast kommt, zum Beispiel bei akuter Herzinsuffizienz nach Herzinfarkt, Lungenarterienembolie oder durch Krafteinwirkung von außen. In dieser Situation steht vor allem der Funktionsverlust des Myokards mit Verlust der Pumpleistung und Entstehung von potentiell lebensbedrohlichen Arrhythmien im Vordergrund [68,69]. Eine der Ursachen für diese Arrhythmien ist eine Kalziumüberladung der Kardiomyozyten [66], die zusätzlich auch

Kontraktoren verursachen kann. Dass wir unter lokaler axialer Dehnung einen Anstieg der $[Ca_{ges}]_{i-dia}$ nachweisen konnten, bestätigt, dass diese Art der Dehnung am ehesten der akuten, inhomogenen Dehnung in situ z.B. in o.g. Situationen entspricht.

Demgegenüber führt End-zu-End-Dehnung zu einer homogenen und bei weitem nicht so direkten Kraftereinwirkung. Diese Art der Dehnung stellt am ehesten eine Situation dar, in der es zu einer sanfteren, homogenen Erhöhung der Vorlast kommt. Solche Situationen sind denkbar, wenn es z.B. bei der Entwicklung der chronischen Herzinsuffizienz nach und nach zu einer Dilatation des Herzens mit daraus folgender Dehnung des Myokards kommt. Hierbei kommt es zu langsam entstehenden, chronischen, adaptiven Veränderungen der Funktionsweise des Herzmuskels. Wir konnten zeigen, dass es unter End-zu-End-Dehnung zu keiner Veränderungen der $[Ca_{ges}]_{i-dia}$ kommt. Auch dies spricht dafür, dass diese Art der Dehnung am ehesten der chronischen Situation in situ entspricht. Unsere Versuche mit den Herzmuskeltrabekeln geben außerdem Hinweise darauf, dass eine Erhöhung der intrazellulären diastolischen Kalziumkonzentration kein zwingendes auslösendes Ereignis für chronische Veränderungen der Zelle ist, zumindest bei der Ratte.

Aus den obigen Überlegungen wird klar, dass die beiden Modelle aufgrund ihrer Unterschiede für verschiedene Fragestellungen angewendet werden sollten. Der Vorteil der Dehnung isolierter Zellen besteht darin, dass man elektrophysiologische Vorgänge wesentlich präziser erfassen kann. Wenn es um die Untersuchung von Akutreaktionen auf starke Reize geht, scheint das Modell der lokalen axialen Dehnung geeignet. Möchte man dagegen chronische Veränderungen untersuchen, die durch länger einwirkende Reize entstehen, scheint das Modell der End-zu-End-Dehnung geeigneter.

7 LITERATURVERZEICHNIS

1. Dickstein, K., Cohen-Solal, A., Filippatos, G., McMurray, J.J., Ponikowski, P., Poole-Wilson, P.A., Stromberg, A., van Veldhuisen, D.J., Atar, D., Hoes, A.W., Keren, A., Mebazaa, A., Nieminen, M., Priori, S.G., Swedberg, K., Vahanian, A., Camm, J., De Caterina, R., Dean, V., Dickstein, K., Filippatos, G., Funck-Brentano, C., Hellemans, I., Kristensen, S.D., McGregor, K., Sechtem, U., Silber, S., Tendera, M., Widimsky, P., and Zamorano, J. L.: ESC guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008: the task force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008 of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J* 29 (2008), 2388-2442.
2. Statistisches Bundesamt Deutschland (2007)
<http://www.destatis.de/jetspeed/portal/cms/Sites/destatis/Internet/DE/Content/Statistiken/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/Content75/SterbefaelleInsgesamt,templateId=renderPrint.psml>
3. Gordon, A.M., Huxley, A.F., and Julian, F.J.: The variation in isometric tension with sarcomere length in vertebrate muscle fibres. *J Physiol* 184 (1966), 170-192.
4. Frank, O.: Zur Dynamik des Herzmuskels. *Z Biol* 32 (1895), 370-437.
5. Starling, E.H.: The compensating mechanism of the heart. *Lancet* 1 (1897), 569-572.
6. Parmley, W.W. and Chuck, L.: Length-dependent changes in myocardial contractile state. *Am J Physiol* 224 (1973), 1195-1199.
7. Tucci, P.J., Bregagnollo, E.A., Spadaro, J., Cicogna, A.C., and Ribeiro, M.C.: Length dependence of activation studied in the isovolumic blood-perfused dog heart. *Circ Res* 55 (1984), 59-66.
8. White, E., Boyett, M.R., and Orchard, C.H.: The effects of mechanical loading and changes of length on single guinea-pig ventricular myocytes. *J Physiol* 482 (1995), 93-107.
9. von Lewinski, D., Stumme, B., Fialka, F., Luers, C., and Pieske, B.: Functional relevance of the stretch-dependent slow force response in failing human myocardium. *Circ Res* 94 (2004), 1392-1398.
10. Hibberd, M.G. and Jewell, B.R.: Calcium- and length-dependent force production in rat ventricular muscle. *J Physiol* 329 (1982), 527-540.

