

## 3. Methoden

### 3.1. Versuchsaapparatur

#### 3.1.1. Aufbau der Versuchsaapparatur

Mit der Versuchsaapparatur können am isolierten Papillarmuskels simultan kontraktile Parameter (siehe 3.1.2.) und Konzentrationsunterschiede des intrazellulären Kalziums (der sog. „Kalzium-Transient“) während des Kontraktions-Relaxationszyklus gemessen werden. Der Vorteil dieses Modells besteht darin, dass der Muskel durch Diffusion versorgt wird und sich somit mögliche Veränderungen der Myokardperfusion nicht auswirken.

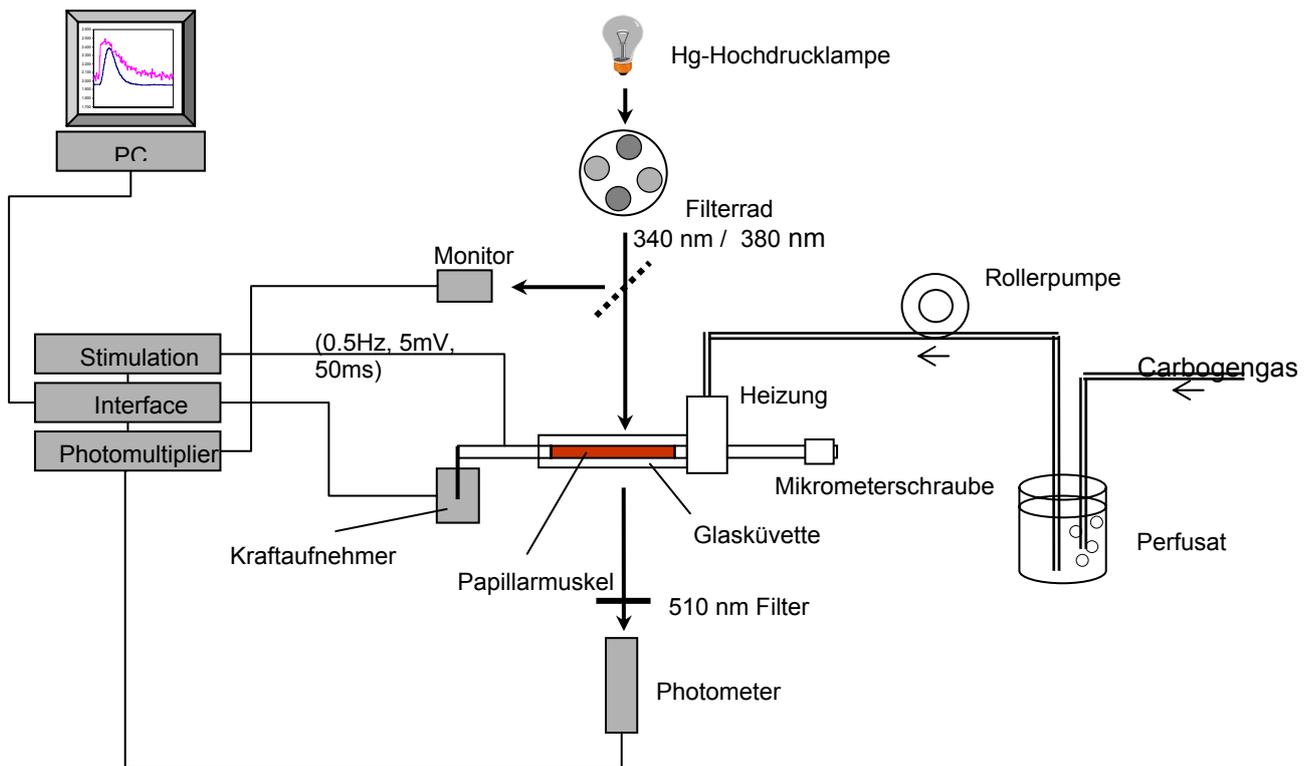
##### 3.1.1.1. Messung der Kontraktilität

