

Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Innere Medizin III  
der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
(Direktor: Professor Dr. Stefan Frantz)

# **Die negativ chronotropen Effekte von LPS auf neonatale Rattenkardiomyozyten werden über HCN-Kanäle vermittelt**

## **Dissertation**

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

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

von Isabel Geißler  
geboren am 21. Februar 1990 in Lutherstadt Wittenberg, Deutschland

Betreuer: Professor Dr. Harald Loppnow, Professor Dr. Karl Werdan

Gutachter / Gutachterin: Professor Dr. Harald Loppnow  
Professor Dr. Andreas Simm  
Professor Dr. Joerg Heineke

Datum der Eröffnung: 14. Februar 2015

Datum der Verteidigung: 14. September 2015

# Referat

# Inhaltsverzeichnis

|          |  |           |
|----------|--|-----------|
|          | <b>Abkürzungsverzeichnis</b>   | <b>IV</b> |
| <b>1</b> | <b>Einleitung</b>  | <b>1</b>  |
| 1.1      | Die Schlagrate ist ein unabhängiger kardiovaskulärer Risikofaktor .....  | 1         |
| 1.2      | Es gibt verschiedene Möglichkeiten zur medikamentösen Schlagratensenkung .....   | 2         |
| 1.3      | Der HCN-Kanal ( <i>hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated cation channel</i> ) ist das Schrittmacherzentrum des Herzens ..... | 3         |
| 1.4      | Ivabradin ist ein selektiver HCN-Kanal-Inhibitor .....   | 5         |
| 1.5      | Die Regulation der kardialen Schlagrate ist bei Sepsis gestört .....   | 6         |
| 1.6      | Lipopolysaccharid (LPS) inhibiert die HCN-Kanal-Aktivität .....  | 7         |
| <b>2</b> | <b>Zielstellung</b>  | <b>9</b>  |
| <b>3</b> | <b>Material und Methodik</b>   | <b>10</b> |
| 3.1      | Zellkulturmaterialien, Medien, Lösungen und Zusätze .....  | 10        |
| 3.2      | Isolation und Kultivierung der neonatalen Rattenkardiomyozyten (nRKM).....   | 13        |
| 3.3      | Zusatz der Reagenzien und Schlagratennmessung .....  | 14        |
| 3.4      | Abnahme der Überstände und Lysierung der Kardiomyozyten .....  | 15        |
| 3.5      | Bestimmung der Interleukin-6-(IL-6)-Aktivität .....  | 16        |
| 3.6      | Konzentrationsmessung des cyclischem Adenosinmonophosphats (cAMP) .....  | 17        |
| 3.7      | Statistische Auswertung .....  | 17        |
| <b>4</b> | <b>Ergebnisse</b>  | <b>18</b> |
| 4.1      | Die Schlagrate kultivierter Kardiomyozyten lässt sich durch eine Änderung der Kultivierungsbedingungen beeinflussen .....                  | 18        |
| 4.1.1    | Die Schlagrate ist abhängig von der Inkubationszeit .....  | 18        |
| 4.1.2    | Die Schlagrate wird durch Zugabe positiv chronotroper Substanzen erhöht .....  | 20        |
| 4.2      | Die schlagratensenkende Wirkung von LPS und Ivabradin auf kultivierte nRKM wird über den gleichen Weg vermittelt .....                     | 21        |
| 4.2.1    | LPS bewirkt eine Senkung der Schlagrate .....  | 21        |
| 4.2.2    | Ivabradin bewirkt eine Senkung der Schlagrate .....  | 22        |
| 4.2.3    | Die Co-Inkubation kultivierter Kardiomyozyten mit LPS und Ivabradin bewirkt keine additive Senkung der Schlagrate .....                    | 23        |

|          |  |           |
|----------|--|-----------|
| 4.3      | Die schlagratensenkende Wirkung von LPS und Kalzium-Kanal-Inhibitoren auf kultivierte nRKM ist additiv .....   | 25        |
| 4.3.1    | Nifedipin bewirkt eine dosisabhängige Senkung der Schlagrate .....   | 25        |
| 4.3.2    | Die Co-Inkubation kultivierter Kardiomyozyten mit LPS und Nifedipin bewirkt eine additive Senkung der Schlagrate .....                                       | 27        |
| 4.3.3    | Verapamil bewirkt eine dosisabhängige Senkung der Schlagrate .....   | 29        |
| 4.3.4    | Die Co-Inkubation kultivierter Kardiomyozyten mit LPS und Verapamil bewirkt eine additive Senkung der Schlagrate .....                                       | 30        |
| 4.4      | Die schlagratensenkende Wirkung von Ivabradin und Kalzium-Kanal-Inhibitoren auf kultivierte nRKM ist additiv .....   | 31        |
| 4.4.1    | Die Co-Inkubation kultivierter Kardiomyozyten mit Ivabradin und Nifedipin bewirkt eine additive Senkung der Schlagrate .....                                 | 32        |
| 4.4.2    | Die Co-Inkubation kultivierter Kardiomyozyten mit Ivabradin und Verapamil bewirkt eine additive Senkung der Schlagrate .....                                 | 33        |
| 4.5      | LPS, Ivabradin und Nifedipin bewirken keine Änderung der intrazellulären cAMP-Konzentration .....  | 34        |
| 4.6      | Eine proinflammatorische Wirkung von LPS ist in kultivierten nRKM nachweisbar .....  | 36        |
| 4.7      | Ivabradin und Nifedipin haben lediglich geringfügige antiinflammatorische Effekte .....  | 37        |
| <b>5</b> | <b>Diskussion</b>  | <b>40</b> |
| 5.1      | Die schlagratensenkende Wirkung von LPS <i>in vitro</i> wird durch eine Interaktion mit kardialen HCN-Kanälen vermittelt .....                               | 40        |
| 5.2      | Die schlagratensenkende Wirkung von LPS auf kultivierte nRKM wird nicht über eine Interaktion mit kardialen Kalzium-Kanälen vermittelt .....                 | 43        |
| 5.3      | Die schlagratensenkende Wirkung von Ivabradin auf kultivierte nRKM wird nicht über eine zusätzliche Interaktion mit kardialen Kalzium-Kanälen vermittelt ... | 44        |
| 5.4      | Die Schlagratensenkung durch LPS, Ivabradin und Nifedipin wird nicht über eine messbare Änderung der intrazellulären cAMP-Konzentration vermittelt .....     | 45        |
| 5.5      | Die proinflammatorischen Effekte von LPS sind im vorliegenden Testsystem mit kultivierten Kardiomyozyten vorhanden .....                                     | 46        |
| 5.6      | Die schlagratensenkenden Substanzen Ivabradin und Nifedipin wirken lediglich geringfügig antiinflammatorisch auf Kardiomyozyten <i>in vitro</i> .....        | 46        |

## INHALTSVERZEICHNIS

---

|                 |  |           |
|-----------------|--|-----------|
| 5.7             | Limitationen .....                           | 48        |
| 5.8             | Ausblick .....                               | 49        |
| <b>6</b>        | <b>Zusammenfassung</b>                       | <b>50</b> |
| <b>7</b>        | <b>Literaturverzeichnis</b>                  | <b>52</b> |
| <b>8</b>        | <b>Thesen</b>                                | <b>62</b> |
| <b>Anlagen:</b> | A1 <i>Curriculum vitae</i>                   |           |
|                 | A2 Selbstständigkeitserklärung               |           |
|                 | A3 Erklärung über frühere Promotionsversuche |           |
|                 | A4 Danksagung                                |           |

# Abkürzungsverzeichnis

|                  |  |
|------------------|--|
| 7TD1-Zellen      | Lymphozyten einer Interleukin-6-abhängigen murinen B-Zelllinie   |
| AG               | Antibiotika-L-Glutamin   |
| BSA              | Bovines Serumalbumin   |
| cAMP             | Cyclisches Adenosinmonophosphat  |
| CMRL             | <i>Connaught Medical Research Laboratories</i>   |
| ED <sub>50</sub> | Mittlere effektive Dosis   |
| FKS              | Fetales Kälberserum  |
| Fors             | Forskolin  |
| g                | Erdbeschleunigung  |
| HCN              | <i>Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated cation channel</i>                                |
| IBMX             | 3-Isobutyl-1-methylxanthin   |
| IC <sub>50</sub> | Mittlere inhibitorische Konzentration  |
| I <sub>f</sub>   | „ <i>funny current</i> “, Schrittmacherstrom an den HCN-Kanälen  |
| IL-6             | Interleukin-6  |
| Iso              | Isoprenalin  |
| IVA              | Ivabradin  |
| LPS              | Lipopolysaccharid, Endotoxin   |
| Min.             | Minute   |
| MTT              | 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid   |
| n                | Anzahl der Experimente   |
| Nif              | Nifedipin  |
| nRKM             | Neonatale Rattenkardiomyozyten   |
| O-Kette          | O-Polysaccharid-Kette vom S-Form-LPS   |
| PBS-AG1-Lösung   | Phosphate buffered saline A / Glukose  |
| pNN50            | Prozentsatz der aufeinanderfolgenden RR-Intervalle, die sich um mehr als 50 ms voneinander unterscheiden |
| RMSSD            | Quadratwurzel aus dem Mittelwert der quadrierten Differenzen aufeinanderfolgender RR-Intervalle          |
| RPMI             | <i>Roswell Park Memorial Institute</i>   |
| RR               | Abstand zweier aufeinanderfolgender Herzschläge  |
| Sek.             | Sekunde  |
| SDNN             | Standardabweichung der RR-Intervalle   |

|              |                                    |
|--------------|------------------------------------|
| SPM          | Schläge pro Minute                 |
| Std.         | Stunde                             |
| TNF $\alpha$ | <i>Tumor necrosis factor alpha</i> |
| Vera         | Verapamil                          |
| VK           | Variationskoeffizient              |

# 1 Einleitung

Die Sepsis, eine mikrobiell hervorgerufene systemische Entzündungsreaktion, umfasst Erkrankungen, die von einer systemischen Infektion ohne Organversagen bis hin zum septischen Schock reichen. Bei schwerer Sepsis mit Multiorganversagen ist der kardiovaskuläre Status ein bestimmender Faktor für das Überleben [Parrillo, 2003]. Eine erhöhte kardiale Schlagrate stellte sich hierbei als unabhängiger Risikofaktor für die Mortalität an kardiovaskulären und septischen Erkrankungen heraus [Kannel, 1987; Hoke et al., 2012], woraufhin die Senkung der Schlagrate als zentrales Therapieprinzip postuliert wurde und die Suche nach geeigneten pharmakologischen Wirkstoffen begann. Die zugrundeliegenden Pathomechanismen für die unter septischen Bedingungen gestörte Herzfunktion sind bisher jedoch nur wenig verstanden.

## 1.1 Die Schlagrate ist ein unabhängiger kardiovaskulärer Risikofaktor

Die Schlagrate des Herzens stellt einen unabhängigen prognostischen Faktor für Morbidität und Mortalität bei kardiovaskulären Erkrankungen dar. Bereits 1987 konnte mithilfe der Framingham-Studie, einer über drei Jahrzehnte andauernden Kohortenstudie mit 5209 Probanden, gezeigt werden, dass ein deutlicher Zusammenhang zwischen einer erhöhten Schlagrate in körperlicher Ruhe und der Inzidenz eines Herzversagens besteht. Das Risiko eines Herzversagens stieg unabhängig von den zugrunde liegenden Erkrankungen mit zunehmender Schlagrate an. Beispielsweise hatten männliche Probanden zwischen 35 und 64 Jahren mit einer erhöhten Ruhe-Schlagrate (> 91 Schläge pro Minute [SPM]) ein bis zu 7-fach erhöhtes relatives Risiko für das Auftreten eines Herzversagens gegenüber Probanden mit einer niedrigen Ruhe-Schlagrate (< 68 SPM) [Kannel, 1987]. Basierend auf den Ergebnissen der Ohasama-Studie wurde publiziert, dass eine um 5 SPM gesteigerte Ruhe-Schlagrate mit einem Anstieg der 10-Jahres-Mortalität an kardiovaskulären Erkrankungen um 17 % assoziiert ist [Hozawa et al., 2004]. Die Bedeutung der Schlagrate für die Morbidität und Mortalität an verschiedenen Erkrankungen wurde in zahlreichen weiteren Studien untersucht. Diese Studien bekräftigen, dass die kardiale Schlagrate ein starker und von anderen Risikofaktoren, z. B. arterielle Hypertension und Alter, unabhängiger prognostischer Faktor für die Mortalität bei kardiovaskulären und nicht-kardiovaskulären Erkrankungen ist [Benetos et al., 1999; Seccareccia et al., 2001].

Es gibt verschiedene Faktoren, die zur Erklärung des Zusammenhangs zwischen erhöhter Schlagrate und Risiko eines kardiovaskulären Todes beitragen, diesen jedoch nicht vollständig erklären können. Unter anderem bewirkt die infolge einer hohen Schlagrate beschleunigte

Herzaktion eine Steigerung des myokardialen Sauerstoffverbrauchs. Gleichzeitig ist die diastolische Perfusionszeit, in der ein Blutfluss durch die Koronararterien gegen einen relativ niedrigen Widerstand und darüber eine Sauerstoffversorgung des Myokards stattfinden, bei hoher Schlagrate verkürzt. Damit wird das Auftreten einer myokardialen Ischämie begünstigt [Fox und Ferrari, 2011]. Weiterhin haben verschiedene experimentelle Studien gezeigt, dass mit erhöhter Schlagrate die Entwicklung einer endothelialen Dysfunktion und somit das Auftreten von Atherosklerose begünstigt wird [Nanthen et al., 2013]. Umgekehrt zeigen sich bei niedriger Schlagrate anti-anginale und anti-ischämische Effekte.

Zusammengenommen bekräftigten diese Erkenntnisse die Annahme, dass das Risiko, welches mit einer erhöhten Schlagrate einhergeht, nicht nur statistisch signifikant, sondern auch klinisch relevant ist. Hierdurch wurde die Bedeutung einer medikamentösen Schlagratensenkung in den Mittelpunkt des medizinischen Interesses gerückt.

### 1.2 Es gibt verschiedene Möglichkeiten zur medikamentösen Schlagratensenkung

Derzeit steht eine Vielzahl schlagratensenkender Wirkstoffe zur Verfügung. Die Beta-Adrenorezeptor-Antagonisten (kurz: Betablocker) gehören aufgrund ihrer schlagratensenkenden und antihypertensiven Wirkung zu den am häufigsten verordneten Medikamenten weltweit. Sie werden unter anderem zur Behandlung einer symptomatischen Herzinsuffizienz mit reduzierter systolischer Funktion [Barrese und Taglialatela, 2013], bei koronarer Herzkrankheit und Zustand nach Myokardinfarkt [Kelly und Kelleher, 2000] sowie bei arterieller Hypertonie [Reeder und Hoffmann, 2001] eingesetzt. Häufig verwendete Vertreter dieser Klasse sind Bisoprolol und Metoprolol. Durch ihren kompetitiven Antagonismus an Beta-Adrenorezeptoren bewirken sie eine Hemmung des sympathischen Nervensystems, woraus die Abnahme der kardialen Schlagrate und eine Vasodilatation [Gorre und Vandekerckhove, 2010], aber leider auch eine Vielzahl unerwünschter Wirkungen resultieren. Dazu gehören arterielle Hypotension, Bradykardie [Ramahi, 2000], Verschlechterung einer bestehenden Insulinresistenz [Fonseca et al, 2007], Hyperlipidämie [Krone und Nägele, 1988] und erektile Dysfunktion [Weiss, 1991]. Zentrale Wirkungen wie eine Verschlechterung des Gedächtnisses und der Konzentration, Bronchospasmen und Begünstigung der Progression einer peripheren arteriellen Verschlusskrankheit [Lewis und Lofthouse, 1993] sowie ein Rebound-Effekt beim abrupten Absetzen der Betablocker [Egstrup, 1988] gehören ebenfalls zu den unerwünschten Wirkungen. Hieraus ergeben sich entsprechende Kontraindikationen für den Einsatz von Betablockern, wie zum Beispiel Asthma bronchiale, vorbestehende Bradykardie, atrio-ventrikuläre Überleitungsstörungen und akute Herzinsuffizienz.

Auch andere schlagratensenkende Medikamente sind im klinischen Gebrauch. Hierzu gehören Kalzium-Kanal-Antagonisten, Digitalis-Präparate und Medikamente mit anderen Wirkmechanismen (z. B. Clonidin). Gemeinsam ist diesen Wirkstoffen, dass sie keine isolierte Schlagratensenkung bewirken, sondern Effekte auf verschiedene Zielstrukturen ausüben und somit unerwünschte Wirkungen hervorrufen. Beispielsweise werden Kalzium-Kanal-Antagonisten wie Nifedipin, Diltiazem, Verapamil und Amlodipin aufgrund ihrer schlagratensenkenden und vasodilatativen Wirkung zur Behandlung der arteriellen Hypertonie und ischämischen Herzerkrankung eingesetzt. Es besteht allerdings auch eine Reihe unerwünschter Wirkungen wie Kopfschmerzen, Knöchelödeme, Palpitationen, Verstopfung, Flush sowie ein gesteigertes Risiko für das Auftreten eines Myokardinfarkts bei Verwendung von Nifedipin in Patienten mit Hypertonie, bei Zustand nach Myokardinfarkt oder bei Angina pectoris [Dougall und McLay, 1996].

Das Digitalis-Präparat Digoxin gehört zu den ältesten verwendeten kardialen Medikamenten. Es bewirkt zusätzlich zur Schlagratensenkung eine Steigerung der Kontraktilität von Kardiomyozyten (positive Inotropie). Digoxin hat jedoch eine enge therapeutische Breite, wodurch relativ schnell unerwünschte bis toxische Effekte auftreten können. Dazu zählen gastrointestinale Beschwerden, Herzrhythmusstörungen, Cephalgien, Störungen des zentralen Nervensystems [George, 1983] und Sehstörungen [Hobley und Lawrenson, 1991].

### **1.3 Der HCN-Kanal (*hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated cation channel*) ist das Schrittmacherzentrum des Herzens**

Aufgrund ihrer multiplen Effekte stellen Betablocker und andere schlagratensenkende Wirkstoffe keine hoch-selektiven Medikamente zur Behandlung von Herzerkrankungen dar. Vor über vier Jahrzehnten begann daher die Suche nach einem reinen schlagratensenkenden Medikament. Die Entdeckung des HCN-Kanals (*hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated cation channel*) bot eine neue mögliche Herangehensweise für die Entwicklung eines solchen Wirkstoffs [Gauss, Seifert und Kaupp, 1998].

HCN-Kanäle sind transmembranäre Proteine, die zur Familie der spannungsabhängigen Ionenkanäle gehören [Yu und Catterall, 2004]. Derzeit sind vier Isoformen der HCN-Kanäle bekannt (HCN1 bis HCN4), die im Herzen und im Nervensystem exprimiert werden [Biel et al., 2009]. In atrialen und ventrikulären Myozyten wurde HCN2 als hauptsächlich exprimierte Isoform identifiziert. HCN-Kanäle sind auch im kardialen Erregungsleitungssystem, einschließlich des sinoatrialen Knotens, des atrioventrikulären Knotens und der Purkinje-Fasern, vorhanden,

wobei HCN4 als die vorherrschende Isoform in diesen Zellen angesehen wird [Shi et al., 1999; Dobrzynski et al., 2003].

Der von HCN-Kanälen getragene Ionenstrom wird auch als „Schrittmacher-Strom“ oder  $I_f$  („*funny current*“) bezeichnet, da er an der Bildung der spontanen Kontraktionen von Kardiomyozyten sowie an spontanen rhythmischen Aktivitäten von Nervenzellen beteiligt ist. Hierbei handelt es sich um einen gerichteten, nicht-selektiven Kationen-Einwärtsstrom, der hauptsächlich von  $\text{Na}^+$ - und  $\text{K}^+$ -Ionen getragen wird [Biel et al., 2009].  $I_f$  wurde ursprünglich in Zellen des sinoatrialen Knotens beschrieben, wo er die treibende elektrische Kraft bei der diastolischen Depolarisation darstellt. Durch diese Eigenschaft von  $I_f$  wird ihm eine bedeutende Rolle bei der Entstehung und Regulation der kardialen Schlagrate zugeschrieben [Bucchi et al., 2012]. Weiterhin ist  $I_f$  an der Kontrolle der rhythmischen Aktivität von Nervenzellen und an zahlreichen anderen neuronalen Prozessen beteiligt, einschließlich der Festlegung eines Ruhemembranpotentials, der dendritischen Integration, der synaptischen Transmission, des motorischen Lernens, des Gedächtnisses und der Weiterleitung visueller Signale in der Retina [Biel et al., 2009].

Im Gegensatz zur übrigen Herzmuskulatur ist das Ruhemembranpotential im sinoatrialen Knoten nicht konstant. Hier finden über so genannte „Schrittmacherkanäle“ ständig spontane Änderungen des Membranpotentials statt, denen **drei Ströme** zugrundeliegen: Eine durch den Auswärtsstrom von  $\text{K}^+$ -Ionen bewirkte Hyperpolarisation der Zellmembran mit Potentialen negativer als ca. -50 bis -60 mV führt zur Aktivierung der HCN-Kanäle [DiFrancesco et al., 1986]. Infolgedessen entsteht ein einwärts gerichteter  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -Einwärtsstrom ( $I_f$ ) über dem HCN-Kanal, wodurch eine langsam fortschreitende Depolarisation der Zellmembran bewirkt wird. Die darauffolgende Öffnung spannungsabhängiger Kalziumkanäle bei Potentialen positiver als ca. -55 mV verstärkt die Depolarisation durch die einströmenden Kationen ( $I_{\text{Ca}}$ ). Gleichzeitig öffnen sich Kaliumkanäle, die zu einem Auswärtsstrom von  $\text{K}^+$ -Ionen führen ( $I_{\text{K}}$ ). Dies erlaubt eine Repolarisation der Zellmembran und damit die Beendigung des Aktionspotentials [Irisawa, Brown und Giles, 1993].

Eine weitere Besonderheit der HCN-Kanäle ist, dass eine Steigerung der intrazellulären Konzentration des cyclischen Adenosinmonophosphats (cAMP) zur Änderung der Öffnungskinetik von HCN-Kanälen führt. Hierbei kommt es zu einer direkten, Proteinkinase A-unabhängigen Interaktion von cAMP mit HCN-Kanälen, die eine Verschiebung des Aktivierungspotentials der HCN-Kanäle zu weniger negativen Potentialen und somit einen schnelleren Eintritt der spontanen Depolarisation der Zellmembran bewirkt. Der Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration führt somit zur Beschleunigung der kardialen Schlagrate [DiFrancesco und Tortora, 1991; DiFrancesco und Mangoni, 1994]. Dies erklärt unter anderem

die schlagratensteigernde Wirkung adrenerger Substanzen, die über eine Aktivierung des sympathischen Nervensystems einen Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration hervorrufen.

### 1.4 Ivabradin ist ein selektiver HCN-Kanal-Inhibitor

Aufgrund ihrer bedeutenden Rolle bei der Regulation der rhythmischen Aktivität von kardialen Schrittmacherzellen begann die Suche nach einem Wirkstoff, der eine selektive Hemmung der HCN-Kanäle bewirkt. Am Ende des 20. Jahrhunderts wurde eine neue pharmakologische Klasse spezifischer schlagratensenkender Wirkstoffe entdeckt, die über eine direkte, dosisabhängige Hemmung des HCN-Kanals wirken [Bois et al., 1996]. Als bisher einziger Vertreter dieser Wirkstoffgruppe hat Ivabradin alle klinischen Prüfungen bestanden und ist unter dem Handelsnamen Procoralan® erhältlich.

Ivabradin ist der erste Wirkstoff überhaupt, der eine selektive Schlagratensenkung bewirkt, ohne andere Aspekte der kardiovaskulären Funktion zu verändern. Im Gegensatz zu anderen schlagratensenkenden Medikamenten zeigte Ivabradin keine unerwünschten Effekte auf die kardiale Erregungsweiterleitung, die Kontraktilität der Kardiomyozyten und den peripheren Gefäßtonus [Borer, 2004; DiFrancesco und Camm, 2004]. Die durch Ivabradin vermittelte Schlagratensenkung ist mit einer Steigerung der diastolischen Perfusionszeit verbunden, woraus eine Senkung des myokardialen Sauerstoffverbrauchs bei gleichzeitigem Anstieg des kardialen Schlagvolumens resultiert [Ferrari, Cargnoni und Ceconi, 2006]. Die Auswurfleistung des Herzens wird mithilfe von Ivabradin sogar unter körperlicher Belastung beibehalten [Colin et al., 2003]. Zusätzlich wurde berichtet, dass sich Ivabradin positiv auf das kardiale „Remodelling“ nach einem akuten Myokardinfarkt, auf die koronare Durchblutung [Rognoni et al., 2009] sowie auf das Wachstum von Kollateralarterien und die Plaquegröße beim Vorliegen einer Atherosklerose auswirkt [Baumhäkel et al., 2010; Schirmer et al., 2012].

Die günstigen Effekte von Ivabradin auf Morbidität und Mortalität bei kardiovaskulären Erkrankungen konnten bereits in zahlreichen klinischen Studien nachgewiesen werden. In der BEAUTIFUL-Studie (*Morbidity-mortality Evaluation of the I<sub>f</sub> inhibitor ivabradine in patients with coronary disease and left ventricular dysfunction*) wurde der Effekt von Ivabradin auf die Morbidität und Mortalität bei Patienten mit ischämischer Herzkrankheit und einer ventrikulären Dysfunktion (linksventrikuläre Ejektionsfraktion < 40 %) untersucht. Durch die Gabe von Ivabradin bei einer Schlagrate über 70 SPM konnte im Vergleich zur Placebo-Gruppe das Auftreten von Myokardinfarkten um 36 % und die Erfordernis einer koronaren Revaskularisation um 20 % reduziert werden [Danchin, 2009]. Im Rahmen der SHIFT-Studie (*Systolic Heart failure treatment with I<sub>f</sub> inhibitor ivabradine Trial*) wurden Effektivität und Sicherheit der Behandlung

einer systolischen Herzinsuffizienz (linksventrikuläre Ejektions-fraktion  $\leq 35\%$ , Schlagrate  $\geq 70$  SPM, Sinusrhythmus) mit Ivabradin untersucht. Bei Patienten mit schwerer Herzinsuffizienz bewirkte Ivabradin im Vergleich zur Placebo-Gruppe eine Reduktion des relativen Risikos des kardiovaskulären Todes um 22 %. Ivabradin wurde in der Regel gut toleriert. Die häufigsten unerwünschten Wirkungen waren Bradykardien und Phosphene (d. h. vorübergehende Lichtwahrnehmungen im Sinne isolierter Aufhellungen des Gesichtsfelds). Die Ivabradin-vermittelten Phosphene werden durch einen Kanal in der Retina, der der HCN-Familie sehr ähnlich ist, ausgelöst [Borer et al., 2014].