11. Hofmann, P.A. and Fuchs, F.: Effect of length and cross-bridge attachment on Ca^{2+} binding to cardiac troponin C. *Am J Physiol* 253 (1987), 90-96.
12. Fuchs, F. and Wang, Y.P.: Sarcomere length versus interfilament spacing as determinants of cardiac myofilament Ca^{2+} sensitivity and Ca^{2+} binding. *J Mol Cell Cardiol* 28 (1996), 1375-1383.
13. Cazorla, O., Wu, Y., Irving, T.C., and Granzier, H.: Titin-based modulation of calcium sensitivity of active tension in mouse skinned cardiac myocytes. *Circ Res* 88 (2001), 1028-1035.
14. Calaghan, S.C. and White, E.: The role of calcium in the response of cardiac muscle to stretch. *Prog Biophys Mol Biol* 71 (1999), 59-90.
15. Kentish, J.C. and Wrzosek, A.: Changes in force and cytosolic Ca^{2+} concentration after length changes in isolated rat ventricular trabeculae. *J Physiol* 506 (1998), 431-444.
16. Allen, D.G. and Kurihara, S.: The effects of muscle length on intracellular calcium transients in mammalian cardiac muscle. *J. Physiol* 327 (1982), 79-94.
17. Hongo, K., White, E., Le Guennec, J.Y., and Orchard, C.H.: Changes in $[\text{Ca}^{2+}]_i$, $[\text{Na}^+]_i$ and Ca^{2+} current in isolated rat ventricular myocytes following an increase in cell length. *J Physiol* 491 (1996), 609-619.
18. Kaufmann, R. und Theophile, U.: Automatie-fördernde Dehnungseffekte an Purkinje-Faden, Papillarmuskeln und Vorhoftrabekeln von Rhesus-Affen. *Pflügers Arch* 297 (1967), 174-189.
19. Sadoshima, J. and Izumo, S.: The cellular and molecular response of cardiac myocytes to mechanical stress. *Annu Rev Physiol* 59 (1997), 551-571.
20. Molkenkin, J.D. and Dorn, G.W.: Cytoplasmic signaling pathways that regulate cardiac hypertrophy. *Annu Rev Physiol* 63 (2001), 391-426.
21. Isenberg, G., Kazanski, V., Kondratev, D., and Gallitelli, M.F., Kiseleva, I., and Kamkin, A.: Differential effects of stretch and compression on membrane currents and $[\text{Na}^+]_c$ in ventricular myocytes. *Prog Biophys Mol Biol* 82 (2003), 43-56.
22. Tavi, P., Han, C., and Weckstrom, M.: Mechanisms of stretch-induced changes in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in rat atrial myocytes: role of increased troponin C affinity and stretch-activated ion channels. *Circ Res* 83 (1998), 1165-1177.