Zur Fixation des Muskels in der Apparatur dienen zwei verschließbare Pinzetten, wobei sich an der Linken ein Kraftaufnehmer zur Messung der isometrischen Kontraktion befindet, während die Rechte in ihrem Abstand zur Linken verstellbar ist, so dass auch die Muskellänge und damit die Vorspannung des Muskels geändert werden kann. Nach Fixation des Muskels wird ein Glasröhrchen mit einem Durchmesser von 0,45 cm über den Muskel geschoben durch das mit einer Rollerpumpe gefördertes, mit Carbogengas (95% O<sub>2</sub> und 5% CO<sub>2</sub>) begastes, modifiziertes Krebs-Henseleit-Perfusat (KH) fließt. Vorgeschaltet ist ein Peltier-Element, welches das Perfusat auf die gewünschte Temperatur heizt. Mittels einer an der linken Pinzette angebrachten Elektrode wird der Muskel mit Gleichstrom (5 mV, 50 ms Dauer) elektrisch stimuliert und so zu einer isometrischen, rhythmischen Kontraktion gebracht (siehe Abbildung 1).

##### 3.1.1.2. Messung des Kalzium-Transienten

Zur photometrischen Messung des Kalzium-Transienten wird von einer Quecksilberlampe UV-Licht auf den im Glasröhrchen befindlichen Muskel emittiert. Das Licht wird zuvor durch einen mit 250 HZ rotierenden Filter mit zwei verschiedenen Filterscheiben geleitet, so dass der im Muskel befindliche Kalzium-Indikator Fura-2 abwechselnd mit einer Wellenlänge von 340 bzw. 380 nm zur Fluoreszenz angeregt wird. Die daraus emittierte Fluoreszenz mit einer Wellenlänge von 510 nm wird, um Artefakte zu vermeiden, noch von einem Filter von Streustrahlung befreit, dann von einem Photometer über dem Muskel aufgenommen, an einen Photomultiplier zur

Verstärkung der Lichtquanten weitergeleitet und simultan mit den gemessenen Werten des Kraftaufnehmers digital aufgezeichnet. Um Artefakte durch Intensitätsschwankungen der Quecksilberlampe zu vermeiden befindet sich zwischen Filterrad und Papillarmuskel ein Spiegel, der einen Teil des UV-Lichtes an einen Monitor leitet, welcher Schwankungen der UV-Strahlung registriert und diese mit der gemessenen Fluoreszenz verrechnet ( siehe Abbildung 1).



**Abbildung 1: Schematische Darstellung der Versuchsanordnung**

### 3.1.2. Kontraktile Parameter

Folgende Parameter wurden simultan aufgezeichnet:

$F_{\min}$  (in mN): Die Kraft mit der der Muskel von den beiden Pinzetten gehalten wird, gleichbedeutend mit der Vorspannung des Muskels, die mit der Sarkomerlänge korreliert.

$F_{\max}$  (in mN): Die maximale Kraft der isometrischen Kontraktion.

$+dF/dt$  (in mN/s): Der maximale Anstieg der Geschwindigkeit der Kontraktion.

$-dF/dt$  (in mN/s): Der maximale Abfall der Geschwindigkeit der Kontraktion.