Aufgrund seiner in zahlreichen Studien gezeigten positiven Effekte ist Ivabradin in Deutschland zugelassen für die Behandlung einer chronischen stabilen Angina pectoris von Patienten, bei denen Betablocker kontraindiziert sind oder zu unerwünschten Wirkungen geführt haben. So kann Ivabradin unter anderem bei Patienten mit einer respiratorischen Insuffizienz eingesetzt werden, bei denen Betablocker kontraindiziert sind [Stieber, 2008]. Außerdem kann es bei Patienten mit einer Schlagrate über 75 SPM bei Sinusrhythmus sowie in Kombination mit Betablockern gegeben werden, wenn die Schlagrate durch den Einsatz von Betablockern allein nicht ausreichend gesenkt werden konnte. Seit 2012 ist Ivabradin zur Behandlung einer chronischen Herzinsuffizienz mit systolischer Dysfunktion bei Sinusrhythmus mit Schlagraten über 75 SPM zugelassen.

### 1.5 Die Regulation der kardialen Schlagrate ist bei Sepsis gestört

Sepsis ist eine mikrobiell hervorgerufene systemische Entzündungsreaktion, die eine Vielzahl an Symptomen bis hin zum Multiorganversagen hervorrufen kann [Cohen, 2002]. Der septische Schock stellt die schwerste Verlaufsform der Sepsis und die häufigste Todesursache bei schwerkranken Patienten dar. Die durchschnittliche Mortalität bei schwerer Sepsis beträgt in Deutschland trotz antibiotischer und intensivmedizinischer Behandlung schätzungsweise 48,4 % [Engel et al., 2007], was den großen Stellenwert der Entwicklung geeigneter Therapiestrategien verdeutlicht.

Bei schwerer Sepsis ist der kardiovaskuläre Status der bestimmende Faktor für das Überleben [Parrillo, 2003]. Es wurde gezeigt, dass die Regulation der Schlagrate bei der Mehrheit kritisch kranker Patienten, die an schwerer Sepsis und septischen Schock leiden, gestört ist. Diese Patienten zeigen sowohl eine inadäquate Tachykardie als auch eine signifikante Reduktion der Schlagratenvariabilität, was ebenfalls mit einer ungünstigen Prognose einhergeht [Garrard, Kontoyannis und Piepoli, 1993]. In einer am Universitäts-klinikum Halle (Saale) durchgeführten prospektiven Beobachtungsstudie wurde die Schlagrate bei Patienten mit Multiorganversagen zum Zeitpunkt der Diagnosestellung bestimmt. Nach 28 Tagen betrug die

Mortalität 61 % bei Patienten mit einer Ausgangsschlagrate von  $\geq 90$  SPM und lediglich 32 % bei einer Schlagrate von  $< 90$  SPM. Die adjustierte Hazard Ratio der 28-Tages-Mortalität betrug 2,30 für Schlagraten  $\geq 90$  SPM im Verhältnis zu Schlagraten  $< 90$  SPM [Hoke et al., 2012]. Patienten mit einer niedrigeren Schlagrate in der Anfangsphase des Multiorganversagens haben somit eine bessere Überlebensrate als Patienten mit einer hohen Schlagrate. Eine gesteigerte Schlagrate stellt somit einen unabhängigen Risikofaktor unter septischen Bedingungen dar.

Die kardiale Dysfunktion bei schwerer Sepsis wird unter anderem einer veränderten Aktivität des sympathischen und parasympathischen Nervensystems zugeschrieben. Dennoch sind die Mechanismen, die zu einer verringerten Schlagratenvariabilität führen, nicht auf das autonome Nervensystem begrenzt. Auch die Aktivität von Ionenkanälen an kardialen Schrittmacherzellen kann im Rahmen einer Sepsis beeinflusst werden [Werdan et al., 2009].

### 1.6 Lipopolysaccharid (LPS) inhibiert die HCN-Kanal-Aktivität

Über die Hälfte der Sepsiserkrankungen (ca. 62 %) werden durch gramnegative Bakterien verursacht [Vincent et al., 2009]. Lipopolysaccharid (LPS) ist Bestandteil der äußeren Zellwand gramnegativer Bakterien und wird als hauptverantwortlich für die Auslösung der myokardialen Depression im Rahmen einer Sepsis angesehen [Zhang und Feng, 2010]. In Wild-Typ-Bakterien kommen verschiedene LPS-Formen vor: S- und R-Form-LPS. Das S-Form-LPS besteht aus dem Lipid A-Anteil, welcher für die endotoxische Aktivität des Moleküls verantwortlich ist, dem Kern und der O-Polysaccharid-Kette (O-Kette), die beim R-Form-LPS fehlt. Beide LPS-Formen sind in der Lage, eine inflammatorische Reaktion auszulösen [Loppnow et al., 1989]. S-Form-LPS ist über seine O-Kette zusätzlich in der Lage, direkt verschiedene Ionenkanäle in immun-kompetenten, neuronalen und kardiovaskulären Zellen zu beeinflussen [Blunck et al., 2001; Wilkinson et al., 1996]. In Kooperation mit einem Grazer Forschungszentrum konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass LPS in isolierten rechtsatrialen Myozyten die Aktivität des Schrittmacherstroms  $I_f$  beeinflusst. Einerseits steigert LPS die Empfänglichkeit des HCN-Kanals für aktivierende betaadrenerge Stimuli, die eine Steigerung der kardialen Schlagrate bewirken, und andererseits inhibiert LPS den HCN-Kanal, was isoliert betrachtet mit einem schlagraten-senkenden Effekt verbunden wäre [Zorn-Pauly et al., 2007]. In weiterführenden Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe mit dem Julius-Bernstein-Institut für Physiologie in Halle (Saale) wurde die Aktivität verschiedener LPS-Typen auf den HCN-Kanal in HEK293-Zellen, die mit dem HCN4-Kanal transfiziert wurden, und in Zellen des sinoatrialen Knotens von Mäusen mithilfe elektrophysiologischer Untersuchungen dargestellt. In diesen Versuchen bewirkte LPS eine Verschiebung der spannungsabhängigen Aktivierungskurve des HCN-Kanals in negativere Bereiche und reduzierte die maximale Leitfähigkeit des HCN-Kanals. Die O-Kette des S-Form-LPS

war dabei für die Interaktion von LPS mit den kardialen Schrittmacherkanälen unabdingbar [Klößner et al., 2011].

Zusammengenommen stellt die Schlagrate einen unabhängigen Risikofaktor für die Mortalität an kardiovaskulären und insbesondere septischen Erkrankungen dar, weshalb der Senkung der kardialen Schlagrate und dem Verständnis der zugrundeliegenden Mechanismen ein großer Stellenwert zukommt. Mithilfe elektrophysiologischer Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass LPS die Aktivität des kardialen Schrittmacherstroms  $I_f$  beeinflusst. Dadurch ist LPS potentiell in der Lage, die diastolische Depolarisation in Schrittmacherzellen zu verlangsamen und so die kardiale Schlagrate und die Schlagratenvariabilität zu beeinflussen. Welche tatsächlichen Konsequenzen die Interaktion von LPS mit HCN-Kanälen auf zellulärer Ebene hat, wurde bisher noch nicht untersucht. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit die Wirkung von LPS auf die Schlagrate isolierter neonataler Rattenkardiomyozyten in Gegenwart und Abwesenheit des selektiven HCN-Kanal-Inhibitors Ivabradin untersucht.

## 2 Zielstellung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die zellulären Auswirkungen der Interaktion von LPS mit kardialen HCN-Kanälen am Modell isolierter, spontan kontrahierender neonataler Rattenkardiomyozyten zu untersuchen. Hiermit sollte gezeigt werden, ob der schlagratensenkende Effekt des selektiven HCN-Kanal-Inhibitors Ivabradin durch die Interaktion von LPS mit HCN-Kanälen verändert wird. Diese Untersuchungen könnten zum Verständnis der Rolle von LPS bei der im Rahmen einer Sepsis gestörten kardialen Funktion beitragen und Aussagen über die Effektivität der Gabe von Ivabradin unter septischen Bedingungen ermöglichen.

Die folgenden Fragestellungen und Hypothesen basieren auf den Ergebnissen vorhergehender Studien unserer Arbeitsgruppe:

1. Kann LPS über die Hemmung der kardialen HCN-Kanäle die spontane rhythmische Aktivität von Kardiomyozyten *in vitro* beeinflussen?
2. Bleibt der schlagratensenkende Effekt des spezifischen HCN-Kanal-Inhibitors Ivabradin in Gegenwart von LPS erhalten?
3. Zeigt LPS bezüglich der Beeinflussung der spontanen rhythmischen Aktivität von Kardiomyozyten Effekte an anderen kardialen Schrittmacherkanälen, insbesondere Kalzium-Kanälen?
4. Kann ein indirekter Effekt von LPS an HCN-Kanälen über eine Änderung der intrazellulären cAMP-Konzentration ausgeschlossen werden?
5. Beeinflussen negativ chronotrope Substanzen wie Ivabradin und Nifedipin die Produktion inflammatorischer Zytokine in Kardiomyozyten?

## 3 Material und Methodik

### 3.1 Zellkulturmaterialien, Medien, Lösungen und Zusätze

Die verwendeten Substanzen und Materialien wurden von nachfolgend genannten Firmen erworben: *Escherichia coli* O111-B4 Lipopolysaccharid (LPS) (L3012), Nifedipin (N7634), (±)-Verapamilhydrochlorid (V4629), Isoprenalin (I5752), Forskolin (F6886) und IBMX stammten von der Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen). Ivabradin (Procoralan®) stammte von der SERVIER Deutschland GmbH (München). Zellfilter (Porengröße 70 µm), 6-Loch-Platten und 175 ml-Gewebekulturflaschen stammten von BD Biosciences (Heidelberg). Die 96-Loch-Platten stammten von TPP Techno Plastic Products AG (Trasadingen, Schweiz). Die 25 cm<sup>2</sup>- und 175 cm<sup>2</sup>-Kulturflaschen, Petrischalen und Gewebekulturröhrchen wurden bei der Greiner Bio-One GmbH (Frickhausen) erworben. Die Mikroreaktionsgefäße stammten von der Eppendorf AG (Hamburg). Der cAMP-Assay-Kit wurde von der New England Biolabs GmbH (Ipswich, England) erworben. Von der Biochrom GmbH (Berlin) wurden RPMI-(*Roswell Park Memorial Institute*)-1640-Medium (*very low endotoxin*), CMRL-(*Connaught Medical Research Laboratories*)-1415-Trockensubstanz, Kollagenase Typ CLS II (C 2-22), L-Glutamin (200 mM), Penicillin / Streptomycin (10.000 IE / 10.000 µg/ml), PBS (*phosphate buffered saline*), Pferde-serum und fetales Kälberserum (FKS) erworben. Von der Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen) stammte BSA (bovines Serum-Albumin, A8412). Alle übrigen Lösungen und Chemikalien wurden bei der Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg), Merck (Darmstadt), Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen), Roth (Karlsruhe) und AppliChem GmbH (Darmstadt) erworben.

**CMRL 1415-Trockensubstanz des verwendeten Zellkulturmediums**

Zur Herstellung von 100 g werden benötigt:

**Aminosäuren**

|         |                  |
|---------|------------------|
| 1,05 g  | L-Alanin         |
| 17,52 g | L-Arginin        |
| 0,35 g  | L-Asparaginsäure |
| 6,27 g  | L-Cystein        |
| 1,10 g  | L-Cystin         |
| 10,23 g | L-Glutamin       |
| 0,35 g  | L-Glutaminsäure  |
| 0,60 g  | Glycin           |
| 1,09 g  | L-Histidin       |
| 0,35 g  | L-Hydroxyprolin  |
| 1,82 g  | L-Isoleucin      |
| 1,82 g  | L-Leucin         |
| 1,65 g  | L-Lysin          |
| 0,53 g  | L-Methionin      |
| 1,12 g  | L-Phenylalanin   |
| 1,05 g  | L-Prolin         |
| 0,42 g  | L-Serin          |
| 1,68 g  | L-Threonin       |
| 0,35 g  | L-Tryptophan     |
| 1,26 g  | L-Tyrosin        |
| 1,61 g  | L-Valin          |

**Vitamine**

|          |                  |
|----------|------------------|
| 1,75 g   | Ascorbinsäure    |
| 0,04 g   | D-Biotin         |
| 18,00 mg | D-Ca-Pantothenat |
| 0,04 g   | Folsäure         |

**pH-Indikator**

|        |              |
|--------|--------------|
| 0,74 g | Phenolrot-Na |
|--------|--------------|

**Deoxynucleoside**

|         |                        |
|---------|------------------------|
| 0,35 g  | Desoxyadenosin         |
| 0,35 g  | Desoxycytidin          |
| 0,35 g  | Desoxyguanosin         |
| 3,50 mg | 5-Methyl-Desoxycytidin |
| 0,35 g  | Thymidin               |

**Proteine**

|        |            |
|--------|------------|
| 0,35 g | Glutathion |
|--------|------------|

**Zucker**

|         |             |
|---------|-------------|
| 17,52 g | D-Galaktose |
| 17,52 g | D-Glukose   |

**Alkohole**

|        |               |
|--------|---------------|
| 0,04 g | Cholinchlorid |
| 0,07 g | I-Inosit      |

**Energieträger**

|        |            |
|--------|------------|
| 7,88 g | Na-Pyruvat |
|--------|------------|

**Enzyme**

|        |                 |
|--------|-----------------|
| 0,04 g | Cocarboxylase   |
| 0,04 g | Codecarboxylase |

**Coenzyme**

|        |      |
|--------|------|
| 0,04 g | FAD  |
| 0,25 g | NAD  |
| 0,04 g | NADP |
| 0,04 g | UTP  |

**CMRL-Grundmedium (pH = 7,4)**

- 2,35 g/l CMRL 1415-Trockenmedium
- 135,00 mM Natriumchlorid / NaCl
- 10,00 mM 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure / HEPES
- 7,50 mM D-Glukose
- 3,50 mM Kaliumchlorid / KCl
- 1,40 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
- 1,30 mM Kalziumchlorid / CaCl
- 0,97 mM Magnesiumsulfat / MgSO<sub>4</sub>
- 0,36 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

**CMRL-Wachstumsmedium (pH = 7,4)**

- 80 ml CMRL-Grundmedium
- 10 ml Pferdeserum
- 10 ml Fetales Kälberserum (FKS)
- 40 mg/l Gernebcin

**Synthetisches CMRL-Medium (pH = 7,4)**

Zusatz der folgenden Substanzen zum CMRL-Grundmedium:

- 25 mg/l Albumin
- 25 mg/l Insulin
- 25 mg/l Transferrin
- 40 mg/l Gernebcin

**PBS-AG1-Lösung (Phosphate buffered saline A / Glukose) (pH = 7,4)**

- 137,0 mM Natriumchlorid / NaCl
- 10,6 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
- 5,0 mM D-Glukose
- 2,7 mM Kaliumchlorid / KCl
- 2,1 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

**Trypsinierungslösung**

Zusatz der folgenden Substanzen zu PBS-AG1-Lösung:

- 0,03 % Kollagenase
- 0,12 % Trypsin

### **Stopplösung zur Konzentrationsbestimmung von Interleukin-6 (IL-6)**

Die folgenden Lösungen wurden zu gleichen Teilen gemischt:

- Dodecylsulfat-Natrium-Salz (100 g/l Milli-Q)
- Dimethylformamid

### **3.2 Isolation und Kultivierung der neonatalen Rattenkardiomyozyten (nRKM)**

Zur Isolation und Anzucht der spontan kontrahierenden Rattenkardiomyozyten wurden für jeden Einzelversuch zwischen 50 und 70 neonatale Wistar-Ratten mit einem maximalen Alter von drei Tagen verwendet. Eine Genehmigung zur Durchführung der Organentnahme lag vor. Die Isolation der Zellen wurde durch die medizinisch-technischen Laborassistentinnen des Instituts für Kardiologie durchgeführt und erfolgte nach der hier beschriebenen Methode [Werdan und Erdmann, 1989]: Die Tiere wurden mittels Pinzette durch Genickbruch getötet, anschließend zur Desinfektion in 70 %-prozentiges vergälltes Ethanol getaucht und an den Extremitäten fixiert. Das Aufschneiden des Thorax mit einem Skalpell ermöglichte die Entnahme der noch schlagenden Herzen, die in einer auf Eis gelagerten und isotonische PBS-AG1-Lösung (pH 7,4) enthaltenden Petrischale gesammelt wurden. Anschließend wurden die gesammelten Herzen mit Hilfe eines Skalpells in kleine Stücke zerlegt, in ein Becherglas mit 10 ml Trypsinierungslösung überführt und im Brutschrank bei 37 °C für 15 Min. (Minuten) gerührt, um Einzelzellen zu erhalten. Der erste Überstand, der einen hohen Anteil an Zellfragmenten, Blutkörperchen und Bindegewebszellen enthielt, wurde verworfen. Die Kardiomyozyten wurden weitere zehn Male mit jeweils 5 ml Trypsinierungslösung für je 10 Min. im Brutschrank gerührt. Die Überstände wurden in kalten Gewebekulturröhrchen, die je 2 ml CMRL-Wachstumsmedium enthielten, gesammelt. Die zehn Gewebekulturröhrchen wurden anschließend 10 Min. bei 1.400 x g (Erdbeschleunigung) und Raumtemperatur zentrifugiert, die Überstände verworfen, die zurück-gebliebenen Pellets in je 5 ml CMRL-Wachstumsmedium resuspendiert und in eine Gewebekulturflasche überführt. Zur Trennung der Zellen von Geweberesten und Zellklumpen wurde die Zellsuspension filtriert (Porengröße 70 µm) und zur Entfernung der Fibroblasten 1,5 Std. (Stunden) bei 37 °C in einer 175 cm<sup>2</sup>-Kulturflasche nach dem Prinzip der „*differential attachment technique*“ inkubiert [Kruse und Patterson, 1973]. Die nicht so schnell adhärierenden nRKM wurden hierdurch von den schneller adhärierenden Fibroblasten getrennt und in ein Becherglas überführt. Die Zelldichte wurde unter Lebendzellzählung mit Trypanblau in einer Neubauer-Zählkammer ermittelt. Abschließend wurde die Zellsuspension in CMRL-Wachstumsmedium in 6-Loch-Platten (3 ml) eingefüttert ( $1,2 \times 10^5$  Zellen/cm<sup>2</sup>). Die so isolierten und ausgesäten nRKM wurden bei 37 °C im Brutschrank (Typ B12, Heraeus, Hanau) inkubiert.

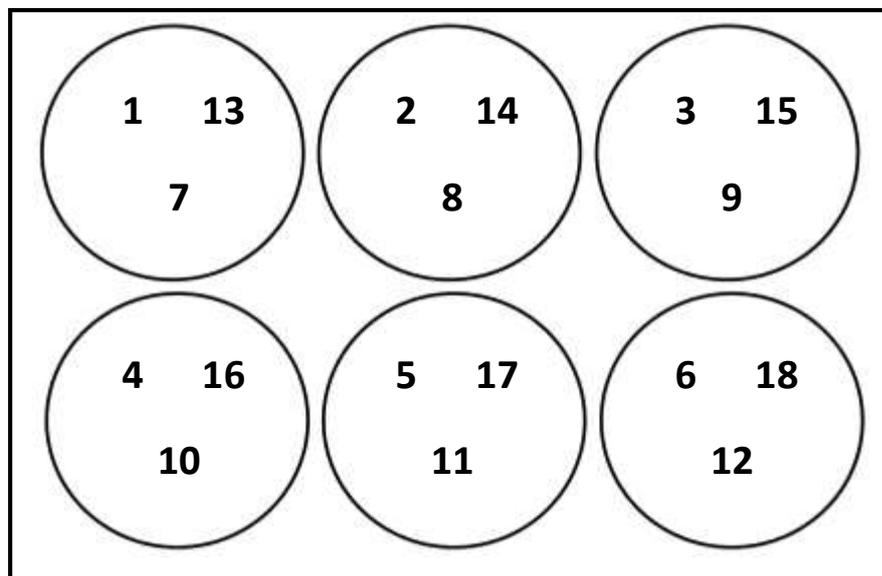
Die Zellen adhärten während dieser Zeit am Boden der Kulturgefäße und begannen in der Regel innerhalb von 24 Std. spontan zu kontrahieren. Nach 24 Std. wurden die Zellkulturen zweimal mit je 3 ml CMRL-Wachstumsmedium gewaschen, anschließend mit serumfreiem synthetischen CMRL-Medium versehen und weiter inkubiert.

#### **3.3 Zusatz der Reagenzien und Schlagratenmessung**

Am zweiten Tag nach der Isolation der nRKM wurden die verschiedenen Testreagenzien zugesetzt. Nach Überprüfung der spontan kontrahierenden Zellkulturen im Mikroskop wurden die Zellen zweimal mit frischem CMRL-Grundmedium (jeweils 3 ml pro Loch) unter vorsichtigem Schwenken der 6-Loch-Platten gewaschen. Anschließend wurde das Medium durch synthetisches CMRL-Medium (jeweils 1,5 ml pro Loch) ersetzt, um das Austrocknen der Zellen zu verhindern. Die Reagenzien wurden in synthetischem CMRL-Medium vorbereitet und in die Löcher hinzugegeben, so dass sich am Ende pro Loch 3 ml Nährmedium mit den gewünschten Konzentrationen der Reagenzien befanden. Es wurden folgende Endkonzentrationen der Reagenzien verwendet: Ivabradin 5 bis 25 µg/ml, Nifedipin 0,025 bis 2,5 µM, Verapamil 0,001 bis 1 µM, LPS 100 ng/ml, Isoprenalin 10 µM und Forskolin 10 µM. Generell wurden die Zellen so behandelt, dass pro Experiment jede Bedingung in zwei Löchern der 6-Loch-Platten vertreten war (Duplikate). In einem Experiment lagen die einzelnen Bedingungen als Triplikate vor. Das Waschen der Zellen und die Zugabe der Reagenzien zu den nRKM erfolgten mit einem Abstand von 30 Min. zwischen jeder 6-Loch-Platte. So wurde gewährleistet, dass die Reagenzien bei den anschließend stattfindenden Schlagratenmessungen eine vergleichbare Einwirkzeit auf die nRKM hatten, da für die Bestimmung der Schlagraten pro 6-Loch-Platte ca. 30 Min. benötigt wurden. In der Zwischenzeit wurden die Reagenzien in einem lichtgeschützten Raum aufbewahrt und vor jeder Zugabe zu den nRKM im Wasserbad auf ca. 37 °C erwärmt. Bis zum Beginn der Schlagratenmessungen wurden die Kulturplatten erneut bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

Die Schlagratenmessungen in den nRKM-Kulturen fanden 3, 24, 48 und 72 Std. nach Zugabe der Reagenzien statt. Diese Zeitpunkte werden im Folgenden als „Inkubationszeit“ bezeichnet. Die 6-Loch-Platten wurden nacheinander in das vorgeheizte Mikroskop gebracht, in dem eine konstante Temperatur von 37 °C aufrechterhalten wurde. Unter Berücksichtigung der Lichtempfindlichkeit einzelner Substanzen fanden die Messungen in einem abgedunkelten Raum unter größtmöglichem Lichtausschluss statt. Zunächst wurden pro Loch sechs Gesichtsfelder für maximal 6 Sek. (Sekunden) betrachtet und das Schlagverhalten und Aussehen der Zellen dokumentiert. Die Kontraktionsmessung wurde mithilfe einer am Mikroskop angeschlossenen Kamera durchgeführt, über die die Kontraktionen der nRKM mithilfe eines

photoelektrischen Systems für 72 Sek. pro Messung aufgezeichnet wurden. Hierbei wurden die Kontraktionen pro Loch in jeweils drei Bereichen gemessen, wobei zum Zwecke der Vergleichbarkeit zunächst in jedem Loch die erste Schlagratenmessung durchgeführt wurde und anschließend in der gleichen Reihenfolge die zweite und die dritte (**Abbildung 1**). Durch die speziell zu diesem Zweck vom Zentrum für Medizinische Grundlagenforschung in Halle programmierte „LabView“-Software wurden die Kontraktionen dargestellt und die Schlagrate, Kontraktionsamplitude und Parameter der Schlagraten-variabilität (pNN50, RMSSD, SDNN, RR und VK) ermittelt [Lehnich et al., 2001]. Alle Messungen wurden auf einem digitalen Speichermedium aufgezeichnet.



**Abbildung 1: Messreihenfolge in den 6-Loch-Platten.** Spontan kontrahierende neonatale Rattenkardiomyozyten (nRKM) wurden auf 6-Loch-Platten kultiviert. Die Kontraktionen der nRKM wurden mithilfe eines photoelektrischen Systems für die Dauer von 72 Sekunden pro Messung aufgezeichnet. Hierzu wurden die Kontraktionen pro Loch in jeweils drei Bereichen gemessen. Die erste Schlagratenmessung erfolgte nacheinander in jedem Loch einer 6-Loch-Platte (1 bis 6). Daraufhin wurden in der gleichen Reihenfolge das zweite (7 bis 12) und anschließend das dritte Gesichtsfeld in allen Löchern vermessen (13 bis 18).

### 3.4 Abnahme der Überstände und Lysierung der Kardiomyozyten

Die Überstände der nRKM-Kulturen wurden nach 24 und 72 Std. Inkubationszeit abgenommen. Zum Ernten der Überstände nach 24 Std. wurden aus den Löchern der 6-Loch-Platten je 0,5 ml Kulturmedium in ein Eppendorf-Gefäß überführt und zentrifugiert (10 Min., 500 x g, Raumtemperatur). Anschließend wurden je 0,45 ml der Überstände unter Zusatz von 2 % BSA (10 mg/ml) bei -20 °C eingefroren. Nach 72 Std. Inkubationszeit wurde das gesamte in den

nRKM-Kulturen verbliebene Medium abgenommen, zentrifugiert und je 1 ml Überstand unter Zusatz von 2 % BSA eingefroren.

Zur Bestimmung der intrazellulären Konzentration des cyclischen Adenosinmonophosphats (cAMP) fand eine Lysierung einiger nRKM-Kulturen statt. Dabei wurden die nach der o. g. Prozedur kultivierten nRKM am zweiten Kultivierungstag 30 Min. mit IBMX (3-Isobutyl-1-methylxanthin, 1 mM) vorinkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe der Reagenzien. 10 Min. bzw. 24 Std. später wurden die nRKM lysiert. Hierzu wurden die Zellen zunächst zur Entfernung des Kulturmediums zweimal mit je 3 ml kaltem PBS gewaschen. Anschließend wurden sie mit Lysepuffer (40 µl/cm<sup>2</sup>) aus dem cAMP-Assay-Kit der *New England Biolabs GmbH* (Ipswich, England) 5 Min. auf Eis inkubiert, mittels Schaber vom Boden der Kulturgefäße gelöst und in vorgekühlte Eppendorf-Gefäße überführt. Nach Behandlung im Ultraschallbad erfolgte eine 10-minütige Zentrifugation (14.000 x g, 4 °C). Die Überstände wurden abgenommen und bei -20 °C eingefroren.