23. Kamkin, A., Kiseleva, I., and Isenberg, G.: Stretch-activated currents in ventricular myocytes: amplitude and arrhythmogenic effects increase with hypertrophy. *Cardiovasc Res* 48 (2000), 409-420.
24. Lab, M. J., Allen, D. G., and Orchard, C. H.: The effects of shortening on myoplasmic calcium concentration and on the action potential in mammalian ventricular muscle. *Circ Res* 55 (1984), 825-829.
25. Janvier, N.C. and Boyett, M.R.: The role of Na-Ca exchange current in the cardiac action potential. *Cardiovasc Res* 32 (1996), 69-84.
26. Tohse, N.: Calcium-sensitive delayed rectifier potassium current in guinea pig ventricular cells. *Am J Physiol* 258 (1990), 1200-1207.
27. Lee, K.S., Marban, E., and Tsien, R.W.: Inactivation of calcium channels in mammalian heart cells: joint dependence on membrane potential and intracellular calcium. *J Physiol* 364 (1985), 395-411.
28. White, E., Le Guennec, J.Y., Nigretto, J.M., Gannier, F., Argibay, J.A., and Garnier, D.: The effects of increasing cell length on auxotonic contractions; membrane potential and intracellular calcium transients in single guinea-pig ventricular myocytes. *Exp Physiol* 78 (1993), 65-78.
29. Steele, D.S. and Smith, G.L.: Effects of muscle length on diastolic $[Ca^{2+}]_i$ in isolated guinea-pig ventricular trabeculae. *J Physiol* 467 (1993), 328P.
30. Kondratev, D. and Gallitelli, M.F.: Increments in the concentrations of sodium and calcium in cell compartments of stretched mouse ventricular myocytes. *Cell Calcium* 34 (2003), 193-203.
31. Calaghan, S.C. and White, E.: Activation of Na^+H^+ exchange and stretch-activated channels underlies the slow inotropic response to stretch in myocytes and muscle from the rat heart. *J Physiol* 559 (2004), 205-214.
32. Alvarez, B.V., Perez, N.G., Ennis, I.L., Camilion de Hurtado, M. C., and Cingolani, H. E.: Mechanisms underlying the increase in force and Ca^{2+} transient that follow stretch of cardiac muscle: a possible explanation of the Anrep effect. *Circ Res* 85 (1999), 716-722.
33. von Lewinski, D., Stumme, B., Maier, L.S., Luers, C., Bers, D.M., and Pieske, B.: Stretch-dependent slow force response in isolated rabbit myocardium is Na^+ dependent. *Cardiovasc Res* 57 (2003), 1052-1061.