### 3.1.3. Eigenschaften von Fura-2 und Bestimmung des Kalzium-Transienten

Zur photometrischen Messung des Kalzium-Transienten wurde der Kalzium-Indikator Fura-2 verwendet. Fura-2 durchdringt in der Acetoxymethyl (AM) Ester-Form passiv die Plasmamembran der Zelle, wird im Zytosol durch eine Esterase gespalten und somit in die reine Fura-2-Form gebracht, welche die Plasmamembran nicht wieder verlassen kann (70). Der Farbstoff bindet sich selektiv an Kalzium in einem stochiometrischen 1:1 Verhältnis mit einer Dissoziationskonstante von 224 nM (73). D.h. bei einer Kalziumkonzentration von 224 nM ist Fura-2 zur Hälfte aufgesättigt. Die Fura-2-Sättigung ist also von der Konzentration der Kalziums im Zytosol abhängig, wobei der Fura-2-Kalzium-Komplex eine 1,3 bis 2,1 mal höhere Fluoreszenzstärke als das ungebundene Fura-2 hat (73). Eine weitere Eigenschaft von Fura-2 ist die Änderung des Exzitationsmaximums im UV-Licht bei Bindung an Kalzium. Freies Fura-2 hat ein Fluoreszenzmaximum bei Anregung mit einer Wellenlänge von 380 nM, die Kalzium gebundene Form bei Anregung mit einer Wellenlänge von 340 nM (73). Bildet man das Verhältnis R der Fluoreszenzintensitäten bei zwei verschiedenen Wellenlängen, so lässt sich der Kalzium-Transient unabhängig von der absoluten Konzentration von Fura-2 im Medium und der Sensitivität des Meßinstrumentes bestimmen (73). Der maximale systolische Kalzium-Transient  $R_{\max}$  entspricht hierbei dem Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten des mit Kalzium gebundenen Fura-2 bei Anregung mit 340 bzw. 380 nM, der enddiastolische Kalzium-Transient  $R_{\min}$  analog dazu dem Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten des ungebundenen Fura-2 bei 340 bzw. 380 nM. Zusammenfassend:

$$R_{\max} = \frac{\text{Furafluoreszenzintensität bei 340 nM}}{\text{Furafluoreszenzintensität bei 380 nM}}, \text{ Fura-2 mit Kalzium maximal gesättigt}$$

$$R_{\min} = \frac{\text{Furafluoreszenzintensität bei 340 nM}}{\text{Furafluoreszenzintensität bei 380 nM}}, \text{ Fura-2 im ungebundenem Zustand}$$

Mit der hier dargestellten und von uns verwendeten „Fura-Ratio-Methode“ werden Konzentrationsunterschiede des intrazellulären Kalziums und keine absoluten Werte gemessen. Eine genaue Bestimmung der Kalziumkonzentration ist durch eine Kalibrierung des Fluoreszenzsignals möglich. Dies ist jedoch aufwendig und problematisch, da Fura-2 auch in intrazelluläre Organellen wie Mitochondrien geht und dort zu einer Fluoreszenz führt, die unabhängig von der Bindung an Kalzium ist (73). Weiterhin diffundiert Fura-2 mit der Zeit wieder langsam aus dem Zytosol und führt damit zu einer Abschwächung der Kalzium-Fura-2-

Fluoreszenz (73), wobei die ausdiffundierten Farbstoffanteile ebenfalls fluoreszieren und eine Kalibrierung erschweren (74). Deshalb hat sich in der Praxis die Fura-Ratio-Methode durchgesetzt, wobei die intrazelluläre Kalziumkonzentration bzw. der Kalziumtransient in rfu (relative fluorescence units) angegeben wird.

### **3.2. Vorbereitung und Präparation des Papillarmuskels**

#### *3.2.1. Entnahme der Herzen mit anschließender Perfusion nach modifizierter Langendorfftechnik*

Weibliche Wistar-Ratten mit einem Gewicht zwischen 140 bis 180 g wurden durch intraperitoneale Injektion von 5 ml Pentobarbital (50 mg / kg) anästhesiert. Nach Erlöschen der Reflexe erfolgte eine bilaterale Thorakotomie, das Herz wurde entnommen, die Aorta kanüliert, und retrograd nach der Langendorff-Technik mit einem konstanten Druck von 80 cm H<sub>2</sub>O bei Raumtemperatur (25° C) perfundiert. Dabei wurde darauf geachtet, dass die in die Aorta führende Plastikkanüle nicht die Koronarostien verlegte um eine normale Perfusion der Koronarien zu garantieren. Vom Zeitpunkt des Erlöschens der Reflexe bis zur Koronarperfusion an der Langendorffapparatur vergingen im Durchschnitt nur 90 Sekunden, wobei schon während der Präparation das Herz mit 4° C kalter, physiologischer Kochsalzlösung in einen kardioplegischen Zustand versetzt wurde um die Ischämietolleranz zu erhöhen und so einer möglichen Schädigung entgegenzuwirken.

