

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Verwendete Chemikalien

Bovine Serum Albumine, Sigma, Deisenhofen

CGP 20712 A (1-[2-((3-Carbamoyl-4-hydroxy)phenoxy)ethylamino]-3-[4-(1-methyl-4-trifluoromethylimidazolyl)-phenoxy]-2-propanol), Ciba-Geigy, Basel; Schweiz

Collagenase, Biochrom KG, Berlin

Creatine, Sigma, Deisenhofen

Fetal Calf Serum, Boehringer, Mannheim

Heparin, Biochrom KG, Berlin

JOKLIK-MEM, Sigma, Deisenhofen

L-[2,3,4,5,6-³H] Phenylalanin, Amersham Buchler, Braunschweig, 110-140 Ci/ mmol

L-Carnitin, Sigma, Deisenhofen

LumasafeTM Plus, LUMA*LSC B.V., Groningen; Niederlande

Medium M199, Life Technologies, Eggenstein

Monocrotalin, Sigma, Deisenhofen

[³H]-Myoinositol, Amersham-Buchler, Braunschweig, 65 Ci/ mmol

Newborn Calf Serum, PAA Laboratories GmbH, Österreich

Noradrenalinhydrochlorid, Sigma, Deisenhofen

Penicillin, Streptomycin, Life Technologies, Eggenstein

Pentobarbital, United Pharmaceutical Works, Prag; Tschechien

Phentolaminhydrochlorid, Sigma, Deisenhofen

Phosphate Buffered Saline, Biochrom KG, Berlin

[³H]-Prazosin, New England Nuclear/DuPont, Brüssel; Belgien, 80 Ci/ mmol

Taurin, Sigma, Deisenhofen

Trichloressigsäure, Merck, Darmstadt

Trypsin, Sigma, Deisenhofen

2.1.2. Verwendete Lösungen

Lösung A [mM]: JOKLIK-MEM 440 ml, NaHCO₃ 24, MgSO₄ 0,6, L-Carnitin 1, Creatine 10, Taurin 20

Lösung B: 130 ml Lsg. A, CaCl₂ 0.1 mM, BSA 150 mg

Lösung C: (10 ml Lsg. A zum Spülen der Langendorff-Apparatur) in restliche 300 ml Zugabe von Trypsin 14.4 mg = 60-180 U/ ml

Lösung D: 150 ml Lsg. C, CaCl₂ 1 mM

Lösung E: 150 ml Lsg. C, BSA 150 mg

Lösung F: Medium M199, 10% fetal calf serum, 1% Penicillin Streptomycin (10000IE/ml, 10mg/ml)

Collagenase (28 mg = 90 U/ml): Lösen in 50 ml Lsg.C

Alle Lösungen wurden mit Carbogen (O₂ 95%, CO₂ 5%) begast. Der gemessene pH-Wert lag bei 37°C anfangs bei 7.2 , verschob sich während der Isolationsprozedur jedoch um durchschnittlich 0,4 Einheiten in den alkalischen Bereich, so dass eine fraktionierte Zugabe von 1N HCl für die pH-Konstanz nötig war.

2.1.3. Verwendete Geräte

Linearrecorder Graphtec WR 3310, Graphtec GmbH, Solingen

Potter S, B.Braun AG, Melsungen

Pressure Transducer P 75, Hugo Sachs, March-Hugstetten

Respirator, TSE GmbH, Kronberg

Spektrophotometer DU[®] 520, Beckman Instruments, Inc., Fullerton; USA

Tri-Carb[®] Liquid Szintillation Analyzer, Nr.2250CA, Packard Instrument Company

Meriden; USA

2.1.4. Einmalartikel

Counterröhrchen, Greiner Labortechnik, Frickenhausen
Glasfaserfilter Whatman GF/C, Whatman, Inc., Clifton, NJ; USA
Nylonmesh (250 x 250 µm), NeoLab, Heidelberg
Scintillatorgefäße, Greiner Labortechnik, Frickenhausen
Zellkulturplatten, Becton-Dickinson, Heidelberg

2.2. Methoden

2.2.1. Monocrotalin-Modell

Wir verwendeten männliche Wistar-Ratten, welche ursprünglich aus Schönwalde bezogen worden waren und im Zentralinstitut für Medizinische Grundlagenforschung der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg weitergezüchtet wurden. Die Tierhaltung und alle Untersuchungen an diesen Wistar-Ratten entsprachen den Richtlinien des Deutschen Tierschutzgesetzes.

