

## **4. Diskussion**

### **4.1 Die Herzfunktion unter diabetischen Bedingungen**

#### **4.1.1 Die basale systolische Funktion unter diabetischen Bedingungen**

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass es bereits früh nach der Induktion eines Diabetes Mellitus Typ 1 zu einer eingeschränkten systolischen Funktion kommt. Dies zeigte sich durch eine signifikant reduzierte Druckanstiegsgeschwindigkeit ( $dp/dt \max$ ), sowie durch einen signifikant erniedrigten systolischen Druck ( $P_{es}$ ). Dies steht im Einklang mit vorherigen Arbeiten im gleichen Modell [33, 34]. Um aber den Einfluss der STZ-diabetischen Stoffwechsellage auf die Kontraktilität zu untersuchen zu können, sind weitere Parameter notwendig, da die Kontraktilität per definitionem unabhängig von den Vor- und Nachlastbedingungen ist [35]. Die Bestimmung der Kontraktilität ist deswegen von Bedeutung, da durch sie die primäre Veränderung der intraarteriellen Volumensituation von der Veränderung der intrinsischen Kontraktionskraft separiert werden kann. Daher wurde der ESPVR als Maß für die Kontraktilität bestimmt [31]. Der ESPVR war bereits 2 Wochen nach Diabetesinduktion signifikant verringert. Interessanterweise war der ESPVR 2 Wochen nach Diabetesinduktion im Vergleich zum ESPVR 6 Wochen nach Diabetesinduktion nicht signifikant unterschiedlich, was eindeutig eine frühe Störung der linksventrikulären Kontraktilität bereits 2 Wochen nach Diabetesinduktion demonstriert. Trotz der eingeschränkten systolischen Herzfunktion bei beiden untersuchten Zeitpunkten zeigte sich eine Reduktion des Schlagvolumens als eine mögliche hämodynamische Konsequenz der Kontraktilität des linken Ventrikels nur 2

Wochen nach Diabetesinduktion. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass eine unbehandelte, chronische, diabetische Stoffwechsellage auch in dem hier untersuchten Rattenmodell zu einer massiven osmotischen Diurese führt [36]. Die hämodynamischen Effekte der Diurese, insbesondere eine reduzierte Nachlast, sind erwartungsgemäß in einem chronischen Stadium stärker ausgeprägt, als in einem frühen Stadium. Diese Erklärung wird auch dadurch untermauert, dass die Nachlast in der vorliegenden Arbeit 2 Wochen nach Diabetesinduktion nicht signifikant verändert war. Im Gegensatz dazu ist die Nachlast 6 Wochen nach Diabetesinduktion deutlich reduziert im Vergleich zu normoglykämischen Bedingungen, was ein nahezu gleiches Schlagvolumen gut begründen kann. In einer anderen Studie konnten gegenteilige Daten im gleichen Modell evaluiert werden [37]. Hier wurde ein erniedrigtes Schlagvolumen 6 Wochen nach STZ Injektion in gleicher Dosierung dokumentiert. Die kardiale Phänotypisierung wurde hier mittels Magnet-Resonanz-Tomographie evaluiert. Auch wenn diese Technik bei Patienten ein valides diagnostisches Messgerät darstellt, so ist die Magnet-Resonanz-Tomographie im Kleintier noch eine sehr junge Methode mit im Vergleich zur Konduktanzmessmethode eingeschränkter Validität. Aber auch eine veränderte intraarterielle Volumensituation durch unterschiedlich verwendete Narkotika im Vergleich zur vorliegenden Arbeit ein Grund für das erniedrigte Schlagvolumen unter STZ-diabetischen Bedingungen sein. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass STZ eine unterschiedliche Kinetik bzw. Effekte auf verschiedene Rattenstämme hat. So wurden in der Arbeit von Al-Shafei et al. Wistar Ratten verwendet, wohingegen in der vorliegenden Arbeit Sprague Dawley Ratten benutzt wurden. Aus einem

myokarditischen Kleintiermodell ist beispielsweise eine gravierend differierende Suszeptibilität für verschiedene Tierstämme in Bezug auf eine Infektion mit Coxsackievirus B3 gut belegt [38, 39].