#### *3.2.2. Beladung des Herzens mit Fura-2 AM*

Nach 3 bis 5 Minuten erlangte das Herz einen rhythmischen Kontraktionszyklus und 11 ml begastes (95% O<sub>2</sub> und 5% CO<sub>2</sub>) Perfusat mit einer Fura-2 AM Konzentration von 18 µM wurden für 90 Minuten zur Rezirkulation gebracht. Da der Farbstoff lichtempfindlich ist, wurde die Apparatur währenddessen abgedeckt.

#### *3.2.3. Präparation der Papillarmuskeln*

Für die Versuche wurde jeweils einer der linksventrikulären Papillarmuskeln verwendet. Da der Muskel in der Apparatur nur durch Diffusion versorgt wird, wurde er um eine zentrale Nekrose zu verhindern auf einen Durchmesser von unter 0,8 mm präpariert. Die Wahl des

Muskeldurchmessers basierte auf Untersuchungen von Paradise et al., der zeigte, dass im Model des isolierten Papillarmuskels dieser bei einer Temperatur von 30° C, einer Stimulationsfrequenz von 0,5 Hz und einem Durchmesser von unter 0,94 ausreichend perfundiert wird (75). Um die Präparation des Herzens unter dem Lichtmikroskop zu vereinfachen und die dadurch ausgelöste Traumatisierung möglichst gering zu halten wurde vor der Präparation das Herz für 5 bis 10 Minuten mit KH perfundiert, welchem 2,3-Butan-Dion Monoxim (BDM) in einer Konzentration von 15 mM zugesetzt war. BDM bindet Kalzium reversibel, unterbricht somit den Querbrückenmechanismus der Muskulatur und führt zum vorübergehenden Kontraktionsstillstand des Muskels (76). Anschließend wurde das Herz auf einer Silikonschale fixiert, die mit begaster (95% O<sub>2</sub> und 5% CO<sub>2</sub>) KH-BDM-Lösung gefüllt war. Die Vorhöfe wurden abgetrennt, die linke Kammer eröffnet und einer der Papillarmuskeln präpariert. Nur gleichmäßig homogen geschnittene Muskeln wurden verwendet mit einer Durchschnittsdicke von 0,6 jedoch nie über 0,8 mm, gemessen mit einer Skala am optischen System der Versuchsapparatur.

#### *3.2.4. Vorspannung der Muskeln*

Der präparierte Papillarmuskel wurde der Länge nach zwischen die beiden Pinzetten der Apparatur eingespannt, elektrisch stimuliert und nach etwa 15 Minuten, nachdem BDM wieder ausdiffundiert war, mit  $F_{\min}$  auf eine Vorspannung eingestellt, bei der  $F_{\max}$  den höchsten Wert hatte. Diese Einstellung von  $F_{\min}$  entsprach der Sarkomerlänge bei welcher der Muskel eine maximale Kraftentwicklung zeigte, in der Literatur auch als  $L_{\max}$  bezeichnet. Anschließend wurde die Vorspannung auf 50% des ermittelten Wertes von  $L_{\max}$  reduziert, da Vorversuche zeigten, dass der Muskel in diesem Bereich konstant schlug und auf Interventionen gut reagierte. Dann ließ man den Muskel 60 bis 90 Minuten einschlagen, wobei  $F_{\min}$  gegebenenfalls nach korrigiert wurde, bis alle kontraktile Parameter konstant blieben.