34. Belus, A. and White, E.: Streptomycin and intracellular calcium modulate the response of single guinea-pig ventricular myocytes to axial stretch. *J Physiol* 546 (2003), 501-509.
35. Craelius, W., Chen, V., and el Sherif, N.: Stretch activated ion channels in ventricular myocytes. *Biosci Rep* 8 (1988), 407-414.
36. Bustamante, J.O., Ruknudin, A., and Sachs, F.: Stretch-activated channels in heart cells: relevance to cardiac hypertrophy. *J Cardiovasc Pharmacol* 17 Suppl 2 (1991), 110-113.
37. von Lewinski, D., Stumme, B., Fialka, F., Luers, C., and Pieske, B.: Functional relevance of the stretch-dependent slow force response in failing human myocardium. *Circ Res* 94 (2004), 1392-1398.
38. Kockskamper, J., von Lewinski, D., Khafaga, M., Elgner, A., Grimm, M., Eschenhagen, T., Gottlieb, P.A., Sachs, F., and Pieske, B.: The slow force response to stretch in atrial and ventricular myocardium from human heart: functional relevance and subcellular mechanisms. *Prog Biophys Mol Biol* 97 (2008), 250-267.
39. Nuss, H.B. and Houser, S.R.: Sodium-calcium exchange-mediated contractions in feline ventricular myocytes. *Am J Physiol* 263 (1992), 1161-1169.
40. Perez, N.G., de Hurtado, M.C., and Cingolani, H.E.: Reverse mode of the Na^+ - Ca^{2+} exchange after myocardial stretch: underlying mechanism of the slow force response. *Circ Res* 88 (2001), 376-382.
41. Petroff, M.G., Kim, S.H., Pepe, S., Dessy, C., Marban, E., Balligand, J.L., and Sollott, S. J.: Endogenous nitric oxide mechanisms mediate the stretch dependence of Ca^{2+} release in cardiomyocytes. *Nat Cell Biol* 3 (2001), 867-873.
42. Molkenstin, J.D., Lu, J.R., Antos, C.L., Markham, B., Richardson, J., Robbins, J., Grant, S.R., and Olson, E.N.: A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell* 93 (1998), 215-228.
43. Zhang, T., Johnson, E.N., Gu, Y., Morissette, M.R., Sah, V.P., Gigena, M.S., Belke, D. D., Dillmann, W.H., Rogers, T.B., Schulman, H., Ross, J., Jr., and Brown, J.H.: The cardiac-specific nuclear delta(B) isoform of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II induces hypertrophy and dilated cardiomyopathy associated with increased protein phosphatase 2A activity. *J Biol Chem* 277 (2002), 1261-1267.

44. Wendt-Gallitelli, M.F. and Wolburg, H.: Rapid freezing, cryosectioning, and X-ray microanalysis on cardiac Muscle preparations in defined functional States. *J Electron Microscopy Technique* 1 (1984), 151-174.
45. Mulieri, L. A., Hasenfuss, G., Ittleman, F., Blanchard, E.M., and Alpert, N.R.: Protection of human left ventricular myocardium from cutting injury with 2,3-butanedione monoxime. *Circ Res* 65 (1989), 1441-1449.
46. ter Keurs, H.E., Rijnsburger, W.H., van Heuningen, R., and Nagelsmit, M.J.: Tension development and sarcomere length in rat cardiac trabeculae. Evidence of length-dependent activation. *Circ Res* 46 (1980), 703-714.
47. Layland, J. and Kentish, J.C.: Positive force- and $[Ca^{2+}]_i$ -frequency relationships in rat ventricular trabeculae at physiological frequencies. *Am J Physiol* 276 (1999), 9-18.
48. Hall, T.A.: Biological X-ray microanalysis. *J Microsc* 117 (1979), 145-163.
49. Gallitelli, M.F., Schultz, M., Isenberg, G., and Rudolf, F.: Twitch-potential increases calcium in peripheral more than in central mitochondria of guinea-pig ventricular myocytes. *J Physiol* 518 (1999), 433-447.
50. Schultz, M. and Gallitelli, M.F.: Improved quantitative electron probe microanalysis of biological cryosections using an EDS germanium detector and a super-atmosphere thin window (super ATW). *J Microsc* 190 (1998), 293-297.
51. Schultz, M.: Quantitative Energiedispersive Elektronenstrahlmikroanalyse von Herzmuskelzellen: Einfluss von Fehlermöglichkeiten bei Präparation, Messung und Auswertung der Spektren auf die Signifikanz der Messergebnisse. Dissertation (2002). Universitäts- und Landesbibliothek Halle (Saale). <http://sundoc.bibliothek.uni-halle.de/diss-online/02/02H021/>
52. Wendt-Gallitelli, M.F., and Isenberg, G.: Total and free myoplasmic calcium during a contraction cycle: x-ray microanalysis in guinea-pig ventricular myocytes. *J Physiol* 435 (1991), 349-372.
53. Wilhelm, J., Kondratev, D., Christ, A., and Gallitelli, M.F.: Stretch induced accumulation of total Ca and Na in cytosol and nucleus: a comparison between cardiac trabeculae and isolated myocytes. *Can J Physiol Pharmacol* 84 (2006), 487-498.
54. Antoni, H.: Mechanik der Herzaktion. Schmidt, R.F., Thews G. (Hrsg.): *Physiologie des Menschen*. Springer Berlin, Heidelberg, New York, 1997, S. 448-471.