#### **4.1.2 Die basale diastolische Funktion unter diabetischen Bedingungen**

Unter basalen Bedingungen zeigten STZ-diabetische Ratten eine progrediente diastolische Funktionsstörung. Bereits 2 Wochen nach STZ-Injektion kam es zu einer signifikant reduzierten aktiven LV Relaxation, gemessen an einer reduzierten Druckabfallsgeschwindigkeit und einem verlängertem Tau. Im Gegensatz dazu zeigte ein Parameter der vorlast-abhängigen passiven Relaxation, der LVEDP, keinen signifikanten 2 und 6 Wochen nach STZ Injektion im Vergleich zu normoglykämischen Kontrollratten. Der EDPVR als vorlast-unabhängiger Parameter der diastolischen LV Funktion war jedoch 6 Wochen nach STZ Injektion signifikant erhöht im Vergleich zu normoglykämischen Kontrollratten. Dies zeigt, dass die konventionellen Parameter wie der LVEDP wesentlich durch eine veränderte Nachlast beeinflusst werden und so *in vivo* in diesem Tiermodell zur Charakterisierung der diastolischen LV Funktion nicht ausreichen. Als wahrscheinlichste Ursache für die starke Beeinflussung der Vorlast und dem damit verbundenen unverändertem LVEDP trotz einer massiven diastolischen Funktionsstörung ist in diesem Tiermodell der diabetischen Kardiomyopathie die starke Polyurie bei STZ-diabetischen Ratten, die in der Literatur gut belegt ist und die wir auch im Rahmen der vorliegenden Studie beobachteten [28, 36, 40-42]. Aufgrund dieser starken Änderung der Vorlast im STZ-Rattenmodell durch eine bei unbehandelter diabetischer Stoffwechsellage typischen osmotischen Diurese ist es

zur exakten Bestimmung der diastolischen LV Funktion notwendig, vorlast-unabhängige Parameter zu bestimmen. Die EDPVR gilt als einer der sensitivsten Parameter der diastolischen Funktion [21, 43]. Diese kann auf unterschiedliche Weise bestimmt werden. Diesbezüglich besteht die Möglichkeit, aus einzelnen Herzschlägen ohne direkte Vorlastsenkung die EDPVR zu errechnen. Diese Methode gilt aber als ungenau. Nur die direkte Erfassung der Relation aufeinander folgender Herzschläge während einer Vorlastsenkung gilt als genau und zuverlässig [44]. aus diesem Grund bietet sich die linksventrikuläre Kathetermessung mittels Konduktanzmessmethode im Tiermodell besonders an. Bei der Berechnung des EDPVR wird eine mathematische Funktion, die sich durch die unterschiedlichen end-diastolischen Werte pro Herzzyklus während einer Vorlastsenkung mittels Vena-Cava-Okklusion ergeben errechnet. Diese Funktion kann als lineare oder exponentielle Funktion angegeben werden. Während beide Messmethoden in der Vergangenheit vor allem wegen technischer Probleme aus den Zeiten der analogen Messung der Druck- und Volumen-Kurven angewandt wurden, so hat sich heute die Erstellung einer exponentiellen Funktion durch mathematische Annäherung im Kleintiermodell durchgesetzt [31]. Die EDPVR kann sich aus unterschiedlichen Gründen verändern [44]. Diskutiert werden zum einen Veränderungen in der extrazellulären Matrix, wie zum Beispiel erhöhte kardiale Fibrose [45], kardiale Hypertrophie [46], eine Störung des Kaliumhaushaltes, sowie eine verminderte Bioverfügbarkeit von Nitritoxid (NO)[21, 47].

#### **4.1.3 Die Herzfunktion unter pharmakologischen Stressbedingungen**

Um die LV Funktion unter Stressbedingungen möglichst exakt bestimmen zu können, wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit zwei verschiedene pharmakologische Stressprotokolle durchgeführt. Zum einen sollte durch eine dosis-abhängige intravenöse Gabe von Dobutamin vor allem die kardiale Betarezeptorantwort von STZ-diabetischen Ratten untersucht werden und mit der von normoglykämischen Ratten verglichen werden. Wir haben hierfür Dobutamin gewählt, da es auch im klinischen Alltag, z. B. bei der Stressechokardiographie, häufig zum Einsatz kommt.