### **3.3. PMN-Isolation und Aktivierung**

#### *3.3.1. PMN-Isolation*

20 bis 25 ml EDTA-Vollblut von freiwilligen, gesunden Spendern wurde im Verhältnis 2:1 auf Polymorphprep, ein eigens für die PMN-Isolation entwickeltes Präparat, geschichtet und für 37

min bei 20° C und 450 rpm im Ausschwingrotor zentrifugiert. Durch die Zentrifugation des Blutes über dem Dichtegradienten von Polymorphprep bildeten sich zwei Leukozytenschichten, von denen die untere, welche die PMN enthielt mit einer Pasteurpipette abgenommen wurde. Die zu hohe Osmolarität von Polymorphprep wurde mit 0,45% NaCl ausgeglichen, zur Waschung PBS-Puffer hinzugefügt und die Suspension für 7 min bei 500 rpm zentrifugiert. Nach der Methode von Curnutte et al. (77) erfolgte eine hypotone Hämolyse der im resuspendierten Pellet verbliebenen Erythrozyten mit 18 ml Aqua dest. (4° C / 30 sec.). Anschließend wurde die physiologische Osmolarität mit 6 ml 3,6% NaCl wiederhergestellt. Die Granulozyten wurden dann zwei mal mit PBS-Puffer für 5 min bei 500 rpm gewaschen und zentrifugiert und schließlich mit einer Konzentration von  $1 \times 10^8$  / ml in 200 bis 300 µl PBS-Puffer gehalten. Untersuchungen in der Hämatologie des Institutes für Klinische Chemie der Charité'/Berlin zeigten einen Anteil von 97% neutrophilen Granulozyten und 3% Lymphozyten in der Leukozyten-PBS-Suspension.

### *3.3.2. PMN-Aktivierung und Chemilumineszenz-Messung*

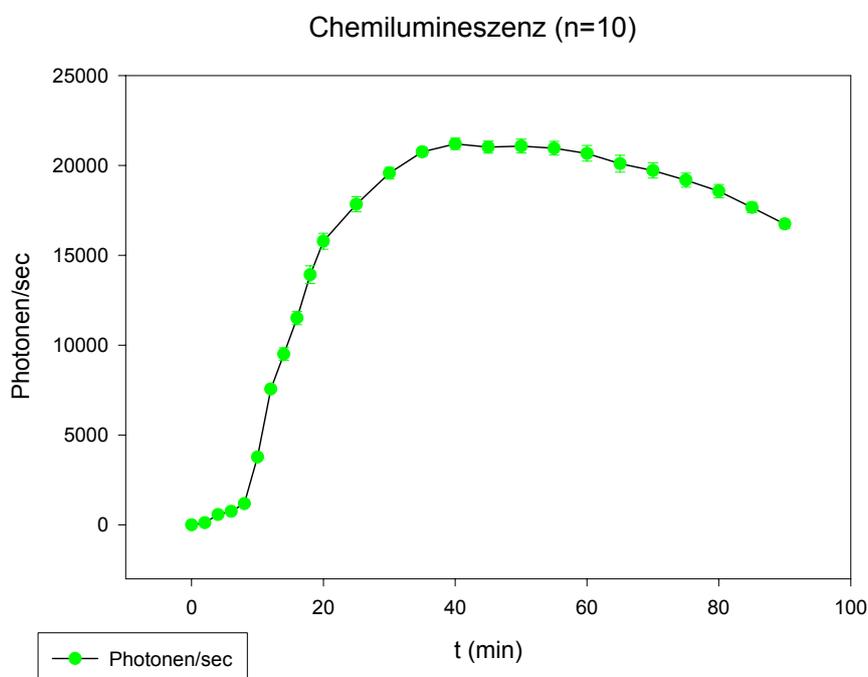
#### *3.3.2.1. Aktivierung mittels PMA*

Da neutrophile Granulozyten für eine optimale Aktivierung Kalzium und Magnesium benötigen (78) wurde der PMN-PBS-Suspension modifiziertes KH-Perfusat zugegeben, so daß die Suspension mit einer Zellkonzentration von  $5 \times 10^7$  / ml, 1,25 mM Kalzium und 0,8 mM Magnesium enthielt. Nach 5 min erfolgte die Aktivierung der PMN durch Zugabe von 10 µl einer 10 µM PMA-Lösung. Die Endkonzentration von PMA in der Suspension betrug 200 nM bzw. 123 ng / ml, basierend auf Untersuchungen von Newburger et. al., die zeigten, dass eine maximale PMN-Aktivierung ab einer PMA-Konzentration von über 100 ng / ml eintritt (79).