#### **3.5 Bestimmung der Interleukin-6-(IL-6)-Aktivität**

Die Bestimmung der Interleukin-6-(IL-6)-Konzentration in den Überständen der nRKM-Kulturen erfolgte mit Hilfe eines biologischen Testsystems. Verwendet wurden Lymphozyten einer IL-6-abhängigen murinen B-Zell-Linie (7TD1-Zellen) [Van Snick et al., 1986]. Die 7TD1-Zellen wurden im CO<sub>2</sub>-Brutschrank (Heraeus, Hanau) in 25 cm<sup>2</sup>-Kulturflaschen inkubiert und dreimal wöchentlich subkultiviert. Dazu wurden in 8 ml RPMI-Kulturmedium (RPMI-1640 Medium + 10 % FKS + 2 % AG [Antibiotika-L-Glutamin]) 400.000 Zellen bei zweitägiger Kultivierungszeit bzw. 200.000 Zellen bei dreitägiger Kultivierungszeit eingefüttert. Bei jeder Subkultivierung wurden β-Mercaptoethanol (50 µM) und IL-6 (100 pg/ml) zugesetzt.

Für die IL-6-Bestimmung in den nRKM-Kulturen wurden 96-Loch-Platten verwendet. In jedes Loch wurde Verdünnungsmedium (50 µl; RPMI-1640 Medium + 2 % AG + 2 % FKS) pipettiert. In die oberste Reihe der Platten wurden 17 µl Probe bzw. IL-6-Standardlösung (10 ng/ml) hinzugefügt und in 1:4-Verdünnungsschritten verdünnt. Die 7TD1-Zellen wurden dreimal zentrifugiert (111 x g, 10 Min., 20 °C) und nach jeder Zentrifugation in IL-6-freies Medium (RPMI-1640 Medium + 2 % AG) überführt. Nach Zellzählung in einer Neubauer-Zählkammer wurden in RPMI-1640 Medium 30.000 Zellen/ml + 2 % AG + 18 % FKS + β-Mercaptoethanol (2 µl/ml) gegeben und 50 µl dieser Zellsuspension in jedes Loch pipettiert. Daraufhin wurden die 96-Loch-Platten für 72 Std. im CO<sub>2</sub>-Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden 10 µl MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid) in jedes Loch pipettiert. Nach vierstündiger Inkubation im CO<sub>2</sub>-Brutschrank wurde die Reaktion mit 100 µl Stopplösung gestoppt. Zum Auflösen der entstandenen Farbkristalle wurden die Platten über

Nacht auf einen Schüttler (Heidolph, Titramax 1000) gestellt. Am nächsten Tag fand die Extinktionsmessung (Tecan Spectra Fluor) bei 570 nm statt.

Die IL-6-Konzentration wurde mit Hilfe einer ED<sub>50</sub>-Analyse ermittelt. Die mittlere effektive Dosis (ED<sub>50</sub>) bezeichnet die Konzentration einer Substanz, bei der *in vitro* eine halbmaximale Aktivierung beobachtet werden kann. In den durchgeführten Versuchen wurden die Extinktionsmessungen der Proben mit einem rekombinanten IL-6-Standard verglichen, der als Grundlage zur Berechnung der IL-6-Konzentration diente.

#### **3.6 Konzentrationsmessung des cyclischen Adenosinmonophosphats (cAMP)**

Verwendet wurde ein kompetitiver cAMP-Assay-Kit der *New England Biolabs GmbH* (Ipswich, England). Dazu wurden 50 µl an Meerrettichperoxidase gebundene Target-Lösung in jedes Loch einer 96-Loch-Platte pipettiert. Anschließend wurden jeweils 50 µl der lysierten nRKM bzw. ein cAMP-Standard (0,3 nM bis 240 nM) dazugegeben und die Platten 3 Std. auf einem Schüttler im Dunkeln inkubiert. Dann wurde jedes Loch viermal mit jeweils 200 µl Wasch-Puffer aus dem cAMP-Assay-Kit gewaschen. Es wurden 100 µl Tetramethylbenzidin-Substrat-Lösung in jedes Loch pipettiert und die Platte erneut für 30 Min. im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von je 100 µl Stopplösung erfolgte die Extinktionsmessung bei 450 nm.

#### **3.7 Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mithilfe der Statistiksoftware „*IBM SPSS Statistics Version 19*“. Insgesamt fanden zweiundzwanzig Einzelexperimente mit nRKM statt. Aufgrund des Versuchsaufbaus sind in jedem Experiment maximal sechs bzw. bei einem Experiment neun Schlagratenmessungen pro Bedingung erfolgt. Die Ergebnisse von mehreren Einzelexperimenten wurden zusammengefasst und als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler dargestellt. Signifikanzen zum Vergleich zweier Bedingungen wurden mit dem Mann-Whitney-Test berechnet (Signifikanzniveau: 5 %).

## 4 Ergebnisse

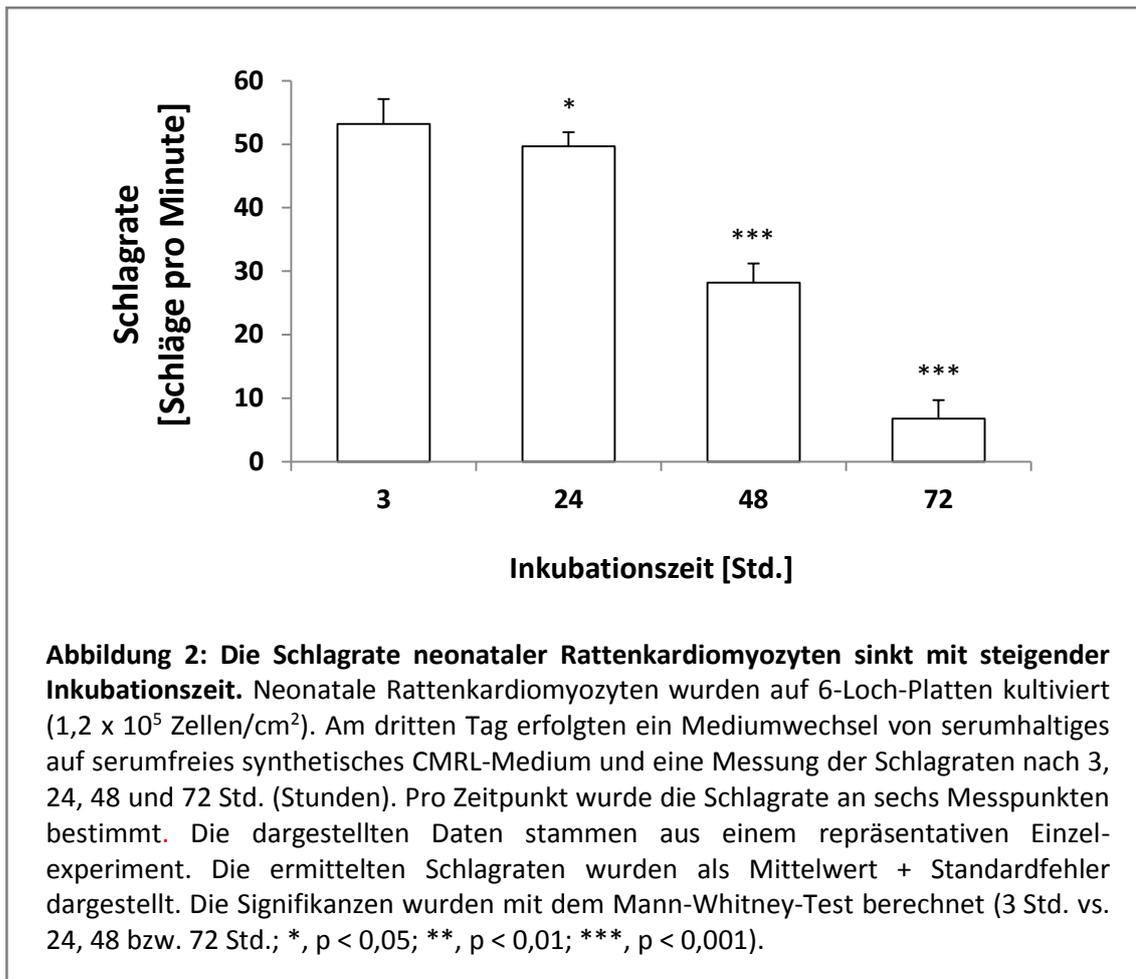
Lipopolysaccharide (LPS) beeinflussen im Rahmen bestimmter Erkrankungen die kardiale Schlagrate (siehe Seite 7). Sie tun dies sowohl über eine Beeinflussung des autonomen Nervensystems als auch über direkte Effekte an den HCN-Kanälen. Wie die hemmende Wirkung von LPS auf die HCN-Kanäle auf funktioneller Ebene reguliert wird, ist noch unklar. Ein Einfluss auf die spontane rhythmische Aktivität kultivierter Kardiomyozyten wurde bisher noch nicht gezeigt. Daher fanden in der vorliegenden Arbeit *in vitro*-Schlagratenmessungen an spontan kontrahierenden Kardiomyozyten, die von neonatalen Ratten isoliert wurden, statt.

### 4.1 Die Schlagrate kultivierter Kardiomyozyten lässt sich durch eine Änderung der Kultivierungsbedingungen beeinflussen

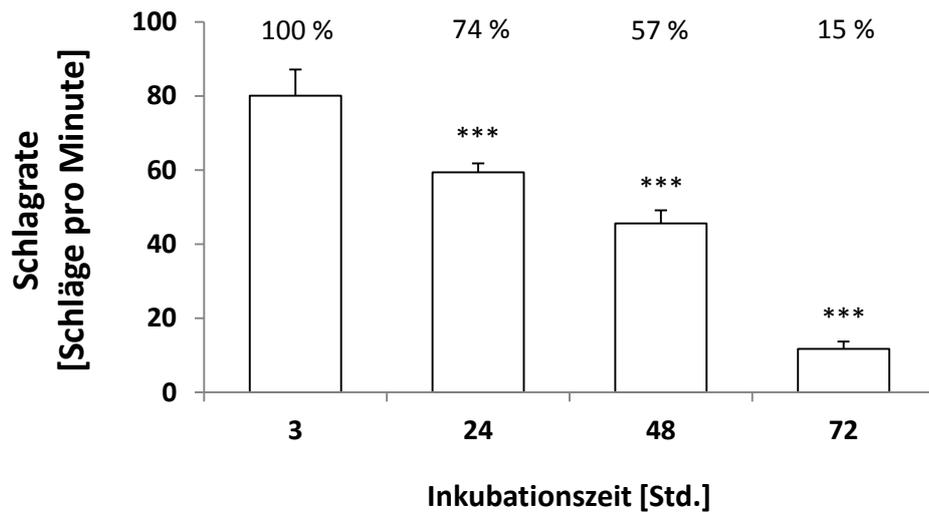
Zunächst sollte gezeigt werden, wie sich die Schlagrate neonataler Rattenkardiomyozyten (nRKM) im vorliegenden Testsystem bei Variierung der Inkubationszeit und nach Zusatz chronotroper Substanzen verändert.

#### 4.1.1 Die Schlagrate ist abhängig von der Inkubationszeit

Um Aussagen über mögliche Auswirkungen der Inkubationszeit auf die Schlagrate von nRKM treffen zu können, fanden Schlagratenmessungen an unbehandelten nRKM zu unterschiedlichen Zeitpunkten (nach 3, 24, 48 und 72 Std. [Stunden]) statt. In **Abbildung 2** sind die Ergebnisse eines repräsentativen Einzelexperimentes dargestellt. Hier zeigte sich bei einer Ausgangsschlagrate von  $53 \pm 4$  Schlägen pro Minute (SPM) nach 3 Std. Inkubationszeit ein Absinken der Schlagrate mit zunehmender Inkubationszeit. Nach 24 Std. betrug die Schlagrate  $50 \pm 2$  SPM, nach 48 Std.  $28 \pm 3$  SPM und nach 72 Std.  $7 \pm 3$  SPM.



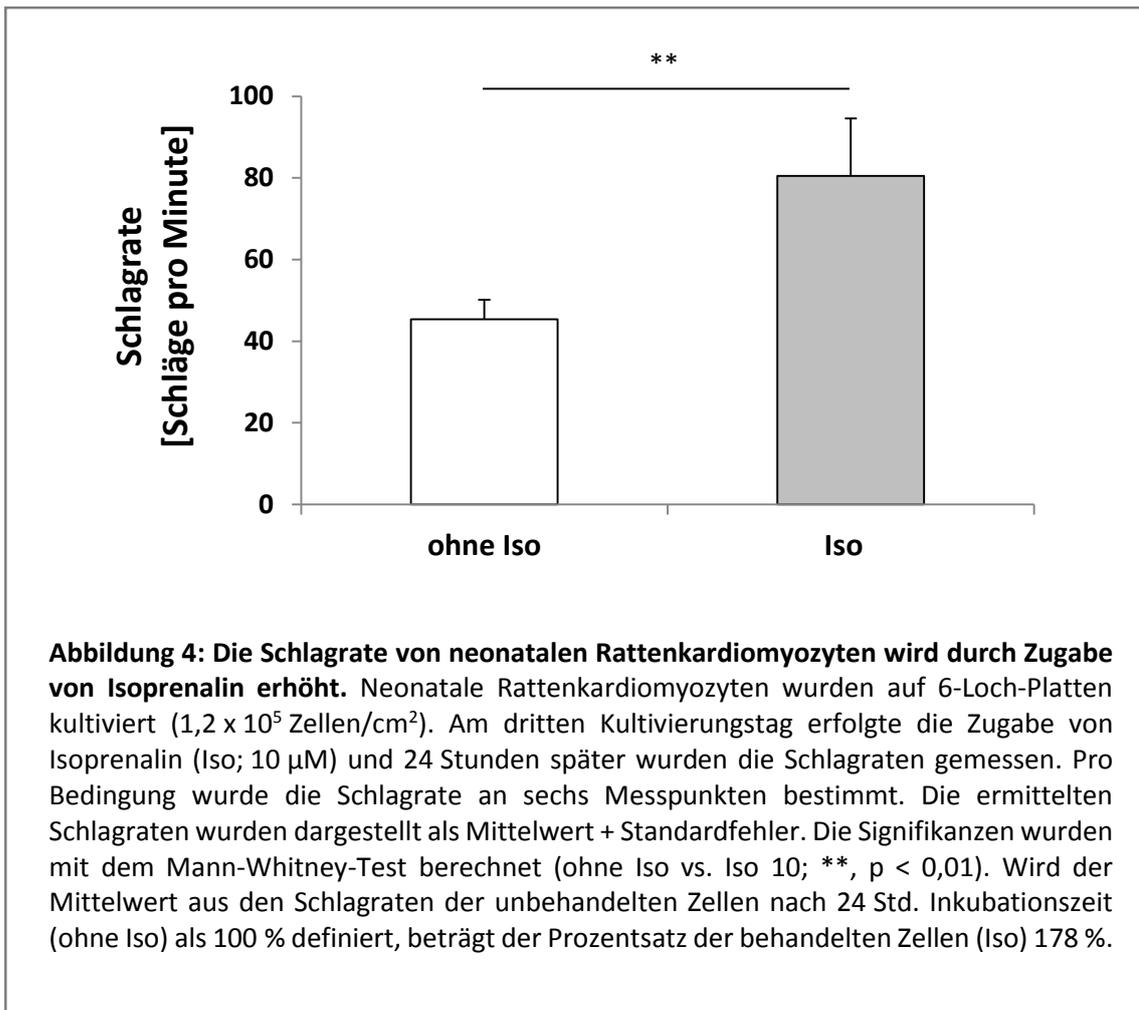
Um die o. g. Daten (siehe **Abbildung 2**) eingehend zu analysieren, wurden die Schlagraten aus 14 Einzelexperimenten zusammengefasst (**Abbildung 3**). Unbehandelte nRKM kontrahierten nach 3 Std. Inkubationszeit mit einer durchschnittlichen Schlagrate von  $80 \pm 7$  SPM. Die Schlagrate sank mit zunehmender Inkubationszeit ab auf  $59 \pm 2$  SPM (nach 24 Std.), auf  $46 \pm 4$  SPM (nach 48 Std.) bzw. auf  $12 \pm 2$  SPM (nach 72 Std.). Diese Daten bedeuten ein prozentuales Absinken im Vergleich zu der nach 3 Std. gemessenen Schlagrate auf 74 %, 57 % bzw. 15 %. Mit zunehmender Inkubationszeit ist somit in unbehandelten nRKM ein Absinken der Schlagrate messbar. Um eine möglichst hohe Ausgangsschlagrate unbehandelter Zellen bei geringem Standardfehler der Schlagraten, die zur gleichen Inkubationszeit gemessen wurden, zu erreichen, wurden zukünftige Messungen der Schlagrate hauptsächlich nach 24 Std. Inkubationszeit durchgeführt.



**Abbildung 3: Die Schlagrate neonataler Rattenkardiomyozyten sinkt mit zunehmender Inkubationszeit.** Kultivierung und Schlagratenmessung der neonatalen Rattenkardiomyozyten fanden wie in Abbildung 2 beschrieben statt. Die dargestellten Daten sind eine Zusammenfassung von 14 unabhängigen Experimenten mit unterschiedlichen Präparationen. Dabei wurden nicht alle Zeitpunkte in allen Experimenten gemessen: es fanden Messungen nach 3 Std. (Stunden; n = 11), nach 24 Std. (n = 14), nach 48 Std. (n = 6) und nach 72 Std. (n = 5) statt, wobei n die Anzahl der Experimente ist. Die ermittelten Schlagraten wurden dargestellt als Mittelwert + Standardfehler. Die Signifikanzen wurden mit dem Mann-Whitney-Test berechnet (3 Std. vs. 24, 48 bzw. 72 Std.; \*\*\*,  $p < 0,001$ ). Der Mittelwert der nach 3 Std. gemessenen Schlagrate wurde als 100 % definiert. Die anderen Angaben entsprechen dem Prozentsatz davon.

#### 4.1.2 Die Schlagrate wird durch Zugabe positiv chronotroper Substanzen erhöht

Die Schlagrate kultivierter nRKM reduzierte sich, wie oben gezeigt (siehe **Abbildung 3**), in Abhängigkeit von der Inkubationszeit. Andere mögliche Einflussfaktoren, die die Schlagrate kultivierter nRKM ändern, sind chronotrope Substanzen. Um darzustellen, wie sich die Schlagrate im vorliegenden Testsystem durch Zugabe positiv chronotroper Substanzen beeinflussen lässt, wurden die Zellen mit dem Sympathomimetikum Isoprenalin stimuliert. In **Abbildung 4** sind die Ergebnisse eines repräsentativen Einzelexperiments dargestellt. Die Schlagrate un behandelter nRKM betrug nach 24 Std. Inkubationszeit  $45 \pm 5$  SPM. Die Zugabe von Isoprenalin, einer positiv chronotropen Substanz, erhöhte die Schlagrate auf  $81 \pm 14$  SPM, was einer Steigerung der Schlagrate um 78 % im Vergleich zu unstimulierten Zellen entspricht. Die Daten legen nahe, dass im vorliegenden Testsystem eine Änderung der Schlagrate durch die Zugabe chronotroper Substanzen bewirkt werden kann.



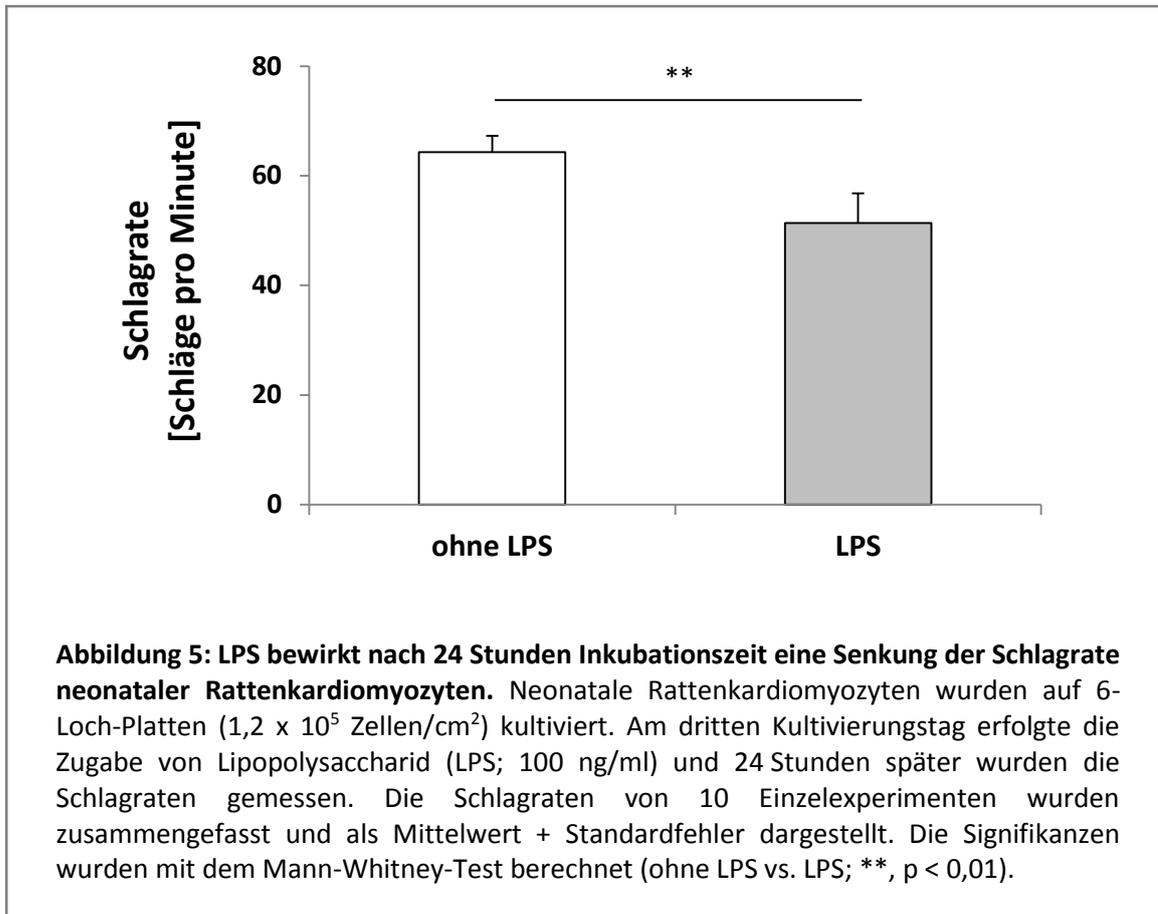
#### 4.2 Die schlagratensenkende Wirkung von LPS und Ivabradin auf kultivierte nRKM wird über den gleichen Weg vermittelt

Hauptverantwortlich für die Bildung des kardialen Schrittmacherpotentials sind HCN-Kanäle [Bucchi et al., 2012]. In diesem Abschnitt wird untersucht, ob LPS einzeln und in Kombination mit dem spezifischen HCN-Kanal-Inhibitor Ivabradin die Schlagrate kultivierter Kardiomyozyten beeinflusst. Damit sollte gezeigt werden, ob LPS und Ivabradin bezüglich der Schlagratensenkung über den gleichen Weg, d. h. über den kardialen HCN-Kanal, wirken.

##### 4.2.1 LPS bewirkt eine Senkung der Schlagrate

Es ist bekannt, dass LPS die Aktivität kardialer HCN-Kanäle inhibiert [Zorn-Pauly, 2007; Klöckner et al., 2011]. Um den Einfluss von LPS auf die Schlagrate neonataler Rattenkardiomyozyten *in vitro* darzustellen, erfolgten eine Zugabe von LPS (100 ng/ml) zu den Zellkulturen und eine anschließende Messung der Schlagrate nach 24-stündiger Inkubationszeit. Eine Zusammenfassung von zehn Einzelexperimenten ist in **Abbildung 5** dargestellt. Im Vergleich zu

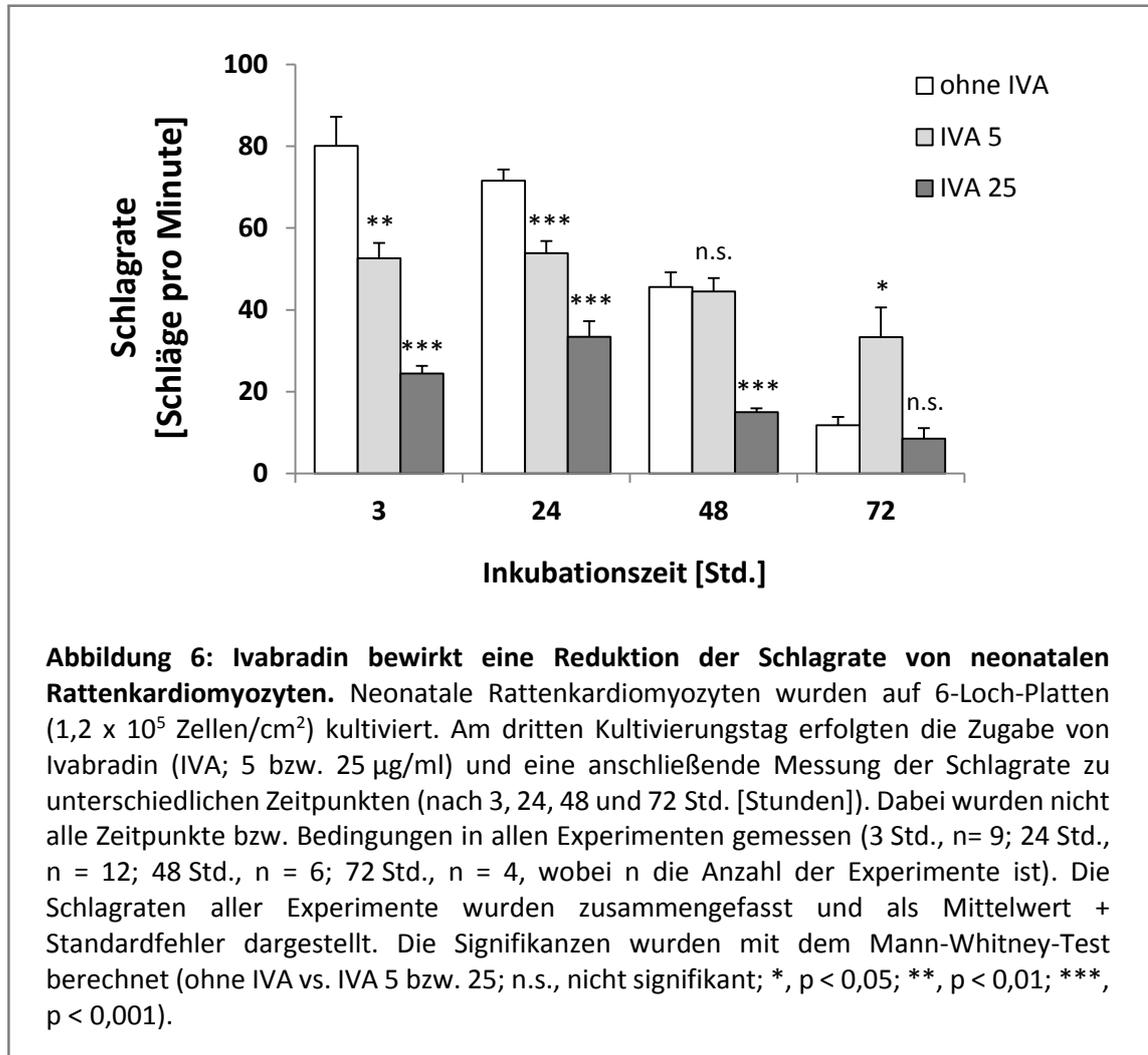
unbehandelten Zellen ( $64 \pm 3$  SPM) reduzierte LPS die Schlagrate auf  $51 \pm 5$  SPM. LPS bewirkte somit im vorliegenden Testsystem eine signifikante Senkung der Schlagrate um 20 %.