Im Alter von 6 Wochen wurde dem einen Teil der Versuchstiere eine Einzeldosis von 60 mg/ kg KG MCT intraperitoneal appliziert. Dem anderen Teil, der als Kontrolltiere diente wurde eine äquivalente Menge von 0.9 %-iger Kochsalzlösung gespritzt.

Die Tiere wurden unter klimatisierten Bedingungen bei 22°C und 12 Stunden Hell-Dunkel Rhythmus in Dreiergruppen gehalten.

Nach Applikation von MCT starben 8% der Versuchstiere innerhalb der ersten drei Wochen an den Folgen der akuten Intoxikation.

Es wurden tägliche Gewichtskontrollen durchgeführt, wobei die MCT-Ratten deutlich weniger Futter zu sich nahmen und einen körperlichen Entwicklungsrückstand aufwiesen. Daher bekamen MCT-Ratten Futter nach Belieben, während die Futtermenge der Kontrolltiere der von MCT-Ratten am Vortag gefressenen Menge entsprach, um größere Gewichtsunterschiede zu vermeiden. Eine tägliche Mindestfuttermenge von 12,5 g wurde jedoch für die Kontrolltiere nicht unterschritten. Trinkwasser stand allen Tieren unbegrenzt zur Verfügung.

Die MCT-Ratten zeigten neben der fehlenden Zunahme an Körpergewicht eine Minderung der Mobilität und in den späteren Stadien eine zunehmende Tachypnoe. Nach 4-6 Wochen wurden die Tiere getötet. Zum Zeitpunkt der Tötung konnte man bei allen MCT-Ratten eine Rechtsherzhypertrophie finden. Bei einem Drittel der Tiere fand sich Aszites und Pleuraerguß als Ausdruck einer Rechtsherzinsuffizienz.

In dieser Arbeit wurden ausschließlich Tiere ohne Anzeichen der Rechtsherzinsuffizienz verwendet.

2.2.2. Entnahme und Präparation der Rattenherzen

Getötet wurden die Tiere unter Pentobarbitalnarkose (5mg/100g KG i.p.) und nach Heparinisierung mit 200 IE/100g KG i.p.. Nach Einbringen einer Trachealkanüle durch offene Tracheotomie und maschineller Beatmung (TSE GmbH, Kronberg) mit Raumluft wurden die Herzen rasch entnommen und in eisgekühlte, begaste Salinelösung gelegt.

Nach Einbinden eines Verbindungsstückes in die Aorta, wobei zu weit proximales Einbinden und damit Ligatur der Herzkranzgefäße unbedingt vermieden wurde, wurden die Herzen aus der gekühlten Salinelösung genommen und an einer separaten Perfusionsapparatur retrograd mit Lösung D perfundiert. Die Herzen begannen nach kurzer Latenzzeit zu schlagen. Hierdurch wurden verbliebene Blutreste aus den Herzen herausgepumpt bzw. -gespült.

2.2.3. Enzymatische Isolierung der Kardiomyozyten

Wir orientierten uns an der von Viko et al. (1995) beschriebenen Methode. Nach einer ca. 3-minütigen Stabilisierungsphase wurden die Herzen an die Langendorff-Apparatur angeschlossen und mit Lösung E perfundiert. Um eine möglichst Ca^{2+} -freie Reperfusionslösung zu erhalten, wurden die ersten 50 ml des Perfusates verworfen. Danach wurde die Collagenaselösung zugesetzt und unter konstanter Temperatur von 37°C und Begasung der Perfusionslösung mit Carbogen reperfundiert.

Um den pH-Wert konstant bei 7.2 zu halten wurden schrittweise einige Tropfen 1N HCl zugesetzt.