55. Schott, P., Asif, A.R., Graf, C., Toischer, K., Hasenfuss, G., and Kogler, H.: Myocardial adaptation of energy metabolism to elevated preload depends on calcineurin activity : a proteomic approach. *Basic Res Cardiol* 103 (2008), 232-243.
56. Janssen, P.M., Hasenfuss, G., Zeitz, O., Lehnart, S.E., Prestle, J., Darmer, D., Holtz, J., and Schumann, H.: Load-dependent induction of apoptosis in multicellular myocardial preparations. *Am J Physiol* 282 (2002), 349-356.
57. Janssen, P.M., Lehnart, S.E., Prestle, J., Lynker, J.C., Salfeld, P., Just, H., and Hasenfuss, G.: The trabecula culture system: a novel technique to study contractile parameters over a multiday time period. *Am J Physiol* 274 (1998), 1481-1488.
58. Bers, D.M.: *Excitation-contraction Coupling and Cardiac Contractile Force*. 2nd ed. Kluwer Academic Publishers, 2001.
59. Isenberg, G., and Wendt-Gallitelli, M.F.: Binding of calcium to myoplasmic buffers contributes to the frequency-dependent inotropy in heart ventricular cells. *Basic Res Cardiol* 87 (1992), 411-417.
60. Zeng, T., Bett, G.C.L., and Sachs, F.: Stretch-activated whole cell currents in adult rat cardiac myocytes. *Am J Physiol* 278 (2000), 548-557.
61. Kondratev, D., Christ, A., and Gallitelli, M.F.: Inhibition of the Na⁺-H⁺ exchanger with cariporide abolishes stretch-induced calcium but not sodium accumulation in mouse ventricular myocytes. *Cell Calcium* 37 (2005), 69-80.
62. Isenberg, G., Kondratev, D., Dyachenko, V., Kazanski, V., and Gallitelli, M.F.: Isolated Cardiomyocytes: Mechanosensitivity of Action Potential, Membrane Current and Ion Concentration. In Kamkin, A., and Kiselewa, I. (ed): *Mechanosensitivity in Cells and Tissues*. Academia, Moscow, 2005, pp 126-164
63. Dyachenko, V., Christ, A., Gubanov, R., Isenberg, G. Bending of z-lines by mechanical stimuli: an input signal for integrin dependent modulation of ion channels? *Prog Biophys Mol Biol* 97 (2008), 196-216.
64. Gerasimenko, O.V., Gerasimenko, J.V., Tepikin, A.V., and Petersen, O.H.: ATP-dependent accumulation and inositol trisphosphate- or cyclic ADP-ribose-mediated release of Ca²⁺ from the nuclear envelope. *Cell* 80 (1995), 439-444.
65. Lanini, L., Bachs, O., and Carafoli, E.: The calcium pump of the liver nuclear membrane is identical to that of endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 267 (1992), 11548-11552.

66. Levy, M.N.: Role of calcium in arrhythmogenesis. *Circulation* 80 (1989), 23-30.
67. Jobe, R.L., Taylor, L.K., Wang, Z., Berger, C. M., Stacy, G.P., Jr., and Hansen, D.E.: Effect of ryanodine on the initiation and perpetuation of stretch-induced arrhythmias in isolated canine ventricle. *Am J Physiol* 267 (1994), 1736-1744.
68. Taggart, P., Sutton, P., Lab, M., Runnalls, M., O'Brien, W., and Treasure, T.: Effect of abrupt changes in ventricular loading on repolarization induced by transient aortic occlusion in humans. *Am. J Physiol* 263 (1992), 816-823.
69. Hansen, D.E., Craig, C.S., and Hondeghem, L.M.: Stretch-induced arrhythmias in the isolated canine ventricle. Evidence for the importance of mechanoelectrical feedback. *Circulation* 81 (1990), 1094-1105.