#### *3.3.2.2. Chemilumineszenz-Messung*

Die während des „respiratory burst“ von den Granulozyten erzeugten Sauerstoffradikale führen während der Phagozytose zur Lichtabstrahlung (80). Diese natürlich auftretende Lumineszenz kann durch den Lumineszenzverstärker Luminol, noch um den Faktor  $10^3$  verstärkt (80), und so in einen besser meßbaren Bereich gebracht werden, wobei eine strenge Korrelation zwischen der Höhe des beobachteten Chemilumineszenz-Signals und der Produktion freier Sauerstoffradikale besteht. Auf diesem Prinzip beruhte die Messung freier Radikale in dem von uns verwendeten

„Biolumat LB 9500“ der Firma Berthold. Es wurde eine Betriebsart gewählt, bei der ein Meßzyklus 2 Sekunden dauert und das Ergebnis, also die Lichtemission ausgedrückt in cps (= gezählte Photonen pro Sekunde), für jeden Meßzyklus angezeigt wird. Die Luminolkonzentration in dem zur Lumineszenzbestimmung verwendeten Meßröhrchen betrug 0,01 mM, gelöst in einer unter 3.3.2.1. beschriebenen analogen PBS-KH-Suspension mit einer PMN-Konzentration von  $5 \times 10^5$  / ml, wobei die Aktivierung fünf Minuten nach Beginn der Lumineszenz-Messung und zeitgleich mit der für den Versuch verwendeten PMN-Suspension erfolgte. Der Grad der Aktivierung der für den Versuch verwendeten PMN war so eindeutig zu beurteilen und hatte sein Maximum etwa 40 Minuten nach PMA-Zugabe mit einem Abfall nach ca. weiteren 25 Minuten (siehe Abbildung 2). Die PMN zeigten damit für die Dauer des Versuches eine optimale Aktivierung.



**Abbildung 2: Graphische Darstellung der Chemilumineszenzmessung.** Mittelwerte  $\pm$ SEM aus  $n = 10$  Messungen. Anstieg der Photonenemission nach ca. 5-10 min, mit einem Maximum nach ca. 40 min und Abfall nach weiteren 25 min.