Nach 5 und 10 Minuten wurden je 25 μ l einer 100 mM CaCl_2 -Lsg. zugesetzt und nach 15 Minuten nochmals 50 μ l, um auf eine Ca^{2+} -Endkonzentration von 0.1 mM zu kommen. Dadurch wurde die Ca^{2+} -Toleranz der Zellen erhöht.

Durch lichtmikroskopische Kontrolle des Lysates auf stäbchenförmige Kardiomyozyten beurteilten wir den Grad der enzymatischen Lyse. Die bei dieser Versuchsreihe 10 bis 12 Wochen alten Rattenherzen wurden im Durchschnitt 20 Minuten perfundiert.

Die Herzen wurden nun von der Langendorff-Apparatur abgenommen, die Vorhöfe abgetrennt und verworfen. Danach erfolgte die Separierung des linken und rechten Ventrikels, wobei das Herzseptum dem linken Ventrikel zugerechnet wurde.

Mit zwei Skalpellern wurden die getrennten Herzkammern zerkleinert und mit je 20 ml der Collagenase-Perfusionslösung aus der Apparatur in zwei Teflongefäße gegeben. Dort wurde die Gewebesuspension für weitere 10 Minuten unter Carbogen-Begasung belassen und zur besseren Durchmischung alle 2 Minuten vorsichtig mit einer Pipette aufgenommen und langsam aus der Pipette auslaufen gelassen.

2.2.4. Aufbereitung der Kardiomyozyten

Nach 10 Minuten wurde das Lysat in 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und mit 400 U/min in der Tischzentrifuge bei Raumtemperatur (RT) für 3 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und das Pellet mit 10 ml Lösung B resuspendiert. Der Überstand wurde nochmals bei 500 U/min (RT) 3 Minuten zentrifugiert und das Pellet mikroskopisch auf den Anteil an intakten, stäbchenförmigen Kardiomyozyten kontrolliert. Bei Überwiegen der Stäbchen wurde die Suspension weiter verwendet und zusammen mit dem ersten Pellet nochmals bei 400 U/min (RT) für 3 Minuten zentrifugiert. Nach Abpipettieren des Überstandes und Resuspension in Lösung B wurde die Suspension über einen Büchnertrichter mit einem Nylonnetz (Porengröße 250 μ m) gegeben. Das Filtrat wurde in Reagenzröhrchen aufgefangen und sedimentierte für 10 Minuten in einem 37°C Wasserbad. Zeigte sich nach 10 Minuten noch kein deutliches Zellsediment, so wurde für

15 Sekunden bei 500 U/min (RT) zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und nach Resuspension in Lösung B schloss sich noch einmal eine 10 minütige Sedimentation an. Auch hier wurden die Überstände auf Stäbchen kontrolliert. Das letztlich so gewonnene Zellpellet wurde mit einer definierten Menge Lösung F aufgenommen, um auf eine Zahl von $17 \times 10^3 / 0.8$ ml an stäbchenförmigen Kardiomyozyten zu kommen. Für die Bestimmung der Zellzahl stellten wir eine Verdünnung 1:10 her und gaben 1 ml in eine Zählkammer, wo die Anzahl morphologisch intakter, stäbchenförmiger Kardiomyozyten bestimmt wurde. Der Anteil an abgerundeten, somit morphologisch nicht mehr intakter Kardiomyozyten war bei den mit Monocrotalin behandelten Tieren gegenüber den Kontrolltieren erhöht. Besonders ausgeprägt zeigte sich dies in den rechtsventrikulären Kardiomyozyten (s. Ergebnisse). Für die Verteilung war nur die Anzahl der intakten Kardiomyozyten bestimmend.

2.2.5. Zellkultur

Zur Zellkultivierung wurden sterile Becton-Dickinson 6-Loch Zellkulturplatten verwendet, welche für mind. 6 Stunden mit 0.4 ml einer Lösung aus M 199, 4% Fetal Calf Serum, 1% Penicillin/Streptomycin vorbeschichtet worden waren, um eine bessere Zellanhaftung zu erreichen. Diese Lösung wurde abgesaugt und jeweils 0.8 ml der Zellsuspension pro Loch unter sterilen Bedingungen verteilt.