#### 4.2.2 Ivabradin bewirkt eine Senkung der Schlagrate

Bei Ivabradin handelt es sich um einen selektiven HCN-Kanal-Inhibitor, der eine Senkung der kardialen Schlagrate im Rahmen verschiedener kardiovaskulärer Erkrankungen bewirkt [DiFrancesco und Camm, 2004]. Um den Einfluss von Ivabradin auf die Schlagrate kultivierter Kardiomyozyten im vorliegenden Testsystem darzustellen, wurden nach Zugabe von Ivabradin zu den Zellkulturen die Schlagraten zu unterschiedlichen Zeitpunkten gemessen. Eine Zusammenfassung von 12 Einzelerperimenten ist in **Abbildung 6** dargestellt. Wie erwartet bewirkten die zwei Ivabradin-Konzentrationen eine Senkung der Schlagrate nach 3, 24 und 48 Std. Inkubationszeit. Die mittlere Schlagrate unbehandelter nRKM betrug nach 24 Std. Inkubationszeit  $72 \pm 3$  SPM. Durch Zugabe von IVA  $5 \mu\text{g/ml}$  wurde die Schlagrate auf  $54 \pm 3$  SPM reduziert, durch Zugabe von IVA  $25 \mu\text{g/ml}$  auf  $33 \pm 4$  SPM. Im Vergleich zum 24 Std.-Wert betrug die mittlere Schlagrate unbehandelter nRKM nach 3 Std. Inkubationszeit  $80 \pm 7$  SPM. Diese Schlagrate wurde durch Zugabe von IVA  $5 \mu\text{g/ml}$  auf  $53 \pm 4$  SPM und durch IVA  $25 \mu\text{g/ml}$  auf  $24 \pm 2$  SPM gesenkt. Nach 48 Std. zeigte sich nur noch bei Ivabradin  $25 \mu\text{g/ml}$  ein negativ

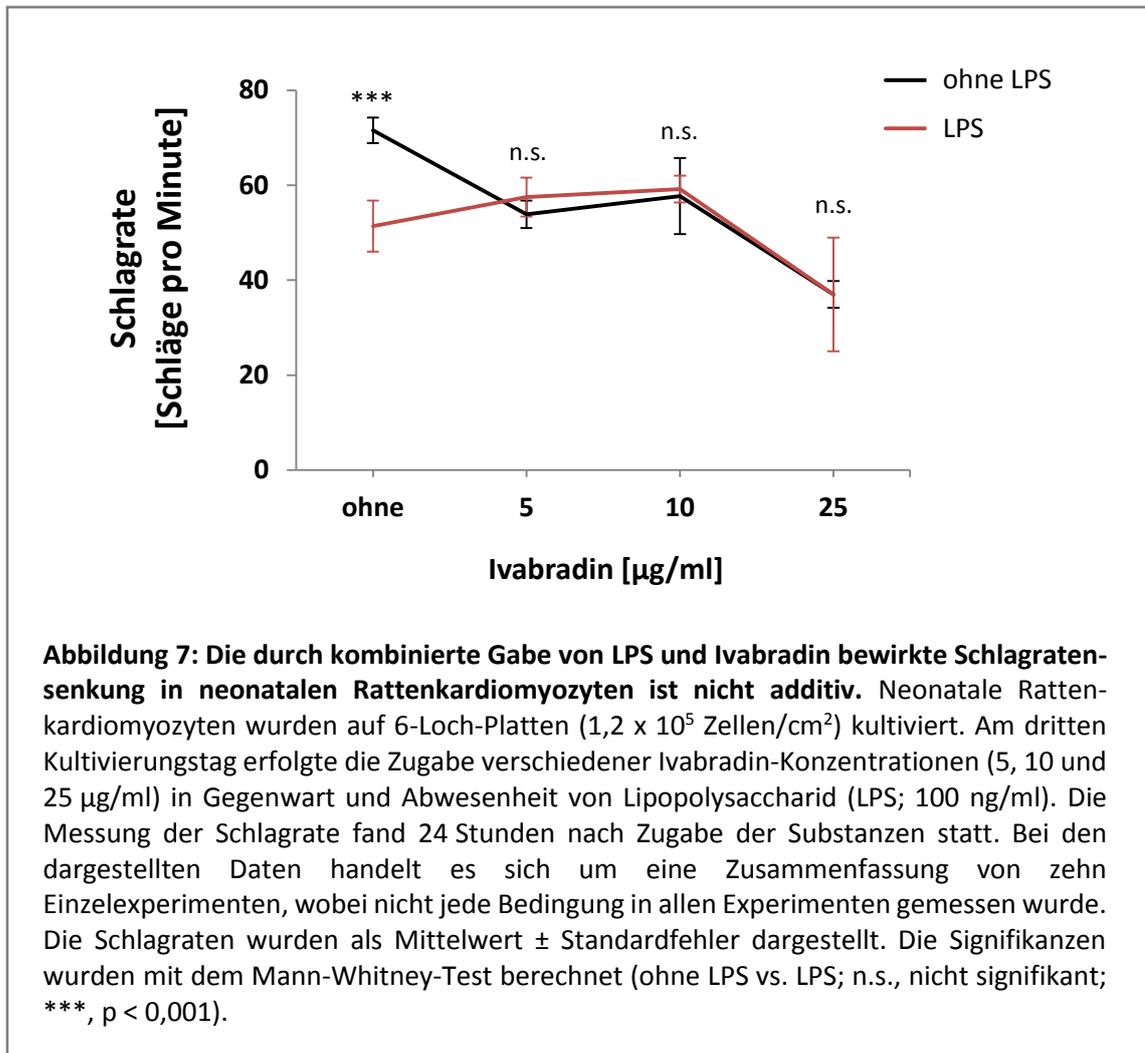
chronotroper Effekt. Es senkte die Schlagrate von  $46 \pm 7$  SPM (ohne IVA) auf  $15 \pm 1$  SPM. Nach einer Inkubationszeit von 72 Std. wurde in keiner Bedingung eine signifikante Senkung der Schlagrate nachgewiesen.



#### 4.2.3 Die Co-Inkubation kultivierter Kardiomyozyten mit LPS und Ivabradin bewirkt keine additive Senkung der Schlagrate

Wie oben gezeigt (siehe **Abbildung 5**), lässt sich nach 24 Std. Inkubationszeit ein signifikanter negativ chronotroper Effekt von LPS nachweisen. Es sollte nun mithilfe des spezifischen HCN-Kanal-Inhibitors Ivabradin durch eine Kompetitionsanalyse die Hypothese überprüft werden, ob LPS bezüglich der Schlagratensenkung mit den kardialen HCN-Kanälen interagiert. Bei Beeinflussung der Schlagrate über unterschiedliche Wege wäre bei Zugabe von LPS zu Ivabradin-behandelten Zellen zu erwarten, dass sich die schlagratensenkenden Effekte beider Substanzen addieren. Demgegenüber wäre bei einer Senkung der Schlagrate über den gleichen Weg kein additiver Effekt bezüglich der Schlagratensenkung zu erwarten.

Um dieses Experiment durchzuführen, fanden Schlagratenmessungen nach Zugabe von drei Ivabradin-Konzentrationen zu nRKM in Gegenwart und Abwesenheit von LPS statt. Die Ergebnisse aus zehn Einzelerperimenten wurden zusammengefasst und in **Abbildung 7** dargestellt. Unbehandelte nRKM schlugen mit einer Schlagrate von  $72 \pm 3$  SPM. Ivabradin (IVA 5, 10 bzw. 25  $\mu\text{g/ml}$ ) reduzierte die Schlagrate um 18 SPM, 14 SPM bzw. 35 SPM im Vergleich zu unbehandelten Zellen (**Abbildung 7, schwarze Linie**). LPS bewirkte eine Reduktion der Schlagrate um 21 SPM. Bei additiver Wirkung beider Substanzen (LPS + IVA 5, 10 bzw. 25  $\mu\text{g/ml}$ ) ergäbe sich somit eine errechnete Schlagratensenkung um 39 SPM, 35 SPM bzw. 56 SPM. Tatsächlich zeigten die Daten bei Kombination von LPS mit Ivabradin eine Reduktion der Schlagrate um 14 SPM, 13 SPM bzw. 35 SPM (**Abbildung 7, rote Linie**). Der schlagratensenkende Effekt von Ivabradin und LPS ist somit bei Kombination beider Substanzen nicht additiv. Diese Daten legen nahe, dass LPS und Ivabradin über den gleichen Weg interagieren und die LPS-bedingte Senkung der Schlagrate möglicherweise über Effekte an den kardialen HCN-Kanälen vermittelt wird.



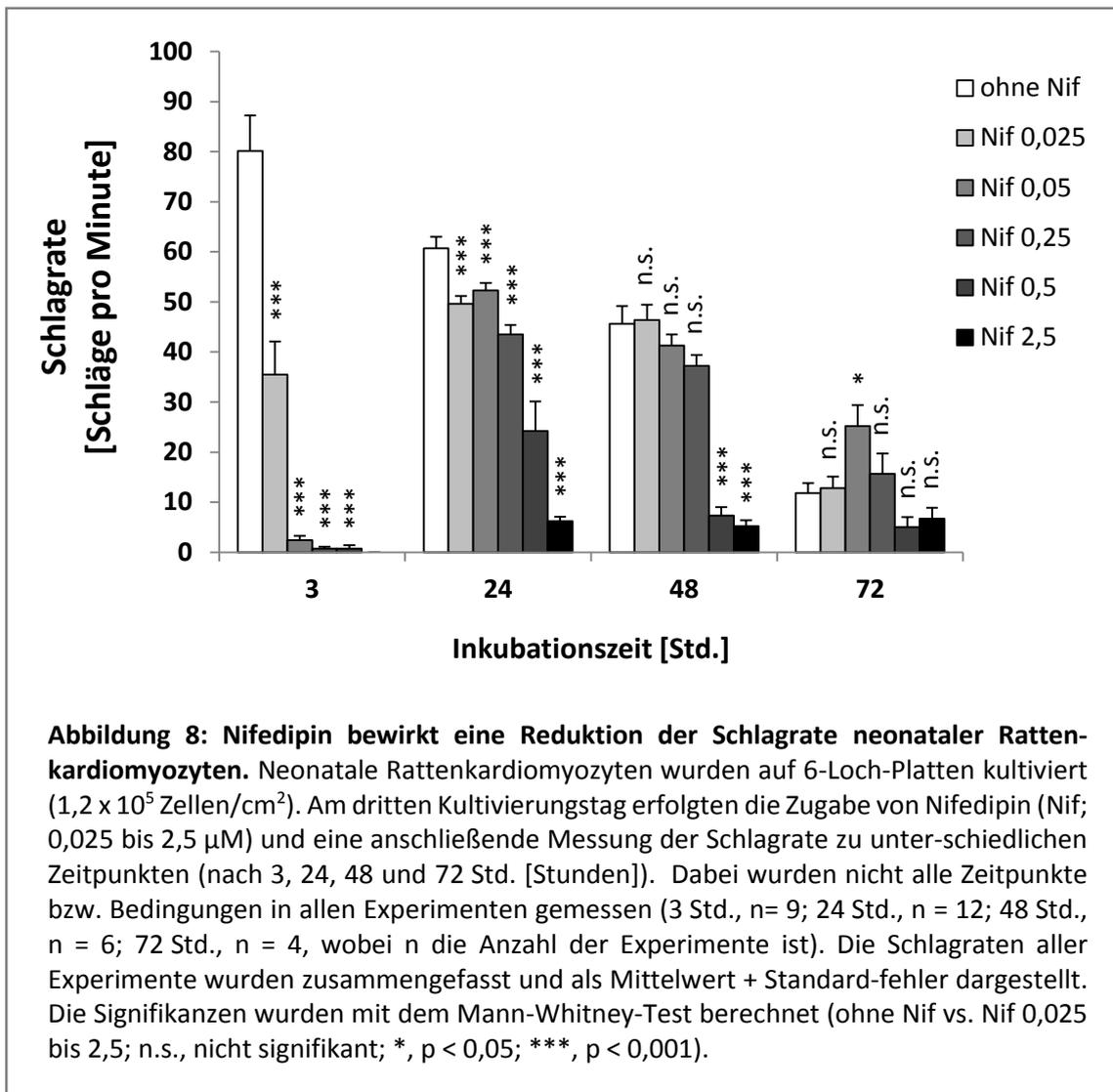
#### 4.3 Die schlagratensenkende Wirkung von LPS und Kalzium-Kanal-Inhibitoren auf kultivierte nRKM ist additiv

Neben den HCN-Kanälen sind auch spannungsabhängige Kalzium-Kanäle an der Bildung des kardialen Schrittmacherpotentials beteiligt. In diesem Abschnitt wird dargestellt, wie LPS einzeln und in Kombination mit den Kalzium-Kanal-Inhibitoren Nifedipin bzw. Verapamil die Schlagrate neonataler Rattenkardiomyozyten beeinflusst. Damit soll gezeigt werden, dass LPS die Schlagrate nicht über Effekte an kardialen Kalzium-Kanälen reduziert. Falls LPS seinen schlagratensenkenden Effekt über Kalzium-Kanäle vermittelt, würde auch hier, wie oben für Ivabradin gezeigt (siehe **Abbildung 7**), kein additiver Effekt zu messen sein.

##### 4.3.1 Nifedipin bewirkt eine dosisabhängige Senkung der Schlagrate

Zur Darstellung der negativ chronotropen Wirkung von Kalzium-Kanal-Inhibitoren auf neonatale Rattenkardiomyozyten erfolgte zunächst die Zugabe von Nifedipin (Nif) zu den Zellkulturen und

eine anschließende Messung der Schlagrate zu unterschiedlichen Zeitpunkten in Abwesenheit von LPS. Wie in **Abbildung 8** dargestellt, bewirkte die Zugabe verschiedener Nifedipin-Konzentrationen eine dosisabhängige Senkung der Schlagrate nach 3, 24 und 48 Std. Inkubationszeit. Die Schlagrate unbehandelter nRKM nach 3 Std. Inkubationszeit betrug  $80 \pm 7$  SPM. Diese Schlagrate wurde durch Zugabe von Nif  $0,025 \mu\text{M}$  auf  $36 \pm 7$  SPM und durch Nif  $0,05 \mu\text{M}$  auf  $2 \pm 1$  SPM gesenkt. Durch höhere Nifedipin-Konzentrationen erfolgte eine nahezu vollständige Inhibition der spontanen Kontraktilität der nRKM. Nach 24 Std. zeigte sich eine durch Nifedipin vermittelte Schlagratensenkung von  $61 \pm 2$  SPM (ohne Nif) auf  $50 \pm 2$  SPM,  $52 \pm 2$  SPM,  $44 \pm 2$  SPM,  $24 \pm 6$  SPM bzw.  $6 \pm 1$  SPM (Nif  $0,025$ ,  $0,05$ ,  $0,25$ ,  $0,5$  bzw.  $2,5 \mu\text{M}$ ). Nach 48 Std. zeigte sich ein negativ chronotroper Effekt von Nifedipin erst ab Nif  $0,5 \mu\text{M}$ . Es erfolgte eine Schlagratensenkung von  $46 \pm 4$  SPM (ohne Nif) auf  $7 \pm 2$  SPM bzw.  $5 \pm 1$  SPM (Nif  $0,5$  bzw.  $2,5 \mu\text{M}$ ). Nach 72 Std. Inkubationszeit wurde in keiner Bedingung eine signifikante Senkung der Schlagrate nachgewiesen.

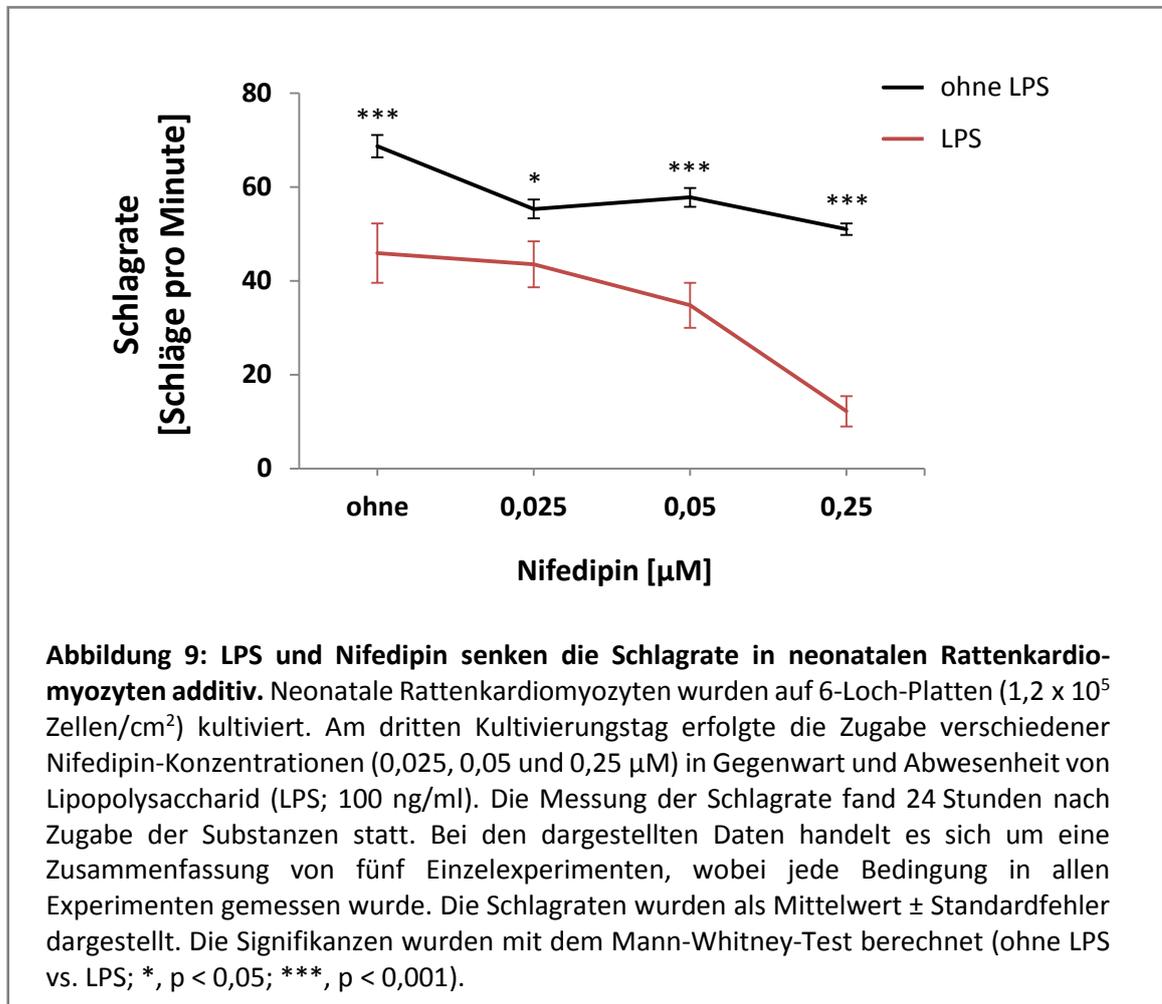


#### 4.3.2 Die Co-Inkubation kultivierter Kardiomyozyten mit LPS und Nifedipin bewirkt eine additive Senkung der Schlagrate

Wie oben gezeigt (siehe **Abbildungen 5 und 8**), reduzierten sowohl LPS als auch Nifedipin nach 24 Std. Inkubationszeit die Schlagrate der nRKM. Es sollte nun mit Hilfe von Nifedipin überprüft werden, ob LPS mit kardialen Kalzium-Kanälen interagiert. Bei Beeinflussung der Schlagrate über unterschiedliche Wege (z. B. HCN- und Kalzium-Kanal) wäre bei Zugabe von LPS zu Nifedipin-behandelten Zellen zu erwarten, dass sich die schlagratensenkenden Effekte beider Substanzen addieren, was im Folgenden als „additiver Effekt“ definiert ist. Demgegenüber wäre bei einer Senkung der Schlagrate über den gleichen Mechanismus, z. B. wenn LPS über den kardialen Kalzium-Kanal wirkt, kein additiver Effekt bezüglich der Schlagratensenkung zu erwarten.

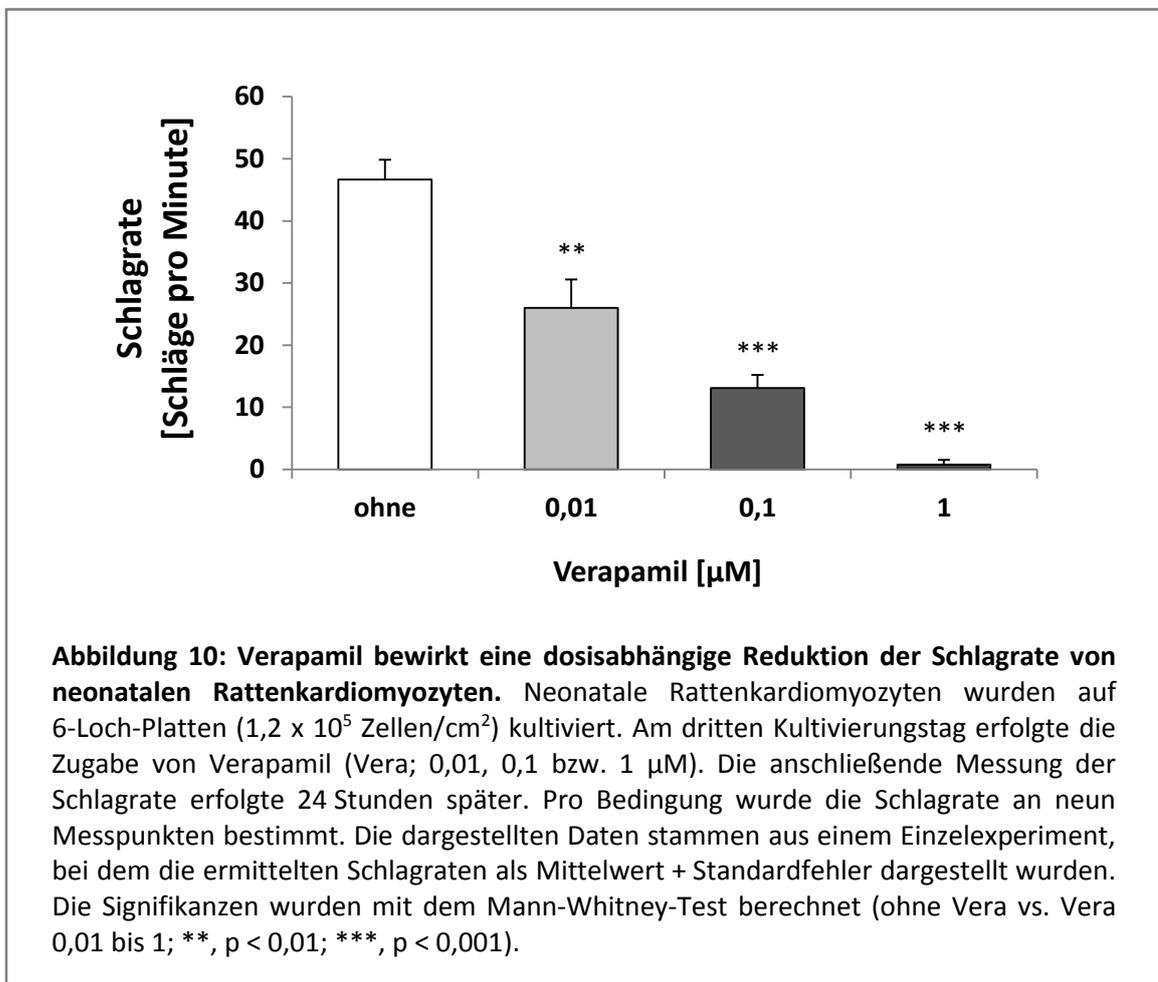
Um dieses Experiment durchzuführen, fanden Schlagratenmessungen nach Zugabe von drei Nifedipin-Konzentrationen zu nRKM in Gegenwart und Abwesenheit von LPS statt. Die

Ergebnisse aus fünf Einzelexperimenten wurden zusammengefasst und in **Abbildung 9** dargestellt. Unbehandelte nRKM schlugen mit einer Schlagrate von  $69 \pm 2$  SPM. Nifedipin (Nif 0,025, 0,05 bzw. 0,25  $\mu\text{M}$ ) reduzierte die Schlagrate um 14 SPM, 11 SPM bzw. 18 SPM im Vergleich zu unbehandelten Zellen (**Abbildung 9, schwarze Linie**). LPS bewirkte eine Reduktion der Schlagrate um 23 SPM. Bei additiver Wirkung beider Substanzen (LPS + Nif 0,025, 0,05 bzw. 0,25  $\mu\text{M}$ ) ergäbe sich somit eine errechnete Schlagratensenkung um 37 SPM, 34 SPM bzw. 41 SPM. Tatsächlich erreichten die Daten bei Kombination von LPS und Nifedipin annähernd diese Reduktion der Schlagrate bzw. übertrafen sie sogar. Gemessen wurde eine Reduktion der Schlagrate um 25 SPM, 34 SPM bzw. 57 SPM (**Abbildung 9, rote Linie**). Diese Daten legen nahe, dass die Beeinflussung der Schlagrate durch LPS nicht über Effekte an den kardialen Kalzium-Kanälen vermittelt wird.



### 4.3.3 Verapamil bewirkt eine dosisabhängige Senkung der Schlagrate

Obwohl Nifedipin im vorliegenden Testsystem eine signifikante Schlagratensenkung von nRKM bewirkte, ist in physiologischen Konzentrationen *in vivo* kein relevanter negativ chronotroper Effekt in humanen Kardiomyozyten zu erwarten [Aoki et al., 1982]. Daher wurden analog zu den oben beschriebenen Experimenten Versuche mit dem stärker kardiotropen Kalzium-Kanal-Inhibitor Verapamil durchgeführt. In **Abbildung 10** sind die Ergebnisse eines repräsentativen Einzelexperiments dargestellt. Hier zeigte sich bei einer Ausgangsschlagrate von  $47 \pm 3$  SPM in unbehandelten Zellen durch Zugabe von Verapamil  $0,01 \mu\text{M}$  eine Reduktion der Schlagrate auf  $26 \pm 5$  SPM und bei Zugabe von Verapamil  $0,1 \mu\text{M}$  auf  $13 \pm 2$  SPM. Durch eine höhere Verapamil-Konzentration erfolgte eine nahezu vollständige Inhibition der spontanen Kontraktilität der nRKM.