### 3.4. Versuchsprotokoll

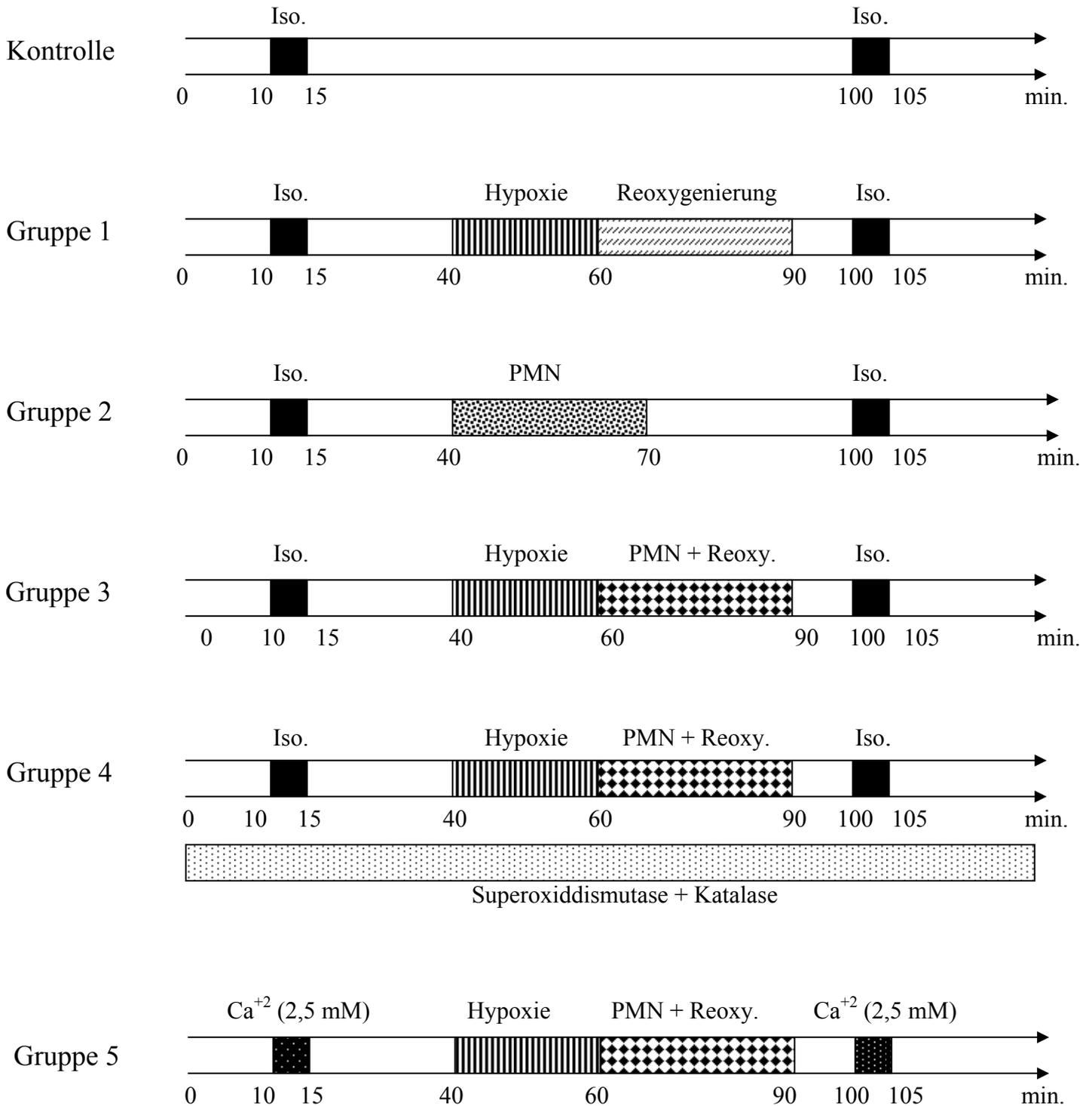
Zur Beurteilung der  $\beta$ -adrenergen Ansprechbarkeit wurde zu Beginn und am Ende jedes Versuches bei Gruppe 1-4, sowie in der Kontrollgruppe der  $\beta$ -Rezeptor Agonist Isoproterenol (Iso) bis zum Erreichen des maximalen Anstiegs von  $F_{\max}$  verabreicht. Gruppe 1 bis 3 diente