Dobutamin wirkt positiv inotrop, in höherer Dosierung auch positiv chronotrop. In unserem Modell zeigte sich bei Kontrollratten ein progredienter Anstieg der systolischen Parameter, wie der LVP oder die Druckerhöhungsgeschwindigkeit, im Sinne einer positiven Inotropie, jedoch kein signifikanter Unterschied bezüglich der Herzfrequenz. Im Gegensatz dazu zeigten STZ-diabetische Ratten zu beiden untersuchten Zeitpunkten, 2 Wochen und 6 Wochen nach STZ-Injektion, eine signifikant verringerte systolische Pumpfunktion im Vergleich zu den normoglykämischen Kontrollratten. Da Dobutamin Beta-Rezeptoren-selektiv wirkt, sprechen diese Ergebnisse für eine verringerte kardiale betarezeptor-abhängige Stressantwort bei STZ-diabetischen Ratten. Dies kann zum einen in einer verringerten kardialen Dichte der Betarezeptoren begründet sein. Zum anderen ist es auch möglich, dass es durch eine diabetische Stoffwechsellage bei gleicher Rezeptordichte zu einer verringerten Sensibilität der Betarezeptoren kommt [48].

Unter Dobutamin-Stress veränderte sich auch die aktive Relaxation als ein Maß für die frühe diastolische LV Funktion in STZ-diabetischen Ratten im Vergleich zu

normoglykämischen Kontrollratten. Sowohl 2 als auch 6 Wochen nach STZ Injektion kam es zu einer reduzierten Druckabfallsgeschwindigkeit. Unter Dobutamin-Bedingungen änderte sich im Gegensatz zu den Basalbedingungen auch der LVEDP 2 Wochen nach STZ Injektion. Dieser stieg bei steigender Dobutamindosierung in den STZ-diabetischen Ratten signifikant an im Vergleich zu den normoglykämischen Kontrollratten. Sechs Wochen nach STZ Injektion war dies nicht der Fall. Eine wahrscheinliche Ursache hierfür sehen wir die nach 6 Wochen diabetischer Stoffwechsellage wesentlich fortgeschrittene osmotische Diurese, die, wie oben beschrieben, zu einer Vorlastsenkung führt. Nach zweiwöchiger STZ-diabetischer Stoffwechsellage ist die Diurese noch nicht so stark ausgeprägt, so dass der LVEDP hier zumindest unter pharmakologischen Stressbedingungen ansteigen kann.

Um auch die maximal erreichbare Herzfunktion in dem hier untersuchten Tiermodell evaluieren zu können, führten wir zusätzlich nach einer Erholungsphase die Gabe von Adrenalin über die Leber durch [49]. Adrenalin wird wie Dobutamin häufig im klinischen Alltag eingesetzt, z. B. in der Notfall- oder Intensivmedizin. Seine Hauptwirkung ist die inotrope Stimulation des Herzens, inklusive der Zunahme des Schlagvolumens beziehungsweise des Herz-Zeit-Volumens sowie der Steigerung des arteriellen Blutdruckes. Eine weitere Wirkung, wenn auch weniger ausgeprägt, ist die Zunahme der Herzfrequenz. In höherer Dosierung erregt Adrenalin auch die Alpha-Rezeptoren und führt durch Vasokonstriktion zu einem weiteren Blutdruckanstieg. Das Studiendesign wurde in der vorliegenden Arbeit so gewählt, dass hier die maximal erreichbare Leistung des Herzens gemessen werden konnte. Diese wurde definiert als die Herzfunktion kurz vor der kardialen Dekompensation,

welche durch das Auftreten von Herzrhythmusstörungen und/oder dem Verlust der Kontraktilität während der Kathetermessung angezeigt wurde. Unter diesen Bedingungen kam es sowohl zwei, als auch sechs Wochen nach STZ Injektion zu einer reduzierten systolischen LV Funktion im Vergleich zu normoglykämischen Kontrollratten. Bezüglich der diastolischen Funktion stieg der LVEDP analog zum dosis-abhängigen Dobutaminstress nur zwei Wochen nach STZ Injektion an.