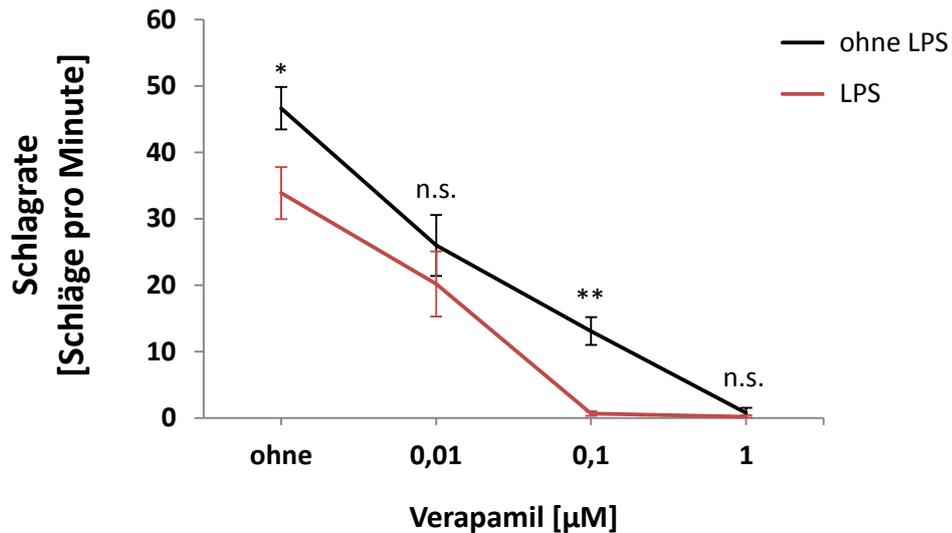


#### **4.3.4 Die Co-Inkubation kultivierter Kardiomyozyten mit LPS und Verapamil bewirkt eine additive Senkung der Schlagrate**

Wie oben gezeigt (siehe **Abbildungen 5 und 10**), haben sowohl LPS als auch Verapamil nach 24 Std. Inkubationszeit einen negativ chronotropen Effekt auf die nRKM. Durch Kombination von LPS mit Verapamil sollte überprüft werden, ob LPS mit kardialen Kalzium-Kanälen interagiert.

Wie in **Abbildung 11** dargestellt, schlugen unbehandelte nRKM mit einer Schlagrate von  $47 \pm 3$  SPM. Verapamil (0,01, 0,1 bzw. 1  $\mu$ M) reduzierte die Schlagrate um 21, 34 bzw. 46 SPM im Vergleich zu den unbehandelten Zellen (**Abbildung 11, schwarze Linie**). LPS (100 ng/ml) bewirkte eine Reduktion der Schlagrate um 13 SPM. Bei additiver Wirkung beider Substanzen (LPS + Verapamil 0,01, 0,1 bzw. 1  $\mu$ M) ergibt sich somit eine berechnete Schlagratensenkung um 34, 47 bzw. 59 SPM. Tatsächlich erreichten die Daten bei Kombination von LPS und Verapamil annähernd diese Reduktion der Schlagrate. Gemessen wurde eine Reduktion der Schlagrate um 27, 46 bzw. 47 SPM (**Abbildung 11, rote Linie**). Bei Kombination von LPS mit Verapamil 0,1  $\mu$ M konnte ein deutlicher additiver Effekt nachgewiesen werden. Die alleinige Zugabe von Verapamil 1  $\mu$ M zu den nRKM führte zu einer fast kompletten Inhibition der Kontraktilität der nRKM. Eine weitere Senkung der Schlagrate bei Zugabe von LPS war daher nicht möglich.

Zusammenfassend ist somit ein additiver Effekt bei Kombination von Verapamil und LPS in der Verapamil-Konzentration, bei der die Kontraktilität der nRKM nach alleiniger Zugabe von Verapamil noch nicht vollständig blockiert war, erkennbar. Diese Daten legen nahe, dass LPS und der Kalzium-Kanal-Inhibitor Verapamil, ebenso wie Nifedipin, nicht über den gleichen Weg wirken und somit die LPS-vermittelte Senkung der kardialen Schlagrate nicht über Effekte an kardialen Kalzium-Kanälen verursacht wird.



**Abbildung 11: Co-Inkubation neonataler Rattenkardiomyozyten mit LPS und Verapamil bewirkt eine additive Senkung der Schlagrate.** Neonatale Rattenkardiomyozyten wurden auf 6-Loch-Platten ( $1,2 \times 10^5$  Zellen/cm<sup>2</sup>) kultiviert. Am dritten Kultivierungstag erfolgte die Zugabe verschiedener Verapamil-Konzentrationen (0,01, 0,1 und 1 µM) in Gegenwart und Abwesenheit von Lipopolysaccharid (LPS; 100 ng/ml). Die Messung der Schlagrate fand 24 Stunden nach Zugabe der Substanzen statt. Pro Bedingung wurde die Schlagrate an neun Messpunkten bestimmt. Die dargestellten Daten stammen aus einem Einzelerperiment, bei dem die ermittelten Schlagraten als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler dargestellt wurden. Die Signifikanzen wurden mit dem Mann-Whitney-Test berechnet (ohne LPS vs. LPS; n.s., nicht signifikant; \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ).

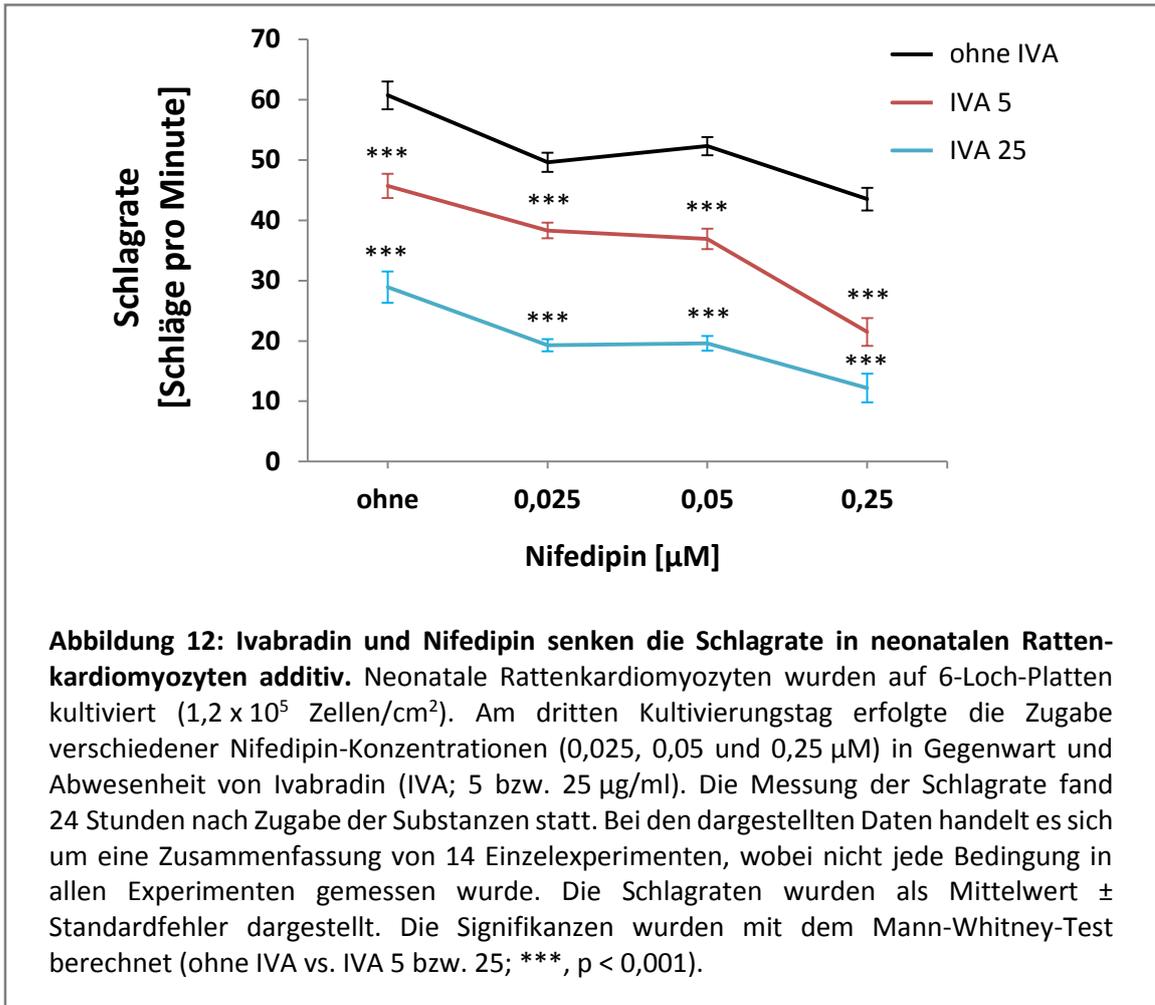
#### 4.4 Die schlagratensenkende Wirkung von Ivabradin und Kalzium-Kanal-Inhibitoren auf kultivierte nRKM ist additiv

Es wurde oben gezeigt, dass LPS und Ivabradin bezüglich der Schlagratensenkung nicht additiv wirkten (siehe **Abbildung 7**), während die Kombination von LPS mit Kalzium-Kanal-Inhibitoren zu einer additiven Senkung der Schlagrate führte (siehe **Abbildungen 9 und 11**). Diese Daten legten nahe, dass die schlagratensenkende Wirkung von LPS über Effekte an den HCN-Kanälen vermittelt wird, jedoch nicht über eine Interaktion von LPS mit kardialen Kalzium-Kanälen. Um Interaktionen der oben verwendeten HCN- und Kalzium-Kanal-Inhibitoren auszuschließen, erfolgten Schlagratenmessungen nach Zugabe von Nifedipin bzw. Verapamil zu Ivabradin-behandelten Zellen.

#### 4.4.1 Die Co-Inkubation kultivierter Kardiomyozyten mit Ivabradin und Nifedipin bewirkt eine additive Senkung der Schlagrate

Hier sollte überprüft werden, ob Nifedipin und Ivabradin die Schlagrate additiv senken, d. h. in nRKM (wie zu erwarten) über unterschiedliche Wege agieren. Bei Beeinflussung der Schlagrate über unterschiedliche Wege wäre bei Zugabe von Nifedipin zu Ivabradin-behandelten Zellen eine additive Wirkung beider Substanzen zu erwarten. Demgegenüber wäre bei einer Senkung der Schlagrate über den gleichen Mechanismus, z. B. den kardialen Kalzium-Kanal, kein additiver Effekt bezüglich der Schlagratensenkung zu erwarten.

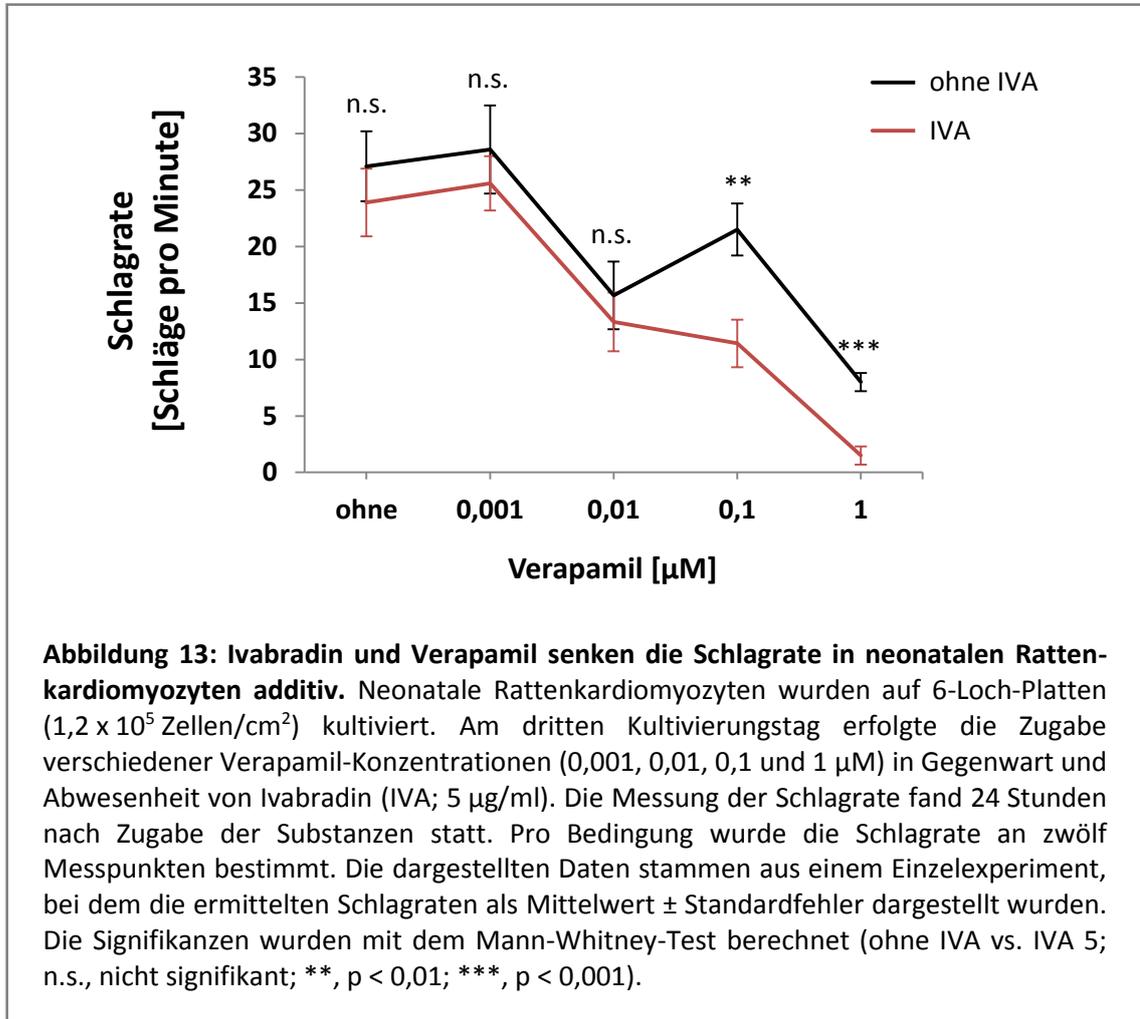
Zur Überprüfung der Hypothese fanden Schlagratenmessungen unter Zugabe von drei Nifedipin-Konzentrationen zu nRKM in Gegenwart und Abwesenheit von Ivabradin statt. Die Ergebnisse aus 14 Einzelexperimenten wurden zusammengefasst und in **Abbildung 12** dargestellt. Unbehandelte nRKM schlugen mit einer Schlagrate von  $61 \pm 2$  SPM. Nifedipin (Nif 0,025, 0,05 bzw. 0,25  $\mu$ M) reduzierte die Schlagrate um 11 SPM, 9 SPM bzw. 17 SPM im Vergleich zu unbehandelten Zellen (**Abbildung 12, schwarze Linie**). Ivabradin (5  $\mu$ g/ml) bewirkte eine Reduktion der Schlagrate um 15 SPM. Bei additiver Wirkung beider Substanzen (IVA 5  $\mu$ g/ml + Nif 0,025, 0,05 bzw. 0,25  $\mu$ M) ergäbe sich somit eine errechnete Schlagratensenkung um 26 SPM, 24 SPM bzw. 32 SPM. Tatsächlich zeigten die Daten bei Kombination von Ivabradin und Nifedipin eine Reduktion der Schlagrate um 23 SPM, 24 SPM bzw. 39 SPM (**Abbildung 12, rote Linie**). Dies entspricht einem additiven Effekt bezüglich der Schlagratensenkung. Analog dazu reduzierte die höhere Ivabradin-Konzentration (25  $\mu$ g/ml) die Schlagrate um 32 SPM. Bei additiver Wirkung von Ivabradin und Nifedipin (IVA 25  $\mu$ g/ml + Nif 0,025, 0,05 bzw. 0,25  $\mu$ M) ergäbe sich eine errechnete Schlagratensenkung um 43 SPM, 41 SPM bzw. 49 SPM. Tatsächlich zeigten die Daten bei Kombination beider Substanzen eine Reduktion der Schlagrate um 42 SPM, 41 SPM bzw. 49 SPM (**Abbildung 12, blaue Linie**). Somit addierten sich bei Kombination von Nifedipin mit verschiedenen Ivabradin-Konzentrationen die schlagratensenkenden Effekte beider Substanzen, was einer additiven Reduktion der Schlagrate entspricht. Diese Daten legen nahe, dass die Beeinflussung der Schlagrate durch Ivabradin nicht über Effekte an den kardialen Kalzium-Kanälen vermittelt wird und umgekehrt die Wirkung von Nifedipin auf die Schlagrate nicht über HCN-Kanäle vermittelt wird.



#### 4.4.2 Die Co-Inkubation kultivierter Kardiomyozyten mit Ivabradin und Verapamil bewirkt eine additive Senkung der Schlagrate

Analog zum vorhergehenden Experiment (siehe **Abbildung 12**) sollte gezeigt werden, dass auch die Kombination von Ivabradin mit dem Kalzium-Kanal-Inhibitor Verapamil eine additive Senkung der Schlagrate bewirkt. Hierzu fanden Schlagratenmessungen nach Zugabe von vier Verapamil-Konzentrationen zu nRKM in Gegenwart und Abwesenheit von Ivabradin statt. Die Ergebnisse eines Einzelexperimentes sind in **Abbildung 13** dargestellt. Unbehandelte nRKM schlugen mit einer Schlagrate von  $27 \pm 3$  SPM. Verapamil 0,001 μM erhöhte die Schlagrate nicht signifikant um 2 SPM. Die übrigen Verapamil-Konzentrationen (0,01, 0,1 bzw. 1 μM) reduzierten die Schlagrate um 11, 6 bzw. 19 SPM im Vergleich zu unbehandelten Zellen (**Abbildung 13, schwarze Linie**). Ivabradin (5 μg/ml) bewirkte eine Reduktion der Schlagrate um 3 SPM. Bei additiver Wirkung beider Substanzen (IVA + Vera 0,001, 0,01, 0,1 bzw. 1 μM) ergäbe sich somit eine errechnete Schlagratensenkung um 1, 14, 9 bzw. 22 SPM. Tatsächlich zeigten die Daten bei Kombination von Ivabradin und Verapamil eine Reduktion der Schlagrate um 1, 14, 16

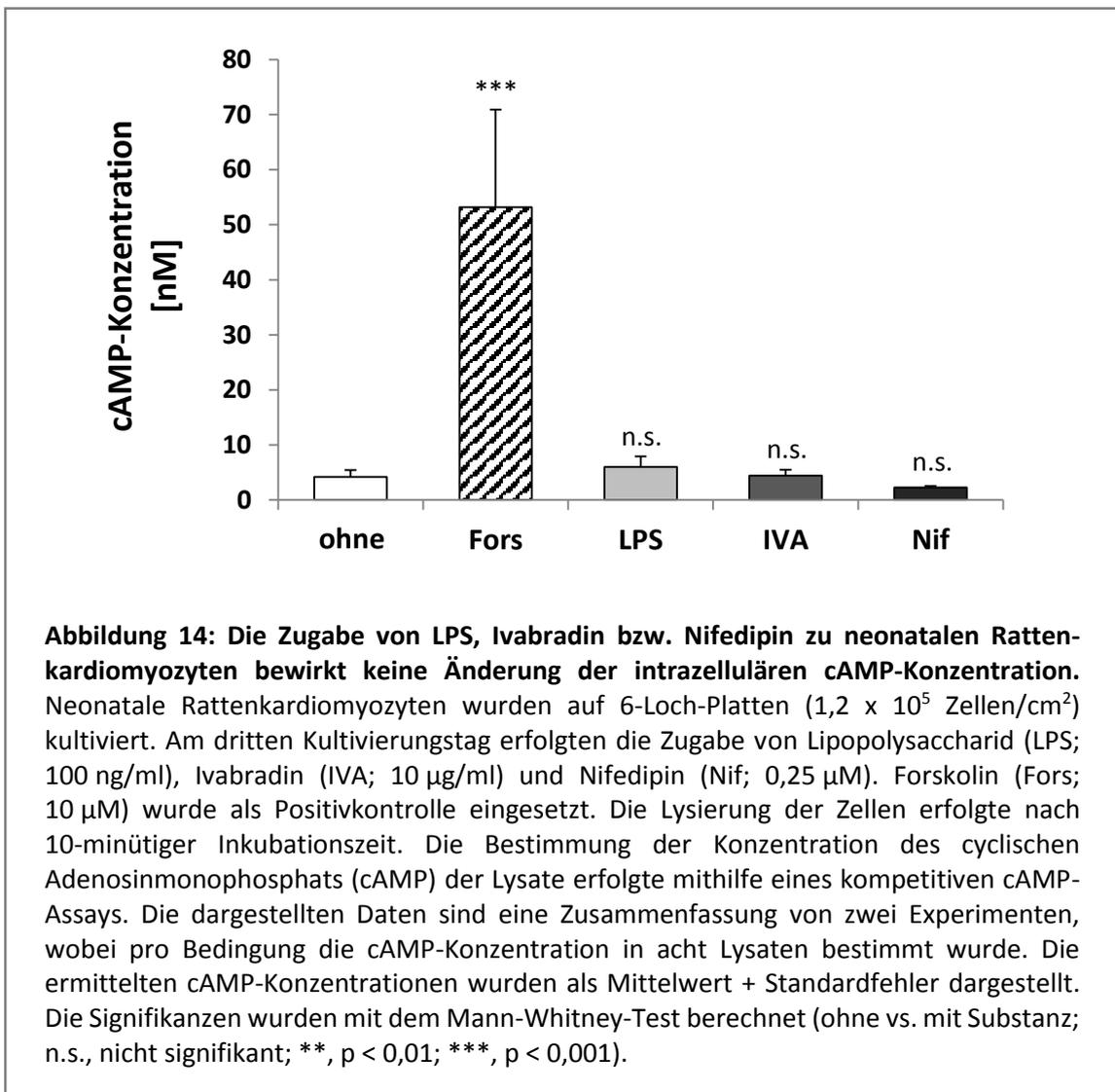
bzw. 25 SPM (**Abbildung 13, rote Linie**). Somit lässt sich bei Kombination von Ivabradin mit allen verwendeten Verapamil-Konzentrationen ein additiver Effekt bezüglich der Schlagratensenkung nachweisen. Diese Daten verstärken die Annahme, dass Ivabradin die Schlagrate nicht über Effekte an kardialen Kalzium-Kanälen beeinflusst.



#### 4.5 LPS, Ivabradin und Nifedipin bewirken keine Änderung der intrazellulären cAMP-Konzentration

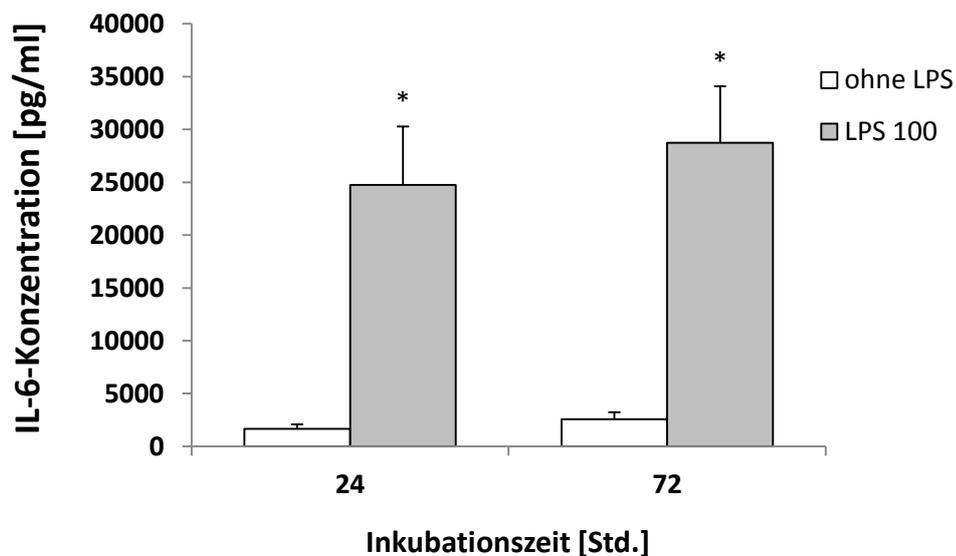
Es ist bekannt, dass eine Steigerung der intrazellulären Konzentration des cyclischen Adenosinmonophosphats (cAMP) eine Änderung der Öffnungskinetik von HCN-Kanälen bewirkt. Hierdurch wird eine Beschleunigung der kardialen Schlagrate hervorgerufen [DiFrancesco und Tortora, 1991; DiFrancesco und Mangoni, 1994]. Da die cAMP-Konzentration einen Einfluss auf die Schlagrate hat, sollte im Folgenden überprüft werden, ob die intrazelluläre cAMP-Konzentration in den Zellkulturen die chronotropen Effekte der oben verwendeten Substanzen hervorruft.

Zur Durchführung dieses Experiments wurden LPS, Ivabradin, Nifedipin sowie Forskolin, letzteres ist ein direkter Stimulator der Adenylcyclase, zu den nRKM gegeben und die cAMP-Konzentration in den Lysaten bestimmt. Eine Zusammenfassung von zwei Experimenten ist in **Abbildung 14** dargestellt. In unbehandelten Zellen wurde eine cAMP-Konzentration von  $4 \pm 1$  nM gemessen. Die verwendete Positivkontrolle Forskolin führte erwartungsgemäß zu einer Steigerung der cAMP-Konzentration ( $53 \pm 18$  nM durch Fors). Demgegenüber bewirkte LPS keine signifikante Änderung der cAMP-Konzentration ( $6 \pm 2$  nM). Auch Nifedipin und Ivabradin bewirkten im Vergleich zu unbehandelten Zellen keine Änderung der cAMP-Konzentration ( $4 \pm 1$  nM durch IVA bzw.  $2 \pm 0,3$  nM durch Nif). Diese Daten bekräftigen die Hypothese, dass die schlagratensenkenden Effekte von LPS, Ivabradin und Nifedipin nicht über eine Änderung der intrazellulären cAMP-Konzentration vermittelt werden.