Die Anzahl der stäbchenförmigen Kardiomyozyten lag bei $17 \times 10^3 / 0.8$ ml. Danach schloss sich eine ca. 18-stündige Inkubationsphase im Inkubator bei 37°C und 95% O₂ / 5% CO₂ an.

2.2.6. Stimulierung der Proteinsynthese mit Noradrenalin und Quantifizierung über Bestimmung der [³H]-Phenylalanin-Inkorporation

Nach dieser ersten Inkubationszeit wurde das Kulturmedium vorsichtig abgesaugt und durch 1 ml des serumfreien Mediums mit folgender Zusammensetzung ersetzt: Medium M199, 2 mM L-Carnitin, 2 mM Creatin, 5 mM Taurin, 100 µM L-Ascorbinsäure,

1% Penicillin/Streptomycin; 10 μM Cytosine- β -D-Arabinosid (Wachstumshemmung von Nicht-Kardiomyozyten) und 60 μM L-Phenylalanin, welches davor mit [^3H]-Phenylalanin (1 μCi) versetzt worden war.

Zur Stimulierung der Proteinsynthese wurde den Zellkulturen Noradrenalin in unterschiedlichen Endkonzentrationen (10^{-9} - 10^{-5}M) zugesetzt.

Zur Untersuchung der Wirkung des hochselektiven β -1-AR-Blockers CGP 20712 A auf die Proteinsynthese wurde dieser vor der Zugabe von Noradrenalin in einer Endkonzentration von 300 nM den Zellkulturen zugesetzt.

Als Kontrolle diente je eine Zellkultur, welche nicht mit Noradrenalin und CGP 20712 A versetzt wurde.

Nach einer weiteren Inkubationszeit von 24 Stunden wurde das radioaktive Nährmedium abgesaugt und zum Stoppen der Proteinsynthese 1 ml einer 10%igen Trichloressigsäure-Lösung zugesetzt. Die Proben wurden bis zur weiteren Aufarbeitung 24 Stunden bei 5°C gelagert, um sie dann mit 1 ml Phosphat-gepufferter Saline-Lösung (PBS) zu waschen und zum Lösen der Zellstrukturen mit 0.5 N Natronlauge zu versetzen.

Die Zellplatten wurden für 4 Stunden bei Raumtemperatur auf einen Schwenker gestellt und mikroskopisch die vollständige Lösung der Zellbestandteile kontrolliert.

Zur Messung der Radioaktivität nach dem Flüssigkeitsszintillationsprinzip wurde ein Volumen von 450 μl entnommen und zusammen mit 4 ml der Szintillationsflüssigkeit in ein Probenröhrchen gegeben, welches nach guter Durchmischung im Szintillationszähler gemessen wurde. Als Referenzwert wurde 450 μl der Kontrollzellkultur verwendet. Die Differenz der gemessenen Counts pro Minute zum Referenzwert dienten als Maß für den erfolgten Einbau von [^3H]-Phenylalanin und somit als Maß für die Proteinsynthese.

2.2.7. Invasive Messung des rechtsventrikulären Druckes

Die Ratten wurden mit Pentobarbital 5 mg/100g KG i.p. narkotisiert und mit 200 IE/100g KG i.p. heparinisiert. Danach wurde die rechte Vena jugularis operativ freigelegt und über diese ein flüssigkeitsgefüllter Silikonkatheter mit einem Außendurchmesser von 0.8 mm unter Kontrolle der Pulskurve bis in den rechten Ventrikel eingeführt.

Als Druckwandler wurde der Pressure Transducer P 75 genutzt. Zum Aufzeichnen der Druckkurven diente der Linearrecorder Graphtec WR 3310.

2.2.8. Noradrenalinbestimmung

Die Noradrenalinbestimmung erfolgte mittels high performance liquid chromatography (HPLC) nach Schäfers et al. (1997).