Publikation der Ergebnisse der Doktorarbeit

Wilhelm, J., Kondratev, D., Christ, A., and Gallitelli, M.F.: Stretch induced accumulation of total Ca and Na in cytosol and nucleus: a comparison between cardiac trabeculae and isolated myocytes. *Can J Physiol Pharmacol* 84 (2006), 487-498.

8 THESEN

1. End-zu-End-Dehnung von Herzmuskeltrabekeln der Ratte und lokale axiale Dehnung isolierter Kardiomyozyten der Ratte führen zu einem signifikanten Anstieg der diastolischen Natriumkonzentration im Zytosol und im Zellkern.
2. Verantwortlich für diesen Anstieg scheinen dehnungsaktivierte Kanäle zu sein.
3. Lokale axiale Dehnung, nicht jedoch End-zu-End-Dehnung führt zu einem signifikanten Anstieg der diastolischen Kalziumkonzentration im Zytosol und im Zellkern von Kardiomyozyten der Ratte.
4. Es wird postuliert, dass der Anstieg der Kalziumkonzentration durch Ausschüttung aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum zustande kommt, der Nachweis kann mit der angewendeten Messmethode EPMA jedoch nicht erbracht werden.
5. Während lokaler axiale Dehnung wirken im Gegensatz zu End-zu-End-Dehnung zusätzliche Scherkräfte, die als Auslöser des Anstiegs der Kalziumkonzentration angesehen werden.
6. Beide Methoden sind geeignet zur Untersuchung dehnungsinduzierter Vorgänge an Kardiomyozyten.
7. Das Modell der End-zu-End-Dehnung spiegelt am ehesten die Situation chronischer Dehnung und Dilatation wider und sollte zur Untersuchung von Veränderungen in eben dieser Situation angewendet werden.
8. Das Modell der lokalen axialen Dehnung kommt der Situation akuter, starker, inhomogener Dehnung am nächsten und sollte zur Untersuchung von Vorgängen in solchen Situation herangezogen werden.

LEBENS LAUF

Joachim Wilhelm

geboren am 24.06.1978 in Leverkusen

Klinische Tätigkeit

Seit 01.2007	Assistenzarzt an der Universitätsklinik und Poliklinik für Innere Medizin III Universitätsklinikum Halle (Saale) Direktor: Prof. Dr. med. K. Werdan
01.2006-06.2006	Assistenzarzt an der Medizinischen Klinik / Kardiologie Herzzentrum Dresden, Universitätsklinik Direktorin: Prof. Dr. med. R. H. Strasser

Studium

21.11.2005	Approbation als Arzt Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Note: 1,0 Gesamtnote der Ärztlichen Prüfung: 1,66
10.1998-11.2005	Studium der Humanmedizin Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Schulbildung

08.1988-06.1997	Nicolaus-Cusanus-Gymnasium Bergisch Gladbach Abiturnote: 1,3
-----------------	---

Wissenschaftliche Tätigkeiten

Seit 2007 als Assistenzarzt Durchführung von klinischen Studien zur Diagnostik und Prognose der frühen Sepsis an der Klinik für Innere Medizin III des Universitätsklinikums Halle (Saale)

2007-2008: Prüfarzt bei einer internationalen, multizentrischen Arzneimittelstudie (VIVIIFY)

Während der Doktorarbeit tierexperimentelle Untersuchungen zu dehnungsinduzierten Veränderungen an Kardiomyozyten der Ratte

Publikationen unabhängig von der Doktorarbeit

Müller-Werdan, U., **Wilhelm J.**, Hettwer, S., Nuding, S., Ebelt, H. und Werdan, K.: Spezielle Aspekte bei Sepsispatienten. Internist 50 (2009), 828-836.