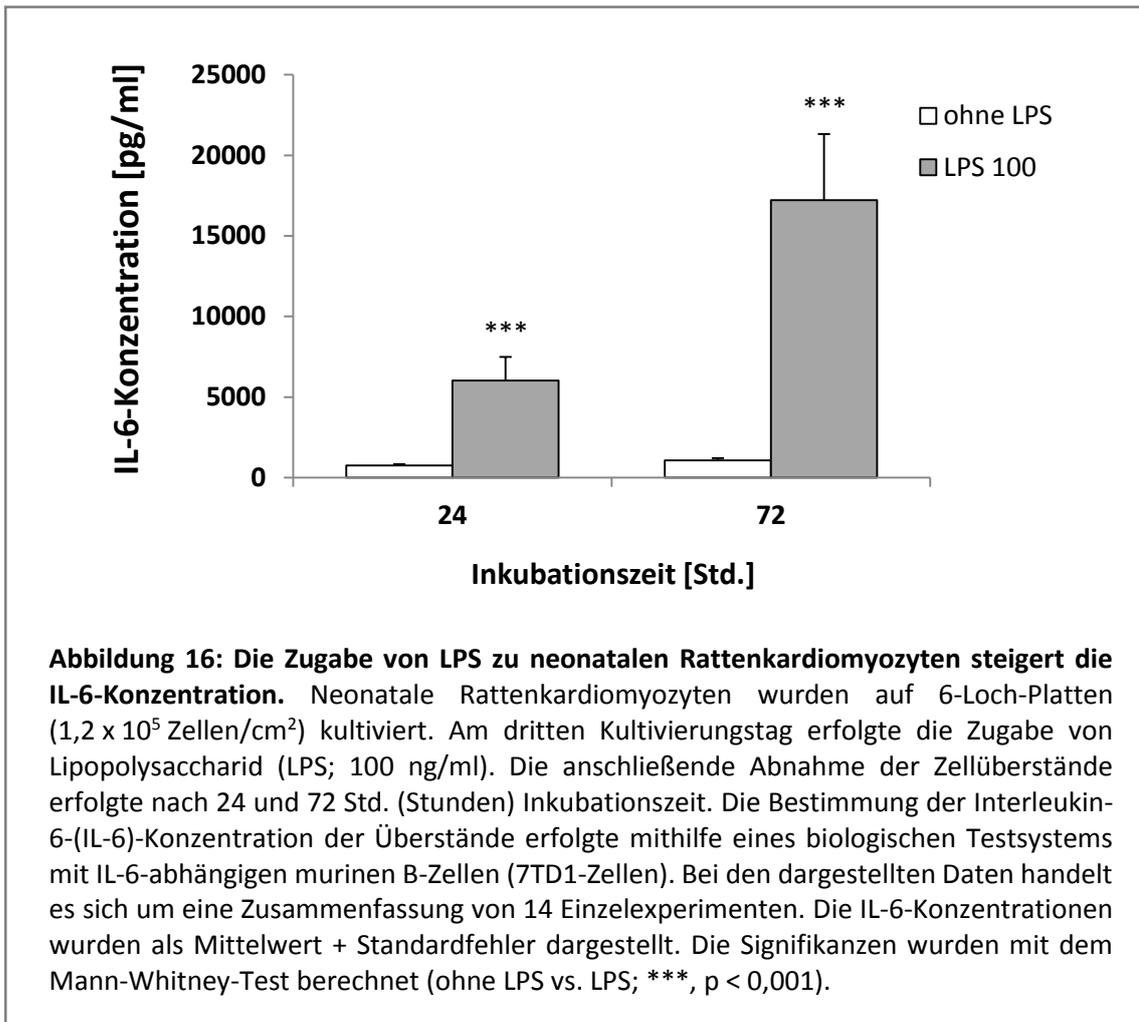
#### 4.6 Eine proinflammatorische Wirkung von LPS ist in kultivierten nRKM nachweisbar

LPS als Bestandteil der bakteriellen Zellwand initiiert eine Steigerung der Zytokinproduktion, die sich im Körper durch inflammatorische Prozesse bemerkbar macht. Um den Einfluss von LPS auf die Zytokinproduktion im vorliegenden Testsystem darzustellen, wurde die IL-6-Konzentration in den Überständen LPS-behandelter nRKM-Kulturen bestimmt. Die Ergebnisse eines repräsentativen Einzelexperimentes sind in **Abbildung 15** dargestellt. Nach 24 Std. Inkubationszeit wurde eine IL-6-Konzentration von  $1661 \pm 432$  pg/ml in unbehandelten Zellen gemessen. Zugabe von LPS führte wie erwartet zu einer Steigerung der IL-6-Konzentration ( $24751 \pm 5517$  pg/ml). Nach 72-stündiger Inkubationszeit bewirkte LPS eine Steigerung der IL-6-Konzentration von  $2562 \pm 682$  pg/ml in unbehandelten Zellen auf  $28741 \pm 5351$  pg/ml. Dies entspricht einer LPS-vermittelten Steigerung der IL-6-Konzentration um ca. das 15-fache nach 24 Std. bzw. das 11-fache nach 72 Std. Inkubationszeit.



**Abbildung 15: Die Zugabe von LPS zu neonatalen Rattenkardiomyozyten steigert die IL-6-Konzentration.** Neonatale Rattenkardiomyozyten wurden auf 6-Loch-Platten ( $1,2 \times 10^5$  Zellen/cm<sup>2</sup>) kultiviert. Am dritten Kultivierungstag erfolgte die Zugabe von Lipopolysaccharid (LPS; 100 ng/ml). Die anschließende Abnahme der Zellüberstände erfolgte nach 24 und 72 Std. (Stunden) Inkubationszeit. Die Bestimmung der Interleukin-6-(IL-6)-Konzentration der Überstände erfolgte mithilfe eines biologischen Testsystems mit IL-6-abhängigen murinen B-Zellen (7TD1-Zellen). Die dargestellten Daten stammen aus einem repräsentativen Einzelexperiment, wobei pro Bedingung vier IL-6-Messungen erfolgt sind. Die ermittelten Schlagraten wurden als Mittelwert + Standardfehler dargestellt. Die Signifikanzen wurden mit dem Mann-Whitney-Test berechnet (ohne LPS vs. LPS 100; \*,  $p < 0,05$ ).

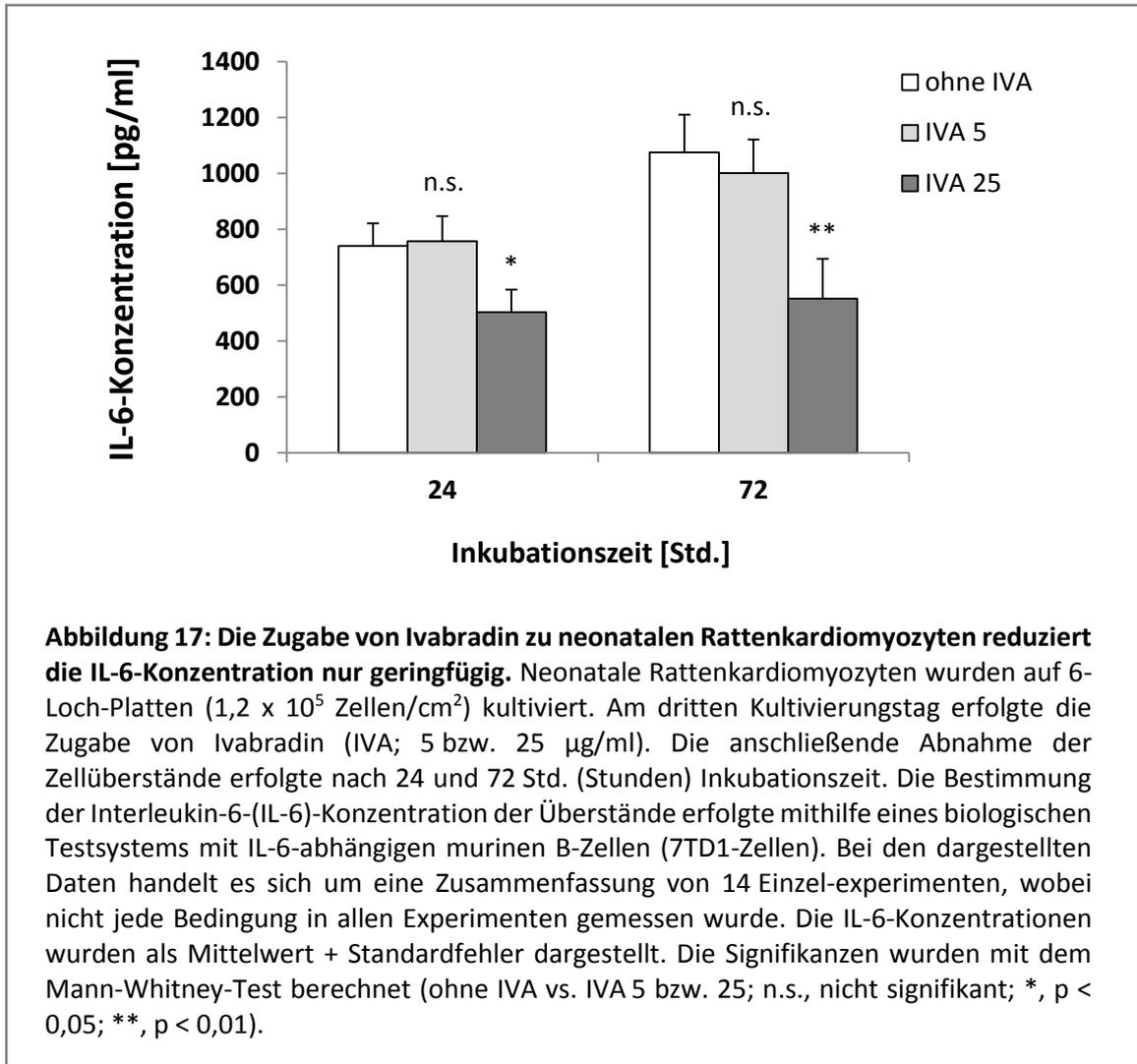
Um die o. g. Daten (siehe **Abbildung 15**) statistisch zu analysieren, wurden die IL-6-Konzentrationsmessungen aus 14 Einzelexperimenten zusammengefasst und in **Abbildung 16** dargestellt. Die IL-6-Konzentration unbehandelter Zellen nach 24 Std. Inkubationszeit betrug  $740 \pm 82$  pg/ml. LPS bewirkte eine signifikante Steigerung der IL-6-Konzentration auf  $6022 \pm 1469$  pg/ml. Analog dazu führte LPS nach 72 Std. Inkubationszeit zu einer Steigerung der IL-6-Konzentration von  $1076 \pm 135$  pg/ml in unbehandelten Zellen auf  $17223 \pm 4100$  pg/ml, was die proinflammatorische Wirkung von LPS im vorliegenden System verdeutlicht.



#### 4.7 Ivabradin und Nifedipin haben lediglich geringfügige antiinflammatorische Effekte

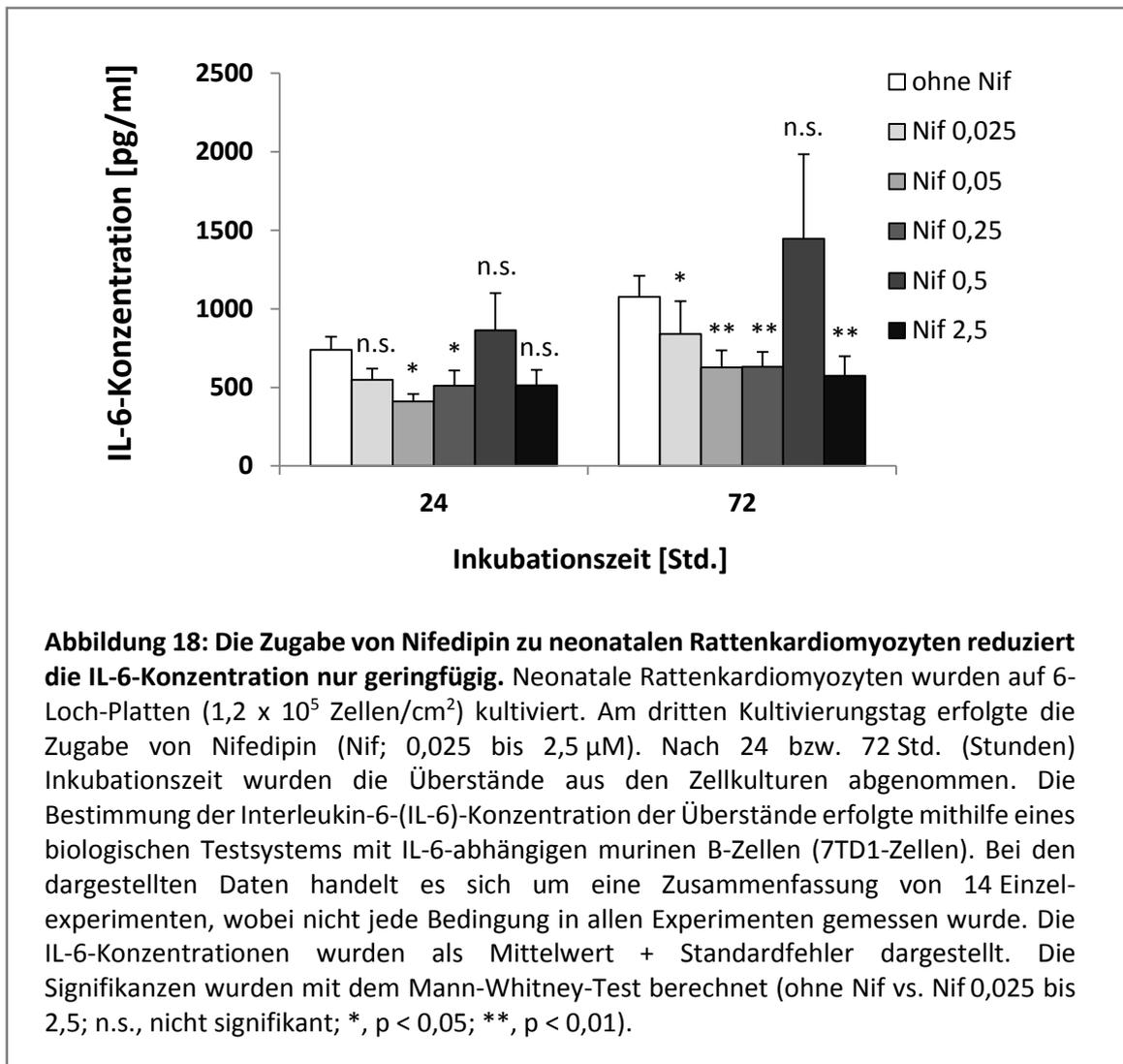
In einer klinischen Studie wurde gezeigt, dass hohe kardiale Schlagraten mit einer erhöhten IL-6-Konzentration im Blutplasma assoziiert sind [Whelton et al., 2014]. Um zu untersuchen, ob die negativ chronotrope Substanz Ivabradin eine Senkung der IL-6-Konzentration der nRKM-Kulturen bewirkt, erfolgten die Zugabe von Ivabradin (5 bzw. 25 µg/ml) zu den Zellkulturen und eine anschließende Bestimmung der IL-6-Konzentration nach 24 und 72 Std. Inkubationszeit.

Eine Zusammenfassung von 14 Einzelexperimenten ist in **Abbildung 17** dargestellt. Die IL-6-Konzentration ohne Ivabradin zum Zeitpunkt 24 Std. betrug  $740 \pm 82$  pg/ml. Im vorliegenden Testsystem bewirkte lediglich IVA 25  $\mu\text{g/ml}$  eine geringe Senkung der IL-6-Konzentration auf  $503 \pm 81$  pg/ml. Zum Zeitpunkt 72 Std. wurde die IL-6-Konzentration durch IVA 25  $\mu\text{g/ml}$  von  $1076 \pm 135$  pg/ml in unbehandelten Zellen auf  $553 \pm 142$  pg/ml gesenkt, während IVA 5  $\mu\text{g/ml}$  zu keinem Zeitpunkt eine signifikante Änderung der IL-6-Konzentration bewirkte. Diese Daten weisen lediglich auf eine geringfügige antiinflammatorische Wirkung von Ivabradin hin.



Um zu überprüfen, ob auch andere negativ chronotrope Substanzen die Zytokinproduktion senken, wurden die IL-6-Konzentrationen in mit Nifedipin behandelten nRKM gemessen. In der Zusammenfassung von 14 Einzelexperimenten (**Abbildung 18**) bewirkte Nifedipin nach 24 Std. Inkubationszeit nur eine geringfügige Reduktion der IL-6-Konzentration von  $740 \pm 82$  pg/ml in unbehandelten Zellen auf  $410 \pm 48$  pg/ml bzw.  $512 \pm 96$  pg/ml (Nif 0,05 bzw. 0,25  $\mu\text{M}$ ). Nach 72 Std. führte Nifedipin ebenfalls zu einer Reduktion der IL-6-Konzentration von

1076 ± 135 pg/ml (ohne Nif) auf 840 ± 209 pg/ml, 627 ± 109 pg/ml, 631 ± 96 pg/ml bzw. 574 ± 123 pg/ml (Nif 0,025, 0,05, 0,25 bzw. 2,5 µM). Demgegenüber bewirkte Nifedipin 0,5 µM zu keinem Zeitpunkt eine signifikante Änderung der IL-6-Konzentration. Sowohl Ivabradin als auch Nifedipin bewirkten somit lediglich eine geringfügige Senkung der IL-6-Konzentration. Die Fragestellung, ob eine mögliche Abhängigkeit der IL-6-Produktion von der kardialen Schlagrate besteht, kann durch die vorliegenden Daten nicht beantwortet werden, da keine deutliche Dosis-Wirkungs-Abhängigkeit nachgewiesen werden konnte. Zur Beantwortung dieser Fragestellung notwendige weiterführende Untersuchungen sind jedoch nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit.



## 5 Diskussion

Septische Erkrankungsbilder zeichnen sich durch eine schwere inflammatorische Reaktion aus, über die funktionelle Störungen verschiedener Organsysteme ausgelöst werden können. Charakteristisch ist neben einer Störung der renalen Funktion und einer septischen Enzephalopathie unter anderem auch die im klinischen Alltag meist unterschätzte Beeinträchtigung des kardiovaskulären Systems [Werdan et al., 2011]. Die septische kardiale Dysfunktion zeichnet sich durch eine gestörte Regulation der Schlagrate und der Schlagratenvariabilität aus [Pontet et al., 2003; Werdan et al., 2009]. Die Schlagrate stellt nicht nur einen unabhängigen Risikofaktor bei kardiovaskulären Erkrankungen dar [Kannel et al., 1987; Diaz et al., 2005], sondern ist auch von entscheidender Bedeutung für die Prognose septischer Erkrankungen und des septischen Multiorganversagens [Hoke et al., 2012]. In zahlreichen Studien wurde gezeigt, dass die im Rahmen einer Sepsis auftretenden Störungen der kardialen Funktion eine hohe prognostische Relevanz bei der Behandlung schwerkranker Patienten mit Multiorganversagen haben [Schmidt et al., 2005], so dass ein Verständnis der zugrundeliegenden Mechanismen von entscheidendem Interesse zu sein scheint.

### 5.1 Die schlagratensenkende Wirkung von LPS *in vitro* wird durch eine Interaktion mit kardialen HCN-Kanälen vermittelt

Lipopolysaccharid (LPS), als integraler Bestandteil der äußeren Zellmembran gramnegativer Bakterien, gelangt im Rahmen septischer Erkrankungen in den Organismus und ist hauptverantwortlich für die toxischen Effekte gramnegativer Bakterien, indem es eine starke inflammatorische Reaktion auslöst und so Sepsis, Multiorganversagen und potentiell den Tod herbeiführen kann [Rietschel et al., 1994]. Die Rolle von LPS bei der Entstehung der septischen kardialen Dysfunktion wurde bereits in zahlreichen Studien beschrieben [Shepherd, McDonough und Burns, 1986]. Diese Studien zeigten, dass die Störungen der kardialen Funktion im Rahmen septischer Erkrankungen zumindest teilweise über eine autonome Dysfunktion zu erklären sind. Allerdings kommt es auch zu direkten Veränderungen der kardialen Schrittmacherzellen [Schmidt et al., 2005; Werdan et al., 2009].

Im Herzen exprimierte HCN-Kanäle haben eine Schlüsselfunktion bei der Entstehung und Regulation des kardialen Schrittmacherrhythmus, über den die Schlagrate der Kardiomyozyten bestimmt wird [Ludwig et al., 1998; Ishii et al., 1999]. Kürzlich konnte von unserer Arbeitsgruppe in Kooperation mit einer Grazer Gruppe gezeigt werden, dass LPS mit den kardialen HCN-Kanälen interagiert. An humanen Myozyten, die aus dem rechten Vorhof isoliert worden waren,

wurde mithilfe der Patch-Clamp-Technik der über HCN-Kanäle fließende Schrittmacher-strom  $I_f$  gemessen. Bei der Patch-Clamp-Technik handelt es sich um eine elektrophysiologische Untersuchung zur Messung der Ströme durch einzelne Ionenkanäle. Hierbei zeigte sich, dass die Aktivität des Schrittmacherstroms  $I_f$  durch LPS beeinflusst wird, wobei zwei verschiedene Phänomene beobachtet werden konnten: (1) LPS steigerte die Empfindlichkeit der HCN-Kanäle für betaadrenerge Stimuli, aber gleichzeitig (2) bewirkte LPS eine direkte Hemmung des über den HCN-Kanal fließenden Schrittmacherstroms  $I_f$  [Zorn-Pauly, 2007]. Diese Studie betont einerseits die Bedeutung des autonomen Nervensystems für die Regulation der kardialen Schlagrate und wies andererseits erstmals auf die Möglichkeit einer direkten Interaktion von LPS mit HCN-Kanälen hin. Beide Effekte zusammen können zur klinisch beobachteten Störung der Schlagratenregulation und der Reduktion der Schlagratenvariabilität unter septischen Bedingungen beitragen.

Weiterführende elektrophysiologische Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe in Kooperation mit dem Julius-Bernstein-Institut für Physiologie in Halle (Saale) und andere Arbeitsgruppen bestätigten die hemmende Wirkung von LPS auf HCN-Kanäle [Klößner et al., 2011; Klößner et al., 2014; Scheruebel et al., 2014]. In einer dieser Studien wurde der über HCN-Kanäle vermittelte Ionenstrom  $I_f$  an durch Transfektion gezüchteten HEK293-Zellen, die den humanen HCN4-Kanal exprimieren, und an Zellen des sinoatrialen Knotens von Mäusen gemessen. Es wurde gezeigt, dass LPS die Aktivierung der HCN-Kanäle verzögert, indem es die Spannungsabhängigkeit der Kanalaktivierung zu negativeren Werten verschiebt und die maximale Leitfähigkeit der Kanäle reduziert. Erwähnenswert ist, dass die LPS-Effekte auf den Schrittmacherstrom  $I_f$  nur bei LPS-Typen auftreten, die eine O-Polysaccharid-Kette exprimieren. Der proinflammatorische Lipid A-Anteil von LPS scheint hierbei nicht erforderlich zu sein, da auch LPS ohne proinflammatorische Aktivität in der Lage ist, den Schrittmacher-strom  $I_f$  zu reduzieren. Eine wesentliche Voraussetzung ist das Vorhandensein einer O-Polysaccharid-Kette [Klößner et al., 2011]. Diese Ergebnisse legen eine Interaktion von LPS mit den HCN-Kanälen ohne Erfordernis der klassischen LPS-vermittelten Signaltransduktions-wege nahe. Dadurch ist LPS potentiell in der Lage, die kardiale Schlagrate zu senken und die Schlagratenvariabilität zu beeinflussen.

Welche tatsächlichen Konsequenzen die Interaktion von LPS mit HCN-Kanälen auf zellulärer Ebene hat, konnte bisher noch nicht gezeigt werden. Daher hat sich die vorliegende Arbeit zum Ziel gesetzt, die funktionellen Auswirkungen der Interaktion von LPS mit HCN-Kanälen bezüglich der Beeinflussung der kardialen Schlagrate *in vitro* darzustellen. Zu diesem Zweck fanden Schlagratenmessungen an isolierten, spontan kontrahierenden, neonatalen Rattenkardiomyozyten statt, nachdem diese mit LPS und dem selektiven HCN-Kanal-Inhibitor

Ivabradin inkubiert wurden. Dieses Testsystem zeichnet sich durch das Fehlen des autonomen Nervensystems aus und kann als Modell isolierter Schrittmacherzellen betrachtet werden, da die spontan kontrahierenden nRKM den Schrittmacherzellen im Sinusknoten in Bezug auf die spontane Depolarisation ähnlich sind. Das autonome Nervensystem kann über eine Änderung der intrazellulären cAMP-Konzentration direkt die Öffnungskinetik von HCN-Kanälen beeinflussen und ist somit an der Regulation der Schlagrate beteiligt [DiFrancesco und Tortora, 1991]. Die Funktion des autonomen Nervensystems ist im Rahmen einer Sepsis gestört [Schmidt, Werdan und Müller-Werdan, 2001], sodass es an der Entstehung der septischen kardialen Dysfunktion beteiligt ist [Zorn-Pauly, 2007]. Das Fehlen eines autonomen Nervensystems im vorliegenden Testsystem ermöglicht es, den direkten Einfluss von LPS auf die kardialen Schrittmacherzellen darzustellen.

Da das vorliegende Testsystem kein verbreitetes Messverfahren der kardialen Funktion darstellt, wurde zunächst untersucht, ob und unter welchen Bedingungen sich die Schlagrate der spontan kontrahierenden Kardiomyozyten ändern lässt. Es zeigte sich, dass die Schlagrate der kultivierten nRKM durch eine Änderung der äußeren Bedingungen beeinflusst werden kann. Mit zunehmender Inkubationszeit konnte eine allgemeine Senkung der Schlagrate beobachtet werden, und zwar von  $80 \pm 7$  SPM nach 3 Std. (Stunden) auf  $59 \pm 2$ ,  $46 \pm 4$  bzw.  $12 \pm 2$  SPM nach 24, 48 bzw. 72 Std. Inkubationszeit. Um eine möglichst hohe Ausgangsschlagrate bei geringem Standardfehler der Schlagraten, die nach gleicher Inkubationszeit gemessen wurden, zu gewährleisten, fanden alle weiteren Schlagratenmessungen hauptsächlich nach 24 Std. Inkubationszeit statt. Weiterhin konnte die Schlagrate durch Zugabe chronotroper Substanzen (Isoprenalin bzw. Ivabradin) gesteigert bzw. gesenkt werden. Dies zeigt die Fähigkeit des vorliegenden Testsystems, Veränderungen der Schlagrate kultivierter Kardiomyozyten durch Zugabe verschiedener chronotroper Substanzen darzustellen. Daher erschien das Testsystem zur Prüfung der eingangs erwähnten Hypothesen geeignet.

Bei Ivabradin handelt es sich um einen hoch-selektiven HCN-Kanal-Inhibitor, der in therapeutischen Konzentrationen keine unspezifischen Effekte auf andere kardiale Schrittmacherkanäle (Kalzium- bzw. Kaliumkanäle) aufweist [Bois et al., 1996]. Aufgrund dieser Selektivität für den kardialen HCN-Kanal erfolgte eine Co-Inkubation der kultivierten Kardiomyozyten mit Ivabradin und LPS. Hierdurch sollte auf zellulärer Ebene überprüft werden, ob LPS in der Lage ist, die HCN-Kanal-Aktivität zu beeinflussen. Die Daten zeigen eine signifikante Schlagratensenkung nach alleiniger Zugabe von LPS bzw. Ivabradin zu den Kardiomyozyten. Beide Substanzen sind somit in der Lage, die spontane rhythmische Aktivität in isolierten Kardiomyozyten *in vitro* zu beeinflussen. Bei Co-Inkubation der Zellen mit LPS und Ivabradin zeigte sich kein additiver Effekt auf die Schlagratensenkung. Dies legt nahe, dass die schlag-

ratensenkende Wirkung beider Substanzen (LPS und Ivabradin) über den gleichen Weg, d. h. den kardialen HCN-Kanal, vermittelt wird. Die Interaktion von LPS mit HCN-Kanälen konnte bereits, wie oben beschrieben, mithilfe elektrophysiologischer Untersuchungen gezeigt werden [Klößner et al., 2011; Scheruebel et al., 2014]. Die in der vorliegenden Arbeit gezeigte nicht-additive schlagratensenkende Wirkung von LPS und Ivabradin ist übereinstimmend mit den o. g. Berichten und zeigt erstmals, dass die Interaktion von LPS mit kardialen HCN-Kanälen auch auf zellulärer Ebene in Bezug auf die Schlagrate der Schrittmacherzellen relevant ist.