Zusammenfassend konnte die vorliegende Arbeit zeigen, dass in dem hier untersuchten STZ Rattenmodell sowohl die dosis- und betarezeptoren-abhängige, als auch die maximal erreichbare LV Funktion wesentlich und schon frühzeitig durch eine STZ-diabetische Stoffwechsellage beeinträchtigt werden. Die Messung der Herzfunktion in diesem Modell unter Stressbedingungen ist insbesondere im Hinblick auf die Übertragbarkeit von in diesem Modell erhobenen Daten auf den Menschen von Bedeutung. So gelten als häufige frühe Symptome der diabetischen Herzmuskelerkrankung Herzklopfen und Herzrasen, während später vor allem Zeichen der eingeschränkten Belastbarkeit, insbesondere während Belastung auftretende Luftnot und eine nach Belastung über das normale Maß hinausgehende, lang anhaltende Tachykardien auftreten.

## **4.2 Pathophysiologische Mechanismen der kardialen Dysfunktion unter diabetischen Bedingungen**

### **4.2.1 Mechanismen der systolischen Dysfunktion**

In zahlreichen experimentellen und humanen Studien konnte eine systolische Pumpfunktionsstörung bei der diabetischen Kardiomyopathie gezeigt werden [41, 50-54]. Beispielsweise konnten Riad et al. in einem Tiermodell der diabetischen Kardiomyopathie eine stark verminderte Kontraktionsfähigkeit des linken Ventrikel in vivo zeigen [36]. Wie oben schon erwähnt, ist die systolische Pumpfunktionsstörung ein wesentlicher Bestandteil in der Pathogenese der diabetischen Kardiomyopathie. Eine dauerhafte Hyperglykämie führt hier zu einer beeinträchtigten myokardialen Glucoseaufnahme aufgrund von Glukosetransporter- und Insulinrezeptordefekten [18, 55]. Auf den relativen Glukosemangel reagieren die Myozyten mit der Reduktion der aeroben Glykolyse zugunsten eines energetisch ungünstigeren gesteigerten Abbaus freier Fettsäuren[56]. Die Folge ist ein erhöhter Sauerstoffbedarf und eine reduzierte Bereitstellung von zytosolischem ATP in den Myozyten, was eine Verminderung der Aktivität der Kalzium- ATPase (SERCA) des sarkoplasmatischen Retikulums und eine relative Kalziumüberladung bedingt [34]. Durch eine direkte Glykotoxizität und durch eine intramyozytäre metabolische Entgleisung kommt es außerdem zu einer erhöhten Produktion von freien Sauerstoffradikalen, dem so genannten oxidativen Stress. Es konnte beispielsweise gezeigt werden, dass unter diabetischen Bedingungen vermehrt toxische Sauerstoffradikale durch eine Überaktivität der NADPH-Oxidase gebildet werden [28, 57]. Durch die metabolischen

Veränderungen im Herzen kommt es also zu einer Dysregulation des intrazellulären Kalziumhaushaltes, sowie zur Produktion von oxidativem Stress, was in der Folge zu einer verminderten Kontraktionsfähigkeit des Myozyten führt [18, 58, 59].