Wilhelm, J., Ebelt, H., Buerke, M., and Schlitt, A.: Selective decontamination of the digestive tract and oropharynx: new findings for an old approach still under discussion. Expert Rev Anti Infect Ther 7 (2009), 399-402.

Schmidt, H., Hoyer, D., **Wilhelm, J.**, Söffker, G., Heinroth, K., Hottenrott, K., Said, S. M., Buerke, M., Müller-Werdan, U., and Werdan, K.: The alteration of autonomic function in multiple organ dysfunction syndrome. Crit Care Clin 24 (2008), 149–163.

Wilhelm, J., Söffker, G., Schmidt, H. und Winkler, M.: Der beatmete Patient mit Sepsis und Multiorgan-Dysfunktion – Rasche zielgerichtete Therapie für eine bessere Prognose. Klinikarzt 37 (2008), 235-240

Halle (Saale),

Joachim Wilhelm

Selbstständigkeitserklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe und keine anderen als im Text angegebene Unterstützungen und Hilfsmittel in Anspruch genommen habe.

Das Schneiden der gefrorenen Muskeln sowie die weitere Präparation der Kryoschnitte inklusive Gefriertrocknung und Bedampfen mit Kohle wurden durch die Medizinisch-Technische Assistentin Nicole Strätz unseres Labors durchgeführt.

Die Daten der isolierten Kardiomyozyten wurden durch den wissenschaftlichen Mitarbeiter unserer Arbeitsgruppe Dr. Denis Kondratev erhoben.

Halle (Saale),

Joachim Wilhelm

Erklärung über frühere Promotionsversuche

Es wurden von mir keine früheren Promotionsversuche unternommen.

Die vorliegende Arbeit ist bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer Prüfungskommission vorgelegt worden.

Halle (Saale),

Joachim Wilhelm

Danksagung

An erster Stelle danke ich Frau Professor Gallitelli für die Überlassung des interessanten und anspruchsvollen Themas, die Hilfsbereitschaft und konstruktive Kritik, vor allem aber für die unglaubliche Geduld in der Entstehungsphase der Dissertationsschrift.

Herrn Dr. rer. nat. Andreas Christ danke ich für die technische Unterstützung beim Aufbau der Versuchsapparatur, vor allem für die Vernetzung der Geräte mit dem Computer und das Schreiben der Programme zum Einlesen und Weiterverarbeiten der Kraftsignale. Ebenso auch für die immerwährende Hilfsbereitschaft bei technischen Problemen jedweder Art.

Ich danke unserer damaligen MTA Frau Nicole Strätz, der guten Seele unseres Labors. Sie hat den höchst anspruchsvollen Vorgang des Schneidens und Gefriertrocknens der Proben mit einer unglaublichen Gewissenhaftigkeit und mit unglaublichem Können durchgeführt und mich auch bei allen anderen Bereichen der Versuche stets unterstützt.

Herrn Dr. Denis Kondratev danke ich für das Überlassen der Ergebnisse der Einzelzellen.

Herrn Professor Hasenfuß, Direktor der Abteilung Kardiologie und Pneumologie des Universitätsklinikums Göttingen, und der damaligen Arbeitsgruppe von Herrn Dr. med. Harald Kögler danke ich für die freundliche Aufnahme und für die hervorragende Einarbeitung in die Methodik der Präparation und Dehnung von Herzmuskeltrabekeln.

Meinen Eltern danke ich, dass sie es mir ermöglicht haben Medizin zu studieren und mein Studium für die Anfertigung der Doktorarbeit um ein Jahr zu verlängern. Außerdem danke ich ihnen für den uneingeschränkten Glauben an mich.

Wenn auch an letzter Stelle stehend, dennoch nicht zu Letzt, danke ich meiner Lebensgefährtin Dr. med. Nadine Schwarz. Ihre konsequenten Bemühungen mich zu Motivieren und der immerwährende Rückhalt haben in der Endphase entscheidend zu der Fertigstellung der Arbeit beigetragen.