### **5.2 Die schlagratensenkende Wirkung von LPS auf kultivierte nRKM wird nicht über eine Interaktion mit kardialen Kalzium-Kanälen vermittelt**

Neben HCN-Kanälen sind auch andere Ionenkanäle, insbesondere spannungsabhängige Kalzium-Kanäle, an der Bildung und Regulation des kardialen Schrittmacherpotentials beteiligt [Irisawa, Brown und Giles, 1993]. Es ist bekannt, dass LPS in der Lage ist, die Aktivität verschiedener Ionenkanäle in immunkompetenten, neuronalen und kardiovaskulären Zellen zu beeinflussen [Blunck et al., 2001; Wilkinson et al., 1996]. Daher sollte als nächstes gezeigt werden, dass die schlagratensenkende Wirkung von LPS nicht über eine Interaktion mit anderen kardialen Ionenkanälen als den HCN-Kanälen vermittelt wird. Hierzu wurden die Kalzium-Kanal-Inhibitoren Nifedipin und Verapamil verwendet. Nifedipin bewirkte in Abwesenheit von LPS eine dosisabhängige Senkung der Schlagrate, die bereits bei der niedrigsten verwendeten Nifedipin-Konzentration (0,025  $\mu\text{M}$ ) sichtbar war. Im Gegensatz zur Co-Inkubation der Kardiomyozyten mit LPS und Ivabradin addierten sich bei Kombination von LPS und Nifedipin die schlagratensenkenden Effekte beider Substanzen. Dies legt nahe, dass LPS und Nifedipin bezüglich der Schlagratensenkung über unterschiedliche Wege wirken.

Verschiedene Studien belegen, dass Nifedipin in pharmakologischen Plasmakonzentrationen keine relevante Hemmung des kardialen Schrittmacherrhythmus bewirkt [Aoki et al., 1982], während die vasodilatatorischen Effekte von Nifedipin in diesem Konzentrationsbereich sehr ausgeprägt sind [Vasquez et al., 1988]. Dennoch konnte in der vorliegenden Studie ein deutlicher schlagratensenkender Effekt von Nifedipin gemessen werden. Am ehesten ist dies dadurch begründet, dass die eingesetzten Konzentrationen oberhalb der pharmakologischen Plasmakonzentration von Nifedipin liegen. Bei einem Molekulargewicht von 346,335 g/mol liegen die eingesetzten Nifedipin-Konzentrationen (0,025 bis 2,5  $\mu\text{M}$ ) in einem Bereich von 8,65 bis 865,84 ng/ml und somit teilweise oberhalb der pharmakologischen Nifedipin-Plasmakonzentration von ca. 30 ng/ml [Kleinbloesem et al., 1987]. Um die Aussagekraft der oben genannten Daten zu bekräftigen, fanden Schlagratenmessungen nach Co-Inkubation der

Kardiomyozyten mit LPS und Verapamil statt. Verapamil stellt einen Vertreter der so genannten Phenylalkylamine dar, einer Klasse von Kalzium-Kanal-Inhibitoren, bei denen sowohl vasodilatatorische als auch negativ chronotrope Effekte bei pharmakologischen Plasmakonzentrationen vorliegen [Singh, Ellrodt und Peter, 1978].

Verapamil bewirkte analog zu Nifedipin eine signifikante, dosisabhängige Schlagratensenkung im vorliegenden Testsystem. Bei Co-Inkubation der Kardiomyozyten mit LPS und Verapamil resultierte eine additive Senkung der Schlagrate, was bekräftigt, dass die schlagratensenkende Wirkung von LPS nicht über eine Interaktion mit kardialen Kalzium-Kanälen vermittelt wird. Dies entspricht den unter Einsatz von Nifedipin gefundenen Erkenntnissen.

### **5.3 Die schlagratensenkende Wirkung von Ivabradin auf kultivierte nRKM wird nicht über eine zusätzliche Interaktion mit kardialen Kalzium-Kanälen vermittelt**

Die mittlere inhibitorische Konzentration ( $IC_{50}$ ) bezeichnet die Konzentration eines Inhibitors, bei der *in vitro* eine halbmaximale Inhibition beobachtet werden kann. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Ivabradin-Konzentrationen zwischen 5 und 25  $\mu\text{g/ml}$  entsprechen einer Stoffmenge zwischen ca. 10,7 und 53,4  $\mu\text{M}$ . Dies liegt oberhalb des experimentell in humanen Myozyten ermittelten  $IC_{50}$ -Wertes von Ivabradin von 2,9  $\mu\text{M}$  [El Chemaly et al., 2007]. Bei Ivabradin-Konzentrationen von 10  $\mu\text{M}$  konnte in elektrophysiologischen Untersuchungen bereits eine mäßige Beeinflussung anderer kardialer Schrittmacherströme beobachtet werden [Mangoni, Marger und Nargeot, 2006]. Um zu untersuchen, ob Ivabradin bei diesen Konzentrationen Effekte auf andere kardiale Schrittmacherkanäle, insbesondere Kalzium-Kanäle, bezüglich der Schlagratensenkung im vorliegenden Testsystem ausübt, erfolgte eine Co-Inkubation der Kardiomyozyten mit Ivabradin und Nifedipin bzw. Verapamil. Die Daten zeigen eine Addition der schlagratensenkenden Effekte von Ivabradin und Nifedipin bzw. Verapamil, was eine Beeinflussung der Schlagrate über unterschiedliche Wege nahelegt und gegen eine funktionelle Beeinträchtigung kardialer Kalzium-Kanäle durch Ivabradin spricht. Ivabradin hat somit in den verwendeten Konzentrationen im vorliegenden Testsystem keine relevanten unspezifischen Effekte auf die Funktion kardialer Kalzium-Kanäle.

Dieses Ergebnis ist übereinstimmend mit vorangegangenen Berichten. In der Literatur wurde gezeigt, dass Ivabradin trotz der mäßigen Effekte auf Kalzium- und Kalium-Ströme an sinoatrialen Schrittmacherzellen bei höheren Konzentrationen keinen relevanten Effekt auf die Schrittmacheraktivität dieser Kanäle hat. Dies konnte in zahlreichen Simulationen der Schrittmachertätigkeit in sinoatrialen Zellen von Hasen gezeigt werden, bei denen die Ivabradin-

vermittelten mäßigen Änderungen der Ionenströme keinen Einfluss auf die Form der Aktionspotentialwellen hatten [Mangoni, Marger und Nargeot, 2006].

#### **5.4 Die Schlagratensenkung durch LPS, Ivabradin und Nifedipin wird nicht über eine messbare Änderung der intrazellulären cAMP-Konzentration vermittelt**

Cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP) agiert direkt und Proteinkinase A-unabhängig mit HCN-Kanälen und führt dadurch zu einer Änderung der Öffnungskinetik der HCN-Kanäle. Eine Steigerung der intrazellulären cAMP-Konzentration bewirkt über eine Verschiebung des Aktivierungspotentials von HCN-Kanälen zu weniger negativen Potentialen eine Steigerung der kardialen Schlagrate [DiFrancesco und Tortora, 1991]. Um zu verifizieren, dass die schlagratensenkende Wirkung der verwendeten Substanzen im vorliegenden Testsystem nicht durch eine Änderung der intrazellulären cAMP-Konzentration vermittelt wurde, fanden Konzentrationsmessungen von cAMP nach 10-minütiger Inkubationszeit statt. Als Positivkontrolle wurde Forskolin, ein direkter Stimulator der Adenylcyclase [Seamon und Daly, 1981], eingesetzt. In zahlreichen Studien wurde der cAMP-steigernde Effekt von Forskolin beschrieben [Cui und Green, 2003]. Nach Inkubation der Kardiomyozyten mit Forskolin zeigte sich erwartungsgemäß ein signifikanter Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration. Demgegenüber bewirkten LPS, Ivabradin und Nifedipin keine Änderung der cAMP-Konzentration. Dies spricht gegen eine indirekte Beeinflussung der Schlagrate durch Ivabradin, Nifedipin und insbesondere LPS über eine Änderung der intrazellulären cAMP-Konzentration.

Auch in der Literatur wurde bisher kein cAMP-steigernder Effekt der verwendeten Substanzen beschrieben. Am Modell isolierter Nagetier-Adipozyten wurde der Einfluss von LPS auf die cAMP-Produktion gemessen. Hier bewirkte LPS keine Änderung der cAMP-Konzentration [Zu et al., 2009]. Dieses Ergebnis steht nicht im Widerspruch dazu, dass LPS eine Sensibilisierung der HCN-Kanäle für aktivierende betaadrenerge Stimuli bewirkt [Zorn-Pauly, 2007], da im vorliegenden Testsystem kein autonomes Nervensystem vorhanden ist. Am Modell humaner Lymphozyten wurde beschrieben, dass Nifedipin keinen Effekt auf die cAMP-Konzentration hat [Hui und Yu, 1988]. Eine Änderung der cAMP-Konzentration durch Ivabradin wurde bisher in keiner Studie gezeigt. Dies ist übereinstimmend mit dem Ergebnis der vorliegenden Arbeit, dass die intrazelluläre cAMP-Konzentration durch LPS, Nifedipin und Ivabradin nicht signifikant gesteigert wird.

### **5.5 Die proinflammatorischen Effekte von LPS sind im vorliegenden Testsystem mit kultivierten Kardiomyozyten vorhanden**

Die Aktivität der Schrittmacherkanäle könnte indirekt über inflammatorische Zytokine (z. B. tumor necrosis factor alpha, TNF $\alpha$ ; Interleukin-6, IL-6) beeinflusst werden, wie sie infolge einer bakteriellen oder viralen Infektion gebildet werden. Es wurde gezeigt, dass Zytokine eine zentrale Rolle bei der durch gramnegative Bakterien verursachten Sepsis spielen, u. a. indem sie die Entwicklung einer myokardialen Dysfunktion begünstigen [Kumar et al., 2001; Hunter und Doddi, 2010]. Am wahrscheinlichsten sind hierfür die Störung der Kalzium-Homöostase und die Produktion von Stickstoffmonoxid (NO) verantwortlich, wodurch zahlreiche kardiale Ionenströme beeinflusst werden [Aoki et al., 2012; Knuefermann et al., 2004].

Laut Literatur ist LPS über den Lipid A-Anteil in der Lage, eine inflammatorische Reaktion in Monozyten-Kulturen hervorzurufen [Loppnow et al., 1989]. Da IL-6 einen entscheidenden Faktor im Rahmen inflammatorischer Prozesse darstellt [Akira, Taga und Kishimoto, 1993], wurde die inflammatorische Wirkung von LPS auf Kardiomyozyten *in vitro* in der vorliegenden Arbeit durch eine Messung der IL-6-Konzentration abgeschätzt. Die Daten zeigen erwartungsgemäß eine LPS-vermittelte Steigerung der IL-6-Konzentration, was bestätigt, dass eine proinflammatorische Aktivität von LPS im vorliegenden Testsystem vorhanden ist.

Welche Rolle die durch LPS hervorgerufenen inflammatorischen Prozesse bei der Interaktion von LPS mit HCN-Kanälen spielen, wurde kürzlich von unserer Arbeitsgruppe in Kooperation mit dem Julius-Bernstein-Institut für Physiologie in Halle (Saale) gezeigt [Klößner et al., 2014]. In dieser Studie wurde der über HCN-Kanäle vermittelte Ionenstrom  $I_f$  an durch Transfektion gezüchteten HEK293-Zellen, die den humanen HCN2-Kanal exprimieren, gemessen. Bei direktem Kontakt der HCN-Kanäle mit LPS wurde der Schrittmacherstrom gehemmt („*whole-cell*“-Konfiguration). Demgegenüber hatte LPS keinen Effekt auf die Kanalaktivität in einer Versuchsanordnung, bei der die HCN-Kanäle vor dem direkten Kontakt mit LPS geschützt sind („*cell-attached*“-Konfiguration). Dies demonstriert, dass LPS direkt mit dem HCN-Kanal oder in unmittelbarer Nähe zum HCN-Kanal interagiert.

### **5.6 Die schlagratensenkenden Substanzen Ivabradin und Nifedipin wirken lediglich geringfügig antiinflammatorisch auf Kardiomyozyten *in vitro***

Für die Entwicklung der Atherosklerose sind inflammatorische Vorgänge im Organismus von großer Bedeutung [Libby und Hansson, 1991; Ross, 1999; Loppnow, Werdan und Buerke, 2008]. Neben den Effekten auf die Schlagratenregulation wurde berichtet, dass Ivabradin sich günstig beim Vorliegen einer Atherosklerose auswirkt [Baumhäkel et al., 2010; Schirmer et al.,

**2012]**, wobei der zugrundeliegende Mechanismus bisher noch nicht ausreichend erklärt werden konnte. Eine der Ursachen für die günstigen Auswirkungen von Ivabradin beim Vorliegen einer Atherosklerose könnte der in der vorliegenden Arbeit dargestellte anti-inflammatorische Effekt von Ivabradin sein, der in einer Ivabradin-vermittelten Senkung der IL-6-Konzentration zum Ausdruck kommt. Die Daten zeigen, dass die höchste verwendete Ivabradin-Konzentration eine – wenn auch geringfügige – Reduktion der IL-6-Konzentration von  $740 \pm 82$  pg/ml in unbehandelten Zellen auf  $503 \pm 81$  pg/ml (IVA 25  $\mu$ g/ml;  $p < 0,05$ ) nach 24-stündiger Inkubationszeit bewirkt.

In einer klinischen Studie mit Probanden ohne kardiovaskuläre Erkrankungen wurde gezeigt, dass erhöhte Konzentrationen inflammatorischer Marker (C-reaktives Protein, IL-6 und Fibrinogen) mit einer erhöhten kardialen Schlagrate assoziiert sind [Whelton et al., 2014]. Daraus ergibt sich die Frage, ob die in der vorliegenden Arbeit gemessene Senkung der IL-6-Konzentration durch Ivabradin selbst oder durch die Ivabradin-bedingte Schlagratensenkung bewirkt wurde. Die Rolle negativ chronotroper Substanzen auf die Beeinflussung inflammatorischer Vorgänge ist bisher noch nicht geklärt. Daher wurden die IL-6-Konzentrationen nach Inkubation der Kardiomyozyten mit einer anderen negativ chronotropen Substanz, in diesem Fall Nifedipin, gemessen. Einige Nifedipin-Konzentrationen führten zu einer signifikanten Senkung der IL-6-Konzentration. So bewirkte Nifedipin nach 24 Std. Inkubationszeit eine geringfügige Reduktion der IL-6-Konzentration von  $740 \pm 82$  pg/ml in unbehandelten Zellen auf  $410 \pm 48$  pg/ml bzw.  $512 \pm 96$  pg/ml (Nif 0,05 bzw. 0,25  $\mu$ M;  $p < 0,05$ ). Daraus ergibt sich die Hypothese, dass sich die Senkung der kardialen Schlagrate positiv auf die IL-6-Konzentration und möglicherweise auch auf andere inflammatorische Vorgänge auswirkt. Diese schlagratenabhängige Hemmung der Inflammation könnte u. a. mit der günstigeren Prognose einer niedrigen Schlagrate bei kritisch kranken Patienten zusammenhängen.

Anzumerken ist, dass die durch Ivabradin und Nifedipin hervorgerufene Senkung der IL-6-Konzentration nur sehr gering ausgeprägt ist und die Dosis-Wirkungs-Abhängigkeit nicht eindeutig ist. In der Zusammenfassung mehrerer Einzelexperimente sind die IL-6-Konzentrationen unbehandelter und Nifedipin- bzw. Ivabradin-behandelter Zellen signifikant unterschiedlich. Es stellt sich jedoch die Frage, ob diese geringfügige Senkung der IL-6-Konzentration durch negativ chronotrope Substanzen wirklich biologisch relevant ist. Auch die genauen Mechanismen, die dem IL-6-reduzierenden Effekt von Ivabradin und Nifedipin zugrunde liegen könnten, wurden bisher noch nicht in der Literatur beschrieben. Dieses Themengebiet bietet Anlass für weiterführende Untersuchungen.

### 5.7 Limitationen

In der vorliegenden Arbeit wurden signifikante Unterschiede der Schlagraten unbehandelter und LPS-behandelter Kardiomyozyten nach 24-stündiger Inkubationszeit gemessen. Eine große Anzahl an Studien hat sich ebenfalls mit den Effekten von Endotoxin auf die Schlagratenregulation beschäftigt [Schmidt et al., 2007; Gholami et al., 2012]. In vielen dieser *in vitro*-Studien wurde der LPS-Effekt erst einige Stunden nach Zugabe von LPS beschrieben, wobei auch eine Initiierung inflammatorischer Prozesse zur Wirkung von LPS beitragen könnte [Fairchild, 2009]. Mithilfe des vorliegenden Testsystems kann somit nicht sicher ausgeschlossen werden, dass die LPS-vermittelte Beeinflussung der Schlagrate über die durch LPS angeregte Produktion inflammatorischer Zytokine verursacht wird. Es wurde gezeigt, dass die IL-6- und TNF $\alpha$ -Konzentration nach Applikation von LPS zu humanem Vollblut erst nach 4 bis 6 Std. einen Gipfel erreichten, auf dem sich die Konzentrationen der Zytokine stabilisierten [DeForge und Remick, 1991]. Um den störenden Einfluss inflammatorischer Zytokine auf die Schlagratenregulation zu vermeiden, sind Untersuchungen erforderlich, bei denen die kardiale Schlagrate direkt nach Applikation von LPS bestimmt wird. Daher fanden in unserer Forschungsgruppe *in vivo*-Analysen in Mäusen innerhalb von 30 Minuten nach Zugabe von LPS statt. Bei pharmakologischer Blockade des autonomen Nervensystems induzierte LPS eine Bradykardie [Ebelt et al., 2014], was gegen eine durch Inflammationsvorgänge vermittelte schlagratensenkende Wirkung von LPS spricht und die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigt. Die direkte Interaktion von LPS mit HCN-Kanälen ohne Erfordernis intrazellulärer Signalmoleküle wurde kürzlich in elektrophysiologischen Untersuchungen von unserer Arbeitsgruppe in Kooperation mit dem Julius-Bernstein-Institut für Physiologie in Halle (Saale) bestätigt [Klößner et al., 2014]. Andere mögliche Herangehensweisen, um auszuschließen, dass die LPS-vermittelte Schlagratensenkung über inflammatorische Zytokine beeinflusst wird, wären eine *in vitro*-Schlagratensmessung nach Co-Inkubation der Zellen mit LPS und Acetyl-salicylsäure, welche antiinflammatorisch wirkt und u. a. die IL-6-Synthese inhibiert [Nakamura et al., 1992], oder die Verwendung von Antikörpern, die gegen Zytokine gerichtet sind.

Die in dieser Studie erhobenen Daten wurden am Modell neonataler Rattenkardiomyozyten erhoben, welche Unterschiede in der Ionenkanalexpression und somit auch den elektrophysiologischen Eigenschaften aufweisen könnten. Diese Unterschiede könnten das Ergebnis der Experimente beeinflussen. Daher werden weiterführende klinische Studien benötigt, um die hier gefundenen Ergebnisse zu bestätigen und tiefere Einblicke in die Effekte von Ivabradin auf die Schlagrate unter septischen Bedingungen *in vivo* zu erlangen. Eine solche klinische Studie in der Universitätsklinik Halle (Saale) untersucht zurzeit die positiven Effekte der

durch Ivabradin vermittelten Schlagratensenkung in Patienten mit Multiorganversagen [Nuding et al., 2011].

### 5.8 Ausblick

Zusammenfassend konnte mithilfe der vorliegenden Studie gezeigt werden, dass die LPS-vermittelte Blockade des Schrittmacherstroms  $I_f$  auch auf zellulärer Ebene in Bezug auf die Schlagrate kardialer Schrittmacherzellen von Bedeutung ist und sich in einer Senkung der kardialen Schlagrate auswirkt. Die Wirkung von LPS auf die Schlagrate ist nicht über eine Interaktion mit kardialen Kalzium-Kanälen oder eine Änderung der intrazellulären cAMP-Konzentration zu erklären. Die inhibitorische Wirkung von LPS auf die Aktivität der HCN-Kanäle und die daraus folgenden negativ chronotropen Effekte von LPS sind in der Lage, die kardiale Funktion zu beeinträchtigen. Diese Interaktion von LPS mit HCN-Kanälen kann als Mechanismus angesehen werden, der im Zusammenspiel mit einer septischen autonomen Dysfunktion zur veränderten Schlagratenregulation und einer klinisch relevanten Reduktion der Schlagratenvariabilität bei schwerer Sepsis beiträgt. Beides ist verbunden mit einer verschlechterten Prognose in kritisch kranken Patienten. Das Verständnis der zugrundeliegenden Mechanismen bei der Interaktion von LPS mit HCN-Kanälen kann somit künftig bedeutsam sein für die Verbesserung der Prognose bei schwerer Sepsis und Multiorganversagen.

Eine entscheidende Konsequenz der vorliegenden Arbeit ist, dass der schlagratensenkende Effekt des HCN-Kanal-Inhibitors Ivabradin in Anwesenheit von LPS vermindert ist, d. h. dass Ivabradin und LPS über denselben Weg wirken. Daraus ergibt sich die Fragestellung, ob der Einsatz von Ivabradin zur Schlagratensenkung unter septischen Bedingungen eine geeignete Therapiestrategie darstellt. Um die gefundenen Ergebnisse zu bestätigen und tiefere Einblicke in die Effekte von Ivabradin auf die Schlagrate unter septischen Bedingungen *in vivo* zu erhalten, werden weiterführende (u. a. klinische) Studien benötigt.

## 6 Zusammenfassung

Eine erhöhte kardiale Schlagrate ist ein unabhängiger Vorhersagefaktor für Morbidität und Mortalität, z. B. bei Herzinsuffizienz und septischer Kardiomyopathie. HCN-Kanäle (*hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated cation channels*) und spannungsabhängige Kalziumkanäle sind hauptverantwortlich für die Bildung des kardialen Schrittmacherpotentials im Sinusknoten. Eine erhöhte HCN-abhängige Schlagrate kann durch Ivabradin therapiert werden. Im Rahmen der septischen Kardiomyopathie könnten auch Mikroorganismen oder deren Bestandteile (z. B. Lipopolysaccharid, LPS) die Schlagrate beeinflussen. In elektrophysiologischen Untersuchungen wurde gezeigt, dass LPS mit dem HCN-Kanal interagieren kann. Welche Konsequenzen die Interaktion von LPS mit HCN-Kanälen auf funktioneller Ebene *in vitro* und *in vivo* hat, wurde bisher noch nicht gezeigt. Mithilfe der vorliegenden Arbeit sollte daher untersucht werden, ob LPS über die Hemmung der kardialen HCN-Kanäle die spontane rhythmische Aktivität von Kardiomyozyten *in vitro* beeinflussen kann und ob die kardiotropen Effekte von LPS ausschließlich über eine Interaktion mit HCN-Kanälen vermittelt werden. Um dies darzustellen, wurden die Effekte von LPS, dem HCN-Kanal-Inhibitor Ivabradin und den Kalzium-Kanal-Inhibitoren Nifedipin und Verapamil auf das Schlagverhalten spontan kontrahierender, neonataler Rattenkardiomyozyten *in vitro* gemessen. Die LPS-induzierte Inflammation wurde anhand der Interleukin-6-(IL-6)-Konzentration der Überstände dargestellt.

LPS bewirkte *in vitro* bei Abwesenheit eines autonomen Nervensystems eine Senkung der Schlagrate kultivierter Kardiomyozyten. Das negativ chronotrope Ivabradin alleine reduzierte ebenfalls die Schlagrate, jedoch zeigte sich bei Co-Inkubation der Zellen mit Ivabradin und LPS keine additive Schlagratensenkung. Dieser Befund führte zur Annahme, dass LPS und Ivabradin über den gleichen Weg, d. h. über den HCN-Kanal, agieren. Neben den HCN-Kanälen sind auch spannungsabhängige Kalzium-Kanäle an der Bildung des kardialen Schrittmacherpotentials beteiligt. Die Kalzium-Kanal-Inhibitoren Nifedipin und Verapamil senkten erwartungsgemäß die Schlagrate. Durch Co-Inkubation mit LPS konnte die Schlagrate noch weiter vermindert werden (= additive Schlagratensenkung). LPS scheint somit nicht mit den kardialen Kalzium-Kanälen zu interagieren. Dieser Befund bekräftigt die Annahme, dass die Beeinflussung der Schlagrate durch LPS über spezifische Effekte an HCN-Kanälen vermittelt wird. Um zu überprüfen, ob es Interaktionen zwischen den oben verwendeten HCN- und Kalzium-Kanal-Inhibitoren gibt, erfolgte ein Zusatz von Nifedipin bzw. Verapamil zu Ivabradin-behandelten Zellen. Auch hier zeigte sich eine additive Schlagratensenkung bei Kombination beider Substanzen. Ivabradin hat

somit bei pharmakologischen Konzentrationen keine funktionell relevanten Effekte an Kalzium-Kanälen und wirkt spezifisch auf HCN-Kanäle.

Die Öffnungskinetik der HCN-Kanäle ist abhängig von der intrazellulären Konzentration des cyclischen Adenosinmonophosphats (cAMP). Eine erhöhte cAMP-Konzentration bewirkt eine Steigerung der kardialen Schlagrate. Um eine mögliche Beeinflussung der Schlagrate über eine Änderung der intrazellulären cAMP-Konzentration auszuschließen, wurde der cAMP-Gehalt der Zellkulturen bestimmt. Die Zugabe von LPS, Ivabradin und Nifedipin bewirkten keine signifikante Änderung der cAMP-Konzentration, was gegen eine cAMP-vermittelte Schlagratensenkung spricht. Auch eine indirekte Wirkung der verwendeten Substanzen auf die Aktivität der Schrittmacherkanäle durch Zytokine könnte möglich sein. Dies erscheint aber nicht sehr wahrscheinlich, da z. B. die negativ chronotropen Substanzen Ivabradin und Nifedipin lediglich zu einer sehr geringfügigen Senkung der IL-6-Konzentration führten. Die gezeigten *in vitro*-Ergebnisse weisen also auf eine Interaktion von LPS mit den HCN-Kanälen von Kardiomyozyten hin, die wahrscheinlich nicht durch eine Änderung des intrazellulären cAMP-Gehalts oder der Interleukin-6-Konzentration vermittelt wird.

Die funktionell relevante Inhibition der HCN-Kanal-Aktivität durch LPS kann neben der septischen autonomen Dysfunktion zur veränderten Schlagratenregulation bei einer Sepsis beitragen, was allerdings mit einer ungünstigen Prognose bei schwerer Sepsis einhergehen würde. Die hier vorgelegten und weitere Untersuchungen zum Verständnis der zugrundeliegenden Mechanismen bei der Interaktion von LPS mit HCN-Kanälen könnten somit künftig bedeutsam sein für die Entwicklung geeigneter Therapiestrategien zur Verbesserung der Prognose bei kritisch kranken Patienten.