#### **4.2.2 Mechanismen der diastolischen Dysfunktion**

Eine diastolische Pumpfunktionsstörung besteht aus Störungen der diastolischen Füllung des Herzens, die häufig als erstes Zeichen einer linksventrikulären Dysfunktion beim Diabetiker gesehen wird und möglicherweise den systolischen Veränderungen vorausgeht [60, 61]. Störungen der frühen und der späten Diastole begründen sich auf verschiedene Ursachen. Die frühe diastolische Füllung wird am stärksten durch eine verlangsamte Relaxation des Herzens behindert. Aber auch ein dysregulierter Kalziumhaushalt, subendokardiale Fibrose und besonders eine veränderte Vorlast können diesen Teil der Diastole verändern [62]. Die späte Phase der Diastole wird wiederum durch die passive Dehnbarkeit des linken Ventrikel beeinflusst [44]. In all diesen Faktoren scheinen Patienten mit einer diabetischen Kardiomyopathie beeinträchtigt zu sein. Die diastolische Dysfunktion löst einen Anstieg des LVEDP aus und durch einen Rückstau kommt es dann zu einem Anstieg im pulmonalen Kreislauf. Auch im Tiermodell konnte die Beeinträchtigung der Diastole durch die diabetische Kardiomyopathie nachgewiesen werden. Westermann et al. zeigten beispielsweise Typ1-diabetische Mäuse, die eine verlängerte Relaxation und damit Zeichen der diastolischen Dysfunktion aufwiesen im Gegensatz zu gesunden Kontrollmäusen aufzeigten [51].

### **4.3 Der Methodische Ansatz**

#### **4.3.1 Das Tiermodell**

In dieser Arbeit wurde zur Untersuchung des Diabetes Mellitus Typ 1 und seiner kardialen hämodynamischen Komplikationen das STZ-Modell verwendet. Es gibt eine Reihe verschiedener Diabetesmodelle. Das STZ-Modell ist dabei eines der bedeutendsten, um einem dem Menschen möglichst ähnlichen Diabetes Mellitus Typ 1 und deren Komplikationen zu untersuchen. Andere Diabetesmodelle, wie die chirurgische Exstirpation des Pankreas, haben gegenüber dem STZ-Modell erhebliche Nachteile. Hierbei würden neben den  $\beta$ -Zellen auch alle weiteren für den Stoffwechsel bedeutenden Pankreaszellen mit entfernt, die durch die Gabe von STZ in einer Dosis von 70 mg/kg ihrer Funktion nicht beeinträchtigt werden. Erst Dosen von mehr als 100 mg/kg wirken im Rattenmodell zytotoxisch auf den Organismus [63, 64]. In der hier verwendeten Dosis verursacht STZ schweren Diabetes Mellitus Typ 1, der nach sechs Wochen zu einer Verminderung des Körpergewichtes sowie zu einer schweren Hyperglykämie ( $>550$  mg/dl) gegenüber den gleichaltrigen normoglykämischen Kontrollen führt [65]. Die STZ-diabetische Ratte weist viele weitere Symptome auf, die beim Menschen mit Diabetes Mellitus Typ 1 auftreten. Dazu gehören neben einer ausgeprägten Hyperglykämie auch Polydipsie, Glykosurie und Polyurie. Da in dem hier verwendeten STZ-Modell noch eine residuale Insulinsekretion durch noch vorhandene  $\beta$ -Zellen gegeben ist, benötigen die STZ-Ratten kein exogenes Insulin. Ein hoher Grad an Reproduzierbarkeit und ein im Vergleich zum Menschen kurzer Beobachtungszeitraum sind weitere wesentliche Vorteile dieses Modells. Auch aus ökonomischer Sicht ist dieses Modell gut

einzusetzen. Zusammenfassend ist das STZ-Modell gut geeignet um die hämodynamischen Konsequenzen einer diabetischen Kardiomyopathie zu untersuchen. Experimentelle Studien haben in der Vergangenheit bereits gezeigt, dass ein chronischer, unbehandelter STZ-induzierter Diabetes Mellitus nach 6 Wochen zu einer linksventrikulären Abnahme von vorlast-abhängigen Parametern der systolischen und diastolischen Herzfunktion, nämlich des LVP, der  $dp/dt_{max}$  sowie der  $dp/dt_{min}$ , führt [18, 36, 41, 51, 52, 66]. Diese Arbeit konnte zusätzlich zeigen, dass es bereits nach zwei Wochen post Diabetesinduktion zu einer signifikant verschlechterten Herzfunktion im Vergleich zu normoglykämischen Kontrolltieren kommt. Dieselben kardialen Veränderungen, die sich beim Menschen mit Diabetes Mellitus erst nach Monaten bis Jahren nachweisen lassen, treten im STZ-Rattenmodell somit bereits nach zwei bzw. sechs Wochen auf. Neben den experimentellen Möglichkeiten, die diabetische Kardiomyopathie in vivo zu erforschen, ist das STZ-Modell daher auch zur Entwicklung neuer Therapiestrategien in einem überschaubaren Zeitrahmen sehr gut einsetzbar. Daher ist es wichtig, dieses Modell im Sinne der Fragestellung der Arbeit hämodynamisch exakt zu charakterisieren.