darüber hinaus zur Beurteilung des Einflusses einer Hypoxie bzw. aktivierter PMN bzw. einer Hypoxie mit anschließender Gabe aktivierter PMN auf die kontraktile Parameter und den Kalzium-Transienten. In der Kontrollgruppe erfolgte zwischen den beiden Isoproterenol-Gaben keine Intervention. Um zu prüfen, ob die beobachteten Effekte auf die Bildung freier Radikale während der Hypoxie mit anschließender Reoxygenierung und gleichzeitiger Gabe aktivierter PMN zurückzuführen sind, wurde eine weitere Versuchsreihe (Gruppe 4) analog zu Gruppe 3 durchgeführt, wobei der Muskel zusätzlich mit den Radikalfängern Superoxiddismutase (SOD) und Katalase 10 min vor erster Isoproterenol-Gabe kontinuierlich bis zum Versuchsende perfundiert wurde. Gruppe 5 diente zur Beurteilung der Ansprechbarkeit des kontraktile Apparates auf Kalzium nach Hypoxie mit anschließender Gabe aktivierter PMN, wobei hier die beiden Isoproterenol-Gaben durch zweimalige Erhöhung der extrazellulären Kalziumkonzentration ersetzt wurden. Alle Versuche wurden mit einem KH-Fluß über den Muskel von 1 ml / min, einer Temperatur des Perfusats von 30° C und einer Stimulationsfrequenz von 0.5 Hz (30 Schläge / min) durchgeführt. Die Gabe von Isoproterenol, die Erhöhung der extrazellulären Kalziumkonzentration sowie die Hypoxie des Muskels erfolgte durch Wechseln des von der Rollerpumpe angesaugten KH auf Perfusat mit einer Isoproterenolkonzentration von  $1 \times 10^{-8}$  bzw. einer Kalziumkonzentration von 2,5 mM bzw. mit einer KH-Begasung von 95% N<sub>2</sub> und 5% O<sub>2</sub>. Die Gabe der aktivierten PMN erfolgte mittels eines Perfusors in das Schlauchsystem, wobei sich  $5 \times 10^7$  Zellen / ml in der Perfusorspritze befanden, bei 1% Perfusor-Gabe des KH-Flusses mit einer Endkonzentration von  $5 \times 10^5$  Zellen/ml/min am Papillarmuskel. Die sechs verschiedenen Versuchsabläufe waren streng randomisiert und wurden wie folgt durchgeführt (siehe auch Abbildung 3):

- Gruppe 0 / Kontrollgruppe: Gabe von Isoproterenol für 5 min, nach 85 min erneute Gabe von Isoproterenol für 5 min.
- Gruppe 1 / Hypoxie-Gruppe: Gabe von Isoproterenol für 5 min, 25 min nach Abklingen der Reaktion Hypoxie des Papillarmuskels für 20 min, mit anschließender Reoxygenierungszeit von 30 min, nach weiteren 10 min Gabe von Isoproterenol für 5 min.
- Gruppe 2 / PMN-Gruppe: Gabe von Isoproterenol für 5 min, 25 min nach Abklingen der Reaktion Gabe von aktivierten PMN für 30 min, nach weiter 30 min Gabe von Isoproterenol für 5 min.
- Gruppe 3 / Hypoxie-PMN-Gruppe: Isoproterenol für 5 min, 25 min nach Abklingen der Reaktion Hypoxie des Muskels für 20 min, mit anschließender Reoxygenierungszeit und gleichzeitiger Gabe aktivierter PMN für 30 min, nach weiteren 10 min Gabe von Isoproterenol für 5 min.

- Gruppe 4 / SOD-Gruppe: Analog zu Gruppe 3, jedoch mit einer SOD- und Katalase-Konzentration von  $1 \times 10^5$  bzw.  $1 \times 10^6$  im Perfusat.
- Gruppe 5 / Kalziumgruppe: Analog zu Gruppe 3, jedoch zweimalige Erhöhung der extrazellulären Kalziumkonzentration für 5 min anstatt der beiden Isoproterenol-Gaben

**Abbildung 3: Schematische Darstellung des Versuchsprotokolls**



### 3.5. Statistische Auswertung

Alle Versuche wurden streng randomisiert durchgeführt. Unterschiede in Veränderungen der kontraktilen Parameter ( $F_{\max}$ ,  $+dF/dt$ ) und des Kalzium-Transienten ( $R_{\min}$ ) zwischen bzw. in den einzelnen Gruppen nach jeweiliger Intervention wurden mittels Student's t-Test auf ihre Signifikanz hin geprüft. Der statistische Vergleich zwischen bzw. in den einzelnen Gruppen auf Unterschiede in Veränderungen der Kontraktilität und des Kalzium-Transienten unter erster und zweiter Kalzium- bzw. Iso-Stimulation erfolgte mittels Mann-Whitney-Test.