## 7 Literaturverzeichnis

**Akira S, Taga T, Kishimoto T (1993):**

Interleukin-6 in biology and medicine. *Adv Immunol* 54: 1-78.

**Aoki K, Sato K, Kawaguchi Y, Yamamoto M (1982):**

Acute and long-term hypotensive effects and plasma concentrations of nifedipine in patients with essential hypertension. *Eur J Clin Pharmacol* 23: 197-201.

**Aoki Y, Hatakeyama N, Yamamoto S, Kinoshita H, Matsuda N, Hattori Y, Yamazaki M (2012):**

Role of ion channels in sepsis-induced atrial tachyarrhythmias in guinea pigs. *Br J Pharmacol* 166: 390-400.

**Barrese V, Taglialatela M (2013):**

New advances in beta-blocker therapy in heart failure. *Front Physiol* 4: article 323 (doi: 10.3389).

**Baumhäkel M, Custodis F, Schlimmer N, Laufs U, Böhm M (2010):**

Heart rate reduction with ivabradine improves erectile dysfunction in parallel to decrease in atherosclerotic plaque load in ApoE-knockout mice. *Atherosclerosis* 212: 55-62.

**Benetos A, Rudnichi A, Thomas F, Safar M, Guize L (1999):**

Influence of heart rate on mortality in a French population: role of age, gender, and blood pressure. *Hypertension* 33: 44-52.

**Biel M, Wahl-Schott C, Michalakis S, Zong X (2009):**

Hyperpolarization-activated cation channels: from genes to function. *Physiol Rev* 89: 847-885.

**Blunck R, Scheel O, Müller M, Brandenburg K, Seitzer U, Seydel U (2001):**

New insights into endotoxin-induced activation of macrophages: involvement of a K<sup>+</sup> channel in transmembrane signaling. *J Immunol* 166: 1009-1015.

**Bois P, Bescond J, Renaudon B, Lenfant J (1996):**

Mode of action of bradycardic agent, S 16257, on ionic currents of rabbit sinoatrial node cells. *Br J Pharmacol* 118: 1051-1057.

**Borer JS (2004):**

Drug insight: If inhibitors as specific heart-rate-reducing agents. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 1: 103-109.

**Borer JS, Böhm M, Ford I, Robertson M, Komajda M, Tavazzi L, Swedberg K (2014):**

Efficacy and safety of ivabradine in patients with severe chronic systolic heart failure (from the SHIFT study). *Am J Cardiol* 113: 497-503.

**Bucchi A, Barbuti A, DiFrancesco D, Baruscotti M (2012):**

Funny Current and Cardiac Rhythm: Insights from HCN Knockout and Transgenic Mouse Models. *Front Physiol* 3: 240.

**Cohen J (2002):**

The immunopathogenesis of sepsis. *Nature* 420: 885-891.

**Colin P, Ghaleh B, Monnet X, Su J, Hittinger L, Giudicelli JF, Berdeaux A (2003):**

Contributions of heart rate and contractility to myocardial oxygen balance during exercise. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 284: H676-H682.

**Cui H, Green RD (2003):**

Regulation of the cAMP-elevationg effects of isoproterenol and forskolin in cardiac myocytes by treatments that cause increases in cAMP. *Biochem Biophys Res Commun* 307: 119-126.

**Danchin N (2009):**

Impact of a pure reduction in heart rate for the treatment of left ventricular dysfunction: clinical benefits of ivabradine in the BEAUTIFUL trial. *Therapie* 64: 111-114.

**DeForge LE, Remick DG (1991):**

Kinetics of TNF, IL-6, and IL-8 gene expression in LPS-stimulated human whole blood. *Biochem Biophys Res Commun* 174: 18-24.

**Diaz A, Bourassa MG, Guertin MC, Tardif JC (2005):**

Long-term prognostic value of resting heart rate in patients with suspected or proven coronary artery disease. *Eur Heart J* 26: 967-974.

**DiFrancesco D, Camm JA (2004):**

Heart rate lowering by specific and selective I(f) current inhibition with ivabradine: a new therapeutic perspective in cardiovascular disease. *Drugs* 64: 1757-1765.

**DiFrancesco D, Ferroni A, Mazzanti M, Tromba C (1986):**

Properties of the hyperpolarizing-activated current (if) in cells isolated from the rabbit sinoatrial node. *J Physiol* 377: 61-88.

**DiFrancesco D, Mangoni M (1994):**

Modulation of single hyperpolarization-activated channels (i(f)) by cAMP in the rabbit sinoatrial node. *J Physiol* 474: 473-482.

**DiFrancesco D, Tortora P (1991):**

Direct activation of cardiac pacemaker channels by intracellular cyclic AMP. *Nature* 351: 145-147.

**Dobrzynski H, Nikolski VP, Sambelashvili AT, Greener ID, Yamamoto M, Boyett MR, Efimov IR (2003):**

Site of origin and molecular substrate of atrioventricular junctional rhythm in the rabbit heart. *Circ Res* 93: 1102-1110.

**Dougall HT, McLay J (1996):**

A comparative review of the adverse effects of calcium antagonists. *Drug Saf* 15: 91-106.

**El Chemaly A, Magaud C, Patri S, Jayle C, Guinamard R, Bois P (2007):**

The heart rate-lowering agent ivabradine inhibits the pacemaker current I(f) in human atrial myocytes. *J Cardiovasc Electrophysiol* 18: 1190-1196.

**Ebelt H, Geißler I, Ruccius S, Otto V, Hoffmann S, Korth H, Klöckner U, Zhang Y, Li Y, Grossmann C, Rueckschloss U, Gekle M, Stieber J, Frantz S, Werdan K, Müller-Werdan U, Loppnow H (2014):**

Direct inhibition, but indirect sensitization of pacemaker activity to sympathetic tone by Endotoxin (zur Publikation eingereicht).

**Egstrup K (1988):**

Transient myocardial ischemia after abrupt withdrawal of antianginal therapy in chronic stable angina. *Am J Cardiol* 61: 1219-1222.

**Engel C, Brunkhorst FM, Bone HG, Brunkhorst R, Gerlach H, Grond S, Gruendling M, Huhle G, Jaschinski U, John S, Mayer K, Oppert M, Olthoff D, Quintel M, Ragaller M, Rossaint R, Stuber F, Weiler N, Welte T, Bogatsch H, Hartog C, Loeffler M, Reinhart K (2007):**

Epidemiology of sepsis in Germany: results from a national prospective multicenter study. *Intensive Care Med* 33: 606-618.

**Fairchild KD, Saucerman JJ, Raynor LL, Sivak JA, Xiao Y, Lake DE, Moorman JR (2009):**

Endotoxin depresses heart rate variability in mice: cytokine and steroid effects. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 297: R1019-R1027.

**Ferrari R, Cargnoni A, Ceconi C (2006):**

Anti-ischaemic effect of ivabradine. *Pharmacol Res* 53: 435-439.

**Fonseca V, Bakris GL, Bell DS, McGill JB, Raskin P, Messerli FH, Phillips RA, Katholi RE, Wright JT Jr, Waterhouse B, Lukas MA, Anderson KM, GEMINI Investigators (2007):**

Differential effect of beta-blocker therapy on insulin resistance as a function of insulin sensitizer use: results from GEMINI. *Diabet Med* 24: 759-763.

**Fox KM, Ferrari R (2011):**

Heart rate: a forgotten link in coronary artery disease? *Nat Rev Cardiol* 8: 369-379.

**Garrard CS, Kontoyannis DA und Piepoli M (1993):**

Spectral analysis of heart rate variability in the sepsis syndrome. *Clin Auton Res* 3: 5-13.

**Gauss R, Seifert R, Kaupp UB (1998):**

Molecular identification of a hyperpolarization-activated channel in sea urchin sperm. *Nature* 393: 583-587.

**George CF (1983):**

Digitalis intoxication: a new approach to an old problem. *Br Med J (Clin Res Ed)* 286: 1533-1534.

**Gholami M, Mazaheri P, Mohamadi A, Dehpour T, Safari F, Hajizadeh S, Moore KP, Mani AR (2012):**

Endotoxemia is associated with partial uncoupling of cardiac pacemaker from cholinergic neural control in rats. *Shock* 37: 219-227.

**Gorre F, Vandekerckhove H (2010):**

Beta-blockers: focus on mechanism of action. Which beta-blocker, when and why? *Acta Cardiol* 65: 565-570.

**Hobley A, Lawrenson J (1991):**

Ocular adverse effects to the therapeutic administration of digoxin. *Ophthalmic Physiol Opt* 11: 391-393.

**Hoke RS, Müller-Werdan U, Lautenschläger C, Werdan K, Ebelt H (2012):**

Heart rate as an independent risk factor in patients with multiple organ dysfunction: a prospective, observational study. *Clin Res Cardiol* 101: 139-147.

**Hozawa A, Ohkubo T, Kikuya M, Ugajin T, Yamaguchi J, Asayama K, Metoki H, Ohmori K, Hoshi H, Hashimoto J, Satoh H, Tsuji I, Imai Y (2004):**

Prognostic value of home heart rate for cardiovascular mortality in the general population: the Ohasama study. *Am J Hypertens* 17: 1005-1010.

**Hui KK, Yu JL (1988):**

The effects of calcium channel blockers on isoproterenol induced cyclic adenosine 3'5'-monophosphate generation in intact human lymphocytes. *Life Sci* 42: 2037-2045

**Hunter JD, Doddi M (2010):**

Sepsis and the heart. *Br J Anaesth* 104: 3-11.

**Irisawa H, Brown HF, Giles W (1993):**

Cardiac pacemaking in the sinoatrial node. *Physiol Rev* 73: 197-227.

**Ishii TM, Takano M, Xie LH, Noma A, Ohmori H (1999):**

Molecular characterization of the hyperpolarization-activated cation channel in rabbit heart sinoatrial node. *J Biol Chem* 274: 12835-12839.

**Kannel WB (1987):**

Epidemiology and prevention of cardiac failure: Framingham Study insights. *Eur Heart J* 8 Suppl F: 23-26.

**Kelly J, Kelleher K (2000):**

Beta-blocker use in elderly patients with coronary heart disease. *Age Ageing* 29: 17-21.

**Kleinbloesem CH, van Brummelen P, Danhof M, Faber H, Urquhart J, Breimer DD (1987):**

Rate of increase in the plasma concentration of nifedipine as a major determinant of its hemodynamic effects in humans. *Clin Pharmacol Ther* 41: 26-30.

**Klößner U, Rueckschloss U, Grossmann C, Ebelt H, Müller-Werdan U, Loppnow H, Werdan K, Gekle M (2011):**

Differential reduction of HCN channel activity by various types of lipopolysaccharide. *J Mol Cell Cardiol* 51: 226-235.

**Klößner U, Rueckschloss U, Grossmann C, Matzat S, Schumann K, Ebelt H, Müller-Werdan U, Loppnow H, Werdan K, Gekle M (2014):**

Inhibition of cardiac pacemaker channel hHCN2 depends on intercalation of lipopolysaccharide into channel-containing membrane microdomains. *J Physiol* 592: 1199-1211.

**Knuefermann P, Sakata Y, Baker JS, Huang CH, Sekiguchi K, Hardarson HS, Takeuchi O, Akira S, Vallejo JG (2004):**

Toll-like receptor 2 mediates *Staphylococcus aureus*-induced myocardial dysfunction and cytokine production in the heart. *Circulation* 110: 3693-3698.

**Krone W, Nägele H (1988):**

Effects of antihypertensives on plasma lipids and lipoprotein metabolism. *Am Heart J* 116: 1729-1734.

**Kruse PF, Patterson MK (1973):**

Tissue Culture: Methods and Applications. 1. Aufl. Academic Press, New York, 1973, S. 77-80.

**Kumar A, Krieger A, Symeoneides S, Kumar A, Parrillo JE (2001):**

Myocardial dysfunction in septic shock: Part II. Role of cytokines and nitric oxide. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 15: 485-511.

**Lehnich H, Kaltenborn G, Müller-Werdan U, Pauer HD (2001):**

Digitalisierung, Verarbeitung und Auswertung von Videoaufzeichnungen in Echtzeit zur Kontraktilitätsmessung an isolierten Herzzellen. In: Jamal R, Jaschinski H (Hrsg): *Virtuelle Instrumente in der Praxis*. Hüthig Verlag, Heidelberg, S. 312-317.

**Lewis RV, Lofthouse C (1993):**

Adverse reactions with beta-adrenoceptor blocking drugs. An update. *Drug Saf* 9: 272-279.

**Libby P, Hansson GK (1991):**

Involvement of the immune system in human atherogenesis: current knowledge and unanswered questions. *Lab Invest* 64: 5-15.

**Loppnow H, Brade H, Dürrbaum I, Dinarello CA, Kusumoto S, Rietschel ET, Flad HD (1989):**

IL-1 induction-capacity of defined lipopolysaccharide partial structures. *J Immunol* 142: 3229-3238.

**Loppnow H, Werdan K, Buerke M (2008):**

Vascular cells contribute to atherosclerosis by cytokine- and innate-immunity-related inflammatory mechanisms. *Innate Immun* 14: 63-87.

**Ludwig A, Zong X, Jeglitsch M, Hofmann F, Biel M (1998):**

A family of hyperpolarization-activated mammalian cation channels. *Nature* 393: 587-591.

**Mangoni ME, Marger L, Nargeot J (2006):**

If current inhibition: cellular basis and physiology. *Adv Cardiol* 43: 17-30.

**Nakamura A, Kohsaka T, Jin D, Kobayashi N (1992):**

Influence of glucocorticoid, aspirin, and gamma globulin on interleukin-6 production in the hepatoma cell line. *Immunopharmacology* 24: 31-36.

**Nanchen D, Stott DJ, Mooijaart SP, Westendorp RG, Jukema JW, Macfarlane PW, Cornuz J, Rodondi N, Buckley BM, Ford I, Sattar N, de Craen AJ, PROSPER Group (2013):**

Resting heart rate and incident heart failure and cardiovascular mortality in older adults: role of inflammation and endothelial dysfunction: the PROSPER study. *Eur J Heart Fail* 15: 581-588.

**Nuding S, Ebelt H, Hoke RS, Krummnerl A, Wienke A, Müller-Werdan U, Werdan K (2011):**

Reducing elevated heart rate in patients with multiple organ dysfunction syndrome by the I (f) (funny channel current) inhibitor ivabradine: MODI(f)Y trial. *Clin Res Cardiol* 100: 915-923.

**Parrillo JE (2003):**

The cardiovascular pathophysiology of sepsis. *Annu Rev Med* 40: 469-485.

**Pontet J, Contreras P, Curbelo A, Medina J, Noveri S, Bentancourt S, Migliaro ER (2003):**

Heart rate variability as early marker of multiple organ dysfunction syndrome in septic patients. *J Crit Care* 18: 156-163.

**Ramahi TM (2000):**

Beta blocker therapy for chronic heart failure. *Am Fam Physician* 62: 2267-2274.

**Reeder SJ, Hoffmann RL (2001):**

Beta-blocker therapy for hypertension. *Dimens Crit Care Nurs* 20: 2-9.

**Rietschel ET, Kirikae T, Schade FU, Mamat U, Schmidt G, Loppnow H, Ulmer AJ, Zähringer U, Seydel U, Padova FD (1994):**

Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. *FASEB J* 8: 217-225.

**Rognoni A, Bertolazzi M, Macciò S, Rognoni G (2009):**

Ivabradine: cardiovascular effects. *Recent Pat Cardiovasc Drug Discov* 4: 61-66.

**Ross R (1999):**

Atherosclerosis--an inflammatory disease. *Am Heart J* 138: 419-420.

**Scheruebel S, Koyani CN, Hallström S, Lang P, Platzer D, Mächler H, Lohner K, Malle E, Zorn-Pauly K, Pelzmann B (2014):**

If blocking potency of ivabradine is preserved under elevated endotoxin levels in human atrial myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 72C: 64-73.

**Schirmer SH, Degen A, Baumhäkel M, Custodis F, Schuh L, Kohlhaas M, Friedrich E, Bahlmann F, Kappl R, Maack C, Böhm M, Laufs U (2012):**

Heart-rate reduction by If-channel inhibition with ivabradine restores collateral artery growth in hypercholesterolemic atherosclerosis. *Eur Heart J* 33: 1223-1231.

**Schmidt HB, Werdan K, Müller-Werdan U (2001):**

Autonomic dysfunction in the ICU patient. *Curr Opin Crit Care* 7: 314-322.

**Schmidt H, Müller-Werdan U, Hoffmann T, Francis DP, Piepoli MF, Rauchhaus M, Prondzinsky R, Loppnow H, Buerke M, Hoyer D, Werdan K (2005):**

Autonomic dysfunction predicts mortality in patients with multiple organ dysfunction syndrome of different age groups. *Crit Care Med* 33: 1994-2002.

**Schmidt H, Saworski J, Werdan K, Müller-Werdan U (2007):**

Decreased beating rate variability of spontaneously contracting cardiomyocytes after co-incubation with endotoxin. *J Endotoxin Res* 13: 339-342.

**Seamon KB, Daly JW (1981):**

Forskolin: a unique diterpene activator of cyclic AMP-generating systems. *J Cyclic Nucleotide Res* 7: 201-224.

**Seccareccia F, PannoZZo F, Dima F, Minoprio A, Menditto A, Lo Noce C, Giampaoli S, Malattie Cardiovascolari Aterosclerotiche Istituto Superiore di Sanita Project (2001):**

Heart rate as a predictor of mortality: the MATISS project. *Am J Public Health* 91: 1258-1263.

**Shepherd RE, McDonough KH, Burns AH (1986):**

Mechanism of cardiac dysfunction in hearts from endotoxin-treated rats. *Circ Shock* 19: 371-384.

**Shi W, Wymore R, Wu J, Wymore RT, Pan Z, Robinson RB, Dixon JE, McKinnon D, Cohen IS (1999):**

Distribution and prevalence of hyperpolarization-activated cation channel (HCN) mRNA expression in cardiac tissues. *Circ Res* 85: 1-6.

**Singh BN, Ellrodt G, Peter CT (1978):**

Verapamil: a review of its pharmacological properties and therapeutic use. *Drugs* 15: 169-197.

**Stieber J (2008):**

Ivabradine: pharmacodynamic aspects of its clinical use. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 30: 633-641.

**Van Snick J, Cayphas S, Vink A, Uyttenhove C, Coulie PG, Rubira MR, Simpson RJ (1986):**

Purification and NH<sub>2</sub>-terminal amino acid sequence of a T-cell-derived lymphokine with growth factor activity for B-cell hybridomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 9679-9683.

**Vasquez EC, Cabral AM, Mill JG, Moyses MR (1988):**

Effects of nifedipine on blood pressure and heart rate in conscious neurogenic hypertensive rats. *Pharmacology* 37: 370-375.

**Vincent JL, Rello J, Marshall J, Silva E, Anzueto A, Martin CD, Moreno R, Lipman J, Gomersall C, Sakr Y, Reinhart K, EPIC II Group of Investigators (2009):**

International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units. *JAMA* 302: 2323-2329.

**Weiss RJ (1991):**

Effects of antihypertensive agents on sexual function. *Am Fam Physician* 44: 2075-2082.

**Werdan K, Erdmann E (1989):**

Preparation and culture of embryonic and neonatal heart muscle cells: modification of transport activity. *Methods Enzymol* 173: 634-662.

**Werdan K, Oelke A, Hettwer S, Nuding S, Bubel S, Hoke R, Russ M, Lautenschläger C, Müller-Werdan U, Ebelt E (2011):**

Septic cardiomyopathy: hemodynamic quantification, occurrence, and prognostic implications. *Clin Res Cardiol* 100: 661-668.

**Werdan K, Schmidt H, Ebelt E, Zorn-Pauly K, Koidl B, Hoke RS, Heinroth K, Müller-Werdan U (2009):**

Impaired regulation of cardiac function in sepsis, SIRS, and MODS. *Can J Physiol Pharmacol* 87: 266-274.

**Whelton SP, Narla V, Blaha MJ, Nasir K, Blumenthal RS, Jenny NS, Al-Mallah MH, Michos ED (2014):**

Association between resting heart rate and inflammatory biomarkers (high-sensitivity C-reactive protein, interleukin-6, and fibrinogen) (from the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis). *Am J Cardiol* 113: 644-649.

**Wilkinson MF, Earle ML, Triggle CR, Barnes S (1996):**

Interleukin-1beta, tumor necrosis factor-alpha, and LPS enhance calcium channel current in isolated vascular smooth muscle cells of rat tail artery. *FASEB J* 10: 785-791.

**Yu FH, Catterall WA (2004):**

The VGL-channome: a protein superfamily specialized for electrical signaling and ionic homeostasis. *Sci STKE* 2004: re15.

**Zhang T, Feng Q (2010):**

Nitric oxide and calcium signaling regulate myocardial tumor necrosis factor- $\alpha$  expression and cardiac function in sepsis. *Can J Physiol Pharmacol* 88: 92-104.

**Zorn-Pauly K, Pelzmann B, Lang P, Mächler H, Schmidt H, Ebelt H, Werdan K, Koidl B, Müller-Werdan U (2007):**

Endotoxin impairs the human pacemaker current *I<sub>f</sub>*. *Shock* 28: 655-661.

**Zu L, He J, Jiang H, Xu C, Pu S, Xu G (2009):**

Bacterial endotoxin stimulates adipose lipolysis via toll-like receptor 4 and extracellular signal-regulated kinase pathway. *J Biol Chem* 284: 5915-5926.

## 8 Thesen

1. In Kardiomyozyten exprimierte HCN-Kanäle (*hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated cation channels*) tragen wesentlich zur Regulation des kardialen Schrittmacher-rhythmus bei.
2. Im Rahmen septischer Erkrankungen kann die Regulation der Schlagrate durch bakterielles Lipopolysaccharid (LPS) gestört werden. Elektrophysiologische Untersuchungen ließen vermuten, dass LPS direkt mit den kardialen HCN-Kanälen interagieren kann.
3. Die spontane rhythmische Aktivität von isolierten Kardiomyozyten *in vitro* wurde durch LPS gehemmt.
4. Co-Inkubation von Kardiomyozyten mit LPS und Ivabradin zeigte keine additive Senkung der Schlagrate, was vermuten lässt, dass beide Substanzen über den gleichen Weg, d. h. den kardialen HCN-Kanal, wirken.
5. Im Gegensatz dazu lässt die additive Senkung der Schlagrate bei Co-Inkubation der Kardiomyozyten mit LPS und Nifedipin bzw. Verapamil vermuten, dass LPS die Schlagrate nicht über Effekte an kardialen Kalzium-Kanälen beeinflusst.
6. Co-Inkubation der Kardiomyozyten mit Ivabradin und Nifedipin bzw. Verapamil reduzierte die Schlagrate additiv, was gegen eine unspezifische Wirkung von Ivabradin über Kalzium-Kanäle bzw. von Nifedipin und Verapamil über HCN-Kanäle spricht.
7. LPS, Ivabradin und Nifedipin bewirkten keine Änderung der cAMP-Konzentration.
8. Ivabradin und Nifedipin bewirkten lediglich eine geringfügige Senkung der Interleukin-6-Konzentration in den Überständen der Kardiomyozyten.
9. Das vorliegende Testsystem weist aufgrund des Fehlens des autonomen Nervensystems auf einen direkten Einfluss von LPS auf die HCN-Kanäle hin.
10. Die Auswirkungen von LPS auf die Schlagratenregulation in Anwesenheit des autonomen Nervensystems *in vivo* können in weiterführenden tierexperimentellen Studien untersucht werden.

# A Anlagen

## A.1 *Curriculum vitae*

|                     |                                  |
|---------------------|----------------------------------|
| Name                | Isabel Geißler                   |
| Geburtsdatum        | 21. Februar 1990                 |
| Geburtsort          | Lutherstadt Wittenberg           |
| Staatsangehörigkeit | deutsch                          |
| Eltern              | Marion Geißler<br>Michael Schulz |

### **SCHULISCHER WERDEGANG**

|             |  |
|-------------|--|
| 1996 – 2000 | Grundschule „Heinrich Heine“, Reinsdorf    |
| 2000 – 2002 | Sekundarschule „Heinrich Heine“, Reinsdorf |
| 2002 – 2008 | Luther-Melanchthon-Gymnasium, Wittenberg   |
| 06/2008     | Allgemeine Hochschulreife (Abitur)         |

### **STUDIUM**

|                   |   |
|-------------------|---|
| 10/2008 – 10/2014 | Studium der Medizin, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg |
| 09/2010           | Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung mit Prädikat „Sehr gut“ |
| 11/2014           | Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung mit Prädikat „Gut“     |

### **BERUFFSTÄTIGKEIT**

|              |  |
|--------------|--|
| Seit 02/2015 | Assistenzärztin für Innere Medizin im Paul-Gerhardt-Stift Wittenberg |
|--------------|--|

### **DISSERTATION UND PUBLIKATIONEN**

|                   |  |
|-------------------|--|
| 08/2011 – 09/2012 | Experimentelle Arbeit im Rahmen der Dissertation unter Leitung von Professor Dr. Harald Loppnow an der Universitätsklinik und Poliklinik für Innere Medizin III der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (Direktor: Professor Dr. Stefan Frantz)   |
| 2014              | Ebelt H, Geißler I, Ruccius S, Otto V, Hoffmann S, Korth H, Klöckner U, Zhang Y, Li Y, Grossmann C, Rueckschloss U, Gekle M, Stieber J, Frantz S, Werdan K, Müller-Werdan U, Loppnow H (2014) Direct inhibition, but indirect sensitization of pacemaker activity to sympathetic tone by Endotoxin (zur Publikation eingereicht) |

Halle (Saale), den 14. Februar 2015

## A.2 Selbstständigkeitserklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Ich versichere, dass ich für die inhaltliche Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- und Beratungsdiensten (Promotionsberater oder anderer Personen) in Anspruch genommen habe. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Halle (Saale), den 14. Februar 2015

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'R. J. K.', is written over the date line.

### **A.3 Erklärung über frühere Promotionsversuche**

Hiermit erkläre ich, dass ich bisher keine früheren Promotionsversuche mit dieser oder einer anderen Dissertation unternommen habe. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Halle (Saale), den 14. Februar 2015

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Reipke', written in a cursive style.

## **A.4 Danksagung**

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. Harald Loppnow für die gute Zusammenarbeit sowie für die vielen hilfreichen Diskussionen bedanken. Herrn Prof. Dr. Karl Werdan möchte ich für die Überlassung des interessanten Themas und die Förderung während dieser Arbeit danken. Meinen besonderen Dank richte ich an Frau Pilowski und Frau Koch für die Einarbeitung in die Arbeitstechniken. Ich danke für die freundliche Arbeitsatmosphäre, die fachliche Unterstützung und die stete Bereitschaft zu anregenden kritischen Diskussionen.

Nicht zuletzt danke ich meiner Familie, die mir dieses Studium ermöglicht und mir stets hilfreich zur Seite gestanden hat, aber ganz besonders meiner Mutter Marion Geißler für ihre liebevolle Unterstützung.