#### **4.3.2 Das Konduktanzmessverfahren zur Evaluierung der Herzfunktion**

Das Konduktanzmessverfahren ist seit den 80er Jahren etabliert. Mit dieser Technik ist es möglich, kontinuierlich Druck-Volumen-Kurven des linken Herzens aufzunehmen und damit das Arbeitsdiagramm des Herzens dar [22, 43, 67].

Der hohe technische Aufwand, die erhöhten Kosten im Vergleich zur konventionellen invasiven Messtechnik der linksventrikulären Herzfunktion und die aufwendige Auswertung der erhobenen Daten verhinderten einen Einsatz der Konduktanztechnik im klinischen Alltag. Mit der Entwicklung von Konduktanzkathetern für Kleintiere rückte diese Technik wieder in den Mittelpunkt des Interesses bezüglich der kardialen Phänotypisierung [68, 69]. Sie ist die einzige Technik, mit der es möglich ist, am Kleintier kontinuierlich sowohl den Druck, als auch das Volumen zu bestimmen ohne dabei den Thorax öffnen zu müssen. Die Messung am geschlossenen Thorax ist auch deswegen ein wesentlicher Vorteil dieser Technik, da sich bei geöffnetem Thorax die hämodynamischen Verhältnisse aufgrund der perikardialen Druckverhältnisse stark verändern würden. Neben diesen Vorteilen ist ein weiterer und zum Verständnis der linksventrikulären Herzfunktion sehr bedeutender Vorteil, dass sich mit der Konduktanztechnik auch vorlast-unabhängige Parameter, wie der ESPVR und der EDPVR evaluieren lassen. Dies ist deswegen wichtig, da die Herzfunktion wesentlich von der aktuellen Volumensituation im Kreislauf abhängt. Dies trifft vor allem bei der diastolischen Funktion des linken Ventrikels zu. So können diastolische Parameter, wie der LVEDP, durch eine Senkung des Kreislaufvolumens (z. B. durch osmotische Diurese oder nach Gabe von Diuretika) fälschlicherweise normwertig sein. Während dies unter therapeutischen Gesichtspunkten bei Patienten gewünscht ist, kann dies im Rahmen von wissenschaftlichen Fragestellungen zu Fehlinterpretationen führen. In diesem Zusammenhang gilt die Bestimmung der intrinsischen Steifigkeit, die sich durch den EDPVR ermitteln lässt, als volumen-unabhängiger Parameter für die diastolische Funktion des linken Ventrikels [70, 71].

Die Genauigkeit des Konduktanzmessverfahrens ist mit anderen Messtechniken wie der Echokardiographie abgeglichen und bestätigt worden [68].

Zusammenfassend gilt die Messung von Druck-Volumen-Kurven des linken Ventrikels mittels Konduktanztechnik als Goldstandard zur Erfassung der Herzfunktion. Jedoch ist dies bei Kleintieren unter Narkose notwendig, so dass bei der Herzfunktion der Einfluss des Narkotikums berücksichtigt werden muss. Um eine reflektorische Schmerzreiz-induzierte Tachykardie auszuschließen, wurde besonders auf eine ausreichende Narkosetiefe geachtet.

Für Barbiturat-Narkotika, wie das hier verwendete Pentobarbital, konnte gezeigt werden, dass diese die Nachlast senken können [72]. So könnte erklärt werden, warum die STZ-diabetischen Ratten keinen signifikant erhöhten LVEDP im Vergleich zu normoglykämischen Kontrollen haben. Da aber in dieser alle drei Tiergruppen der gleichen Narkose ausgesetzt waren, sollte der Fehler systematisch sein und somit die Relation der Unterschiede und damit die Ergebnisse nicht verfälschen.