Die Ratten wurden unter wiederholter Kontrolle der Schmerzantwort durch Kneifen der Pfote mit einer Pinzette für mindestens 15 Minuten nach Ausbleiben der letzten Schmerzantwort ohne Manipulation in Pentobarbitalnarkose belassen. Zur Blutentnahme wurde der Plexus ophthalmicus punktiert und ca. 2 ml Blut in eisgekühlten EDTA-Monovetten entnommen. Die Proben wurden sofort bei 4°C mit 1700 g für 10 Minuten zentrifugiert und 1 ml Plasma abpipettiert. Zur Stabilisierung wurde 10 µl einer 10 mM Gluthation-Lösung zugesetzt und die Proben bis zur Bestimmung des Noradrenalins bei -80°C gelagert.

Das Plasma wurde auf ein Vorsäulensystem aus Vinyl-Copolymer mit Phenylboronsäure und Phosphatpuffer (200 mM $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 10 mM EDTA, 1,71 mM NaN_3 , pH 8,7) als mobile Phase aufgetragen. Die retinierten Phenylboronsäureester des Noradrenalins wurden mittels Elutionsmittel (89 Teile Phosphatpuffer [1000 mM NaH_2PO_4 , 5 mM Oktansulfonsäure, 1,71 mM NaN_3 , pH 3,0], 11 Teile Methanol) von der Vorsäule eluiert. Danach folgte die Auftrennung des Noradrenalins über eine LiChrospher 100 RP-18e – Säule. Durch Nachsäulenderivatisierung erfolgte über die Oxidation mit $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ zu Noradrenochinon sowie die oxidative Zyklisierung zu Noradrenochrom und intramolekulare Umlagerung die Bildung von fluoreszierendem 3, 5, 6-Trihydroxy-1-methylindol/ 3, 5, 6-Trihydroxyindol. Mittels Fluoreszenzdetektion bei einer Anregungswellenlänge von 405 nm und einer Emissionswellenlänge von 520 nm erfolgte die quantitative Bestimmung der Trihydroxyindol-Derivate.

2.2.9. Membran-Präparation aus Kardiomyozyten des rechten und linken Ventrikels

Die Kardiomyozyten-Suspension wurde mit 80 g für 10 Minuten bei 25 °C zentrifugiert, der Niederschlag in 10 ml PBS resuspendiert und rezentrifugiert (80 g für 10 Minuten). Danach wurden die Kardiomyozyten aus rechtem bzw. linkem Ventrikel in 5 ml eiskaltem Präparations-Puffer (10 mM Tris, 5 mM EDTA-Puffer, pH 7,4) resuspendiert und anschließend in einem Glashomogenisator Potter S mit Teflon-Pistill homogenisiert, 3 mal mit 10 Hüben bei 1500 U/Min mit 1 Minute Intervall. Das Homogenat wurde mit 10 ml Präparationspuffer verdünnt, mit 50000 g für 20 Minute bei 4°C zentrifugiert, der Niederschlag in Präparationspuffer resuspendiert und erneut mit 50000 g für 20 Minuten bei 4°C rezentrifugiert. Danach wurde der Niederschlag im Inkubationspuffer (50 mM Tris, 0,5 mM EDTA, pH 7,4) suspendiert, so dass eine Proteinkonzentration von 0.5 mg Protein/ml erhalten wurde. Der Protein-Gehalt wurde nach der Methode von Bradford (1976) mit Rinder-Immunglobulin G als Standard bestimmt.

2.2.10. Bestimmung der α -1-AR-Dichte

Zur Bestimmung der α -1-AR-Dichte wurden die Kardiomyozyten-Membranen (300 μ g Protein/Ansatz) mit sechs Konzentrationen von [³H]-Prazosin (0.03-1 nM) für 60 Minuten bei 25°C in Gegenwart oder Abwesenheit von 10 μ M Phentolamin (zur Definition der unspezifischen Bindung) in einem Gesamtvolumen von 1 ml inkubiert. Die Inkubation wurde durch Zugabe von 10 ml Wasch-Puffer (50 mM Tris, 0.5 mM EDTA, pH 7,4) beendet und das Reaktionsgemisch rasch über Whatman GF/C Glasfaserfilter filtriert. Die Filter wurden mit weiteren 10 ml Wasch-Puffer gewaschen, anschließend für eine Stunde bei 65°C getrocknet, in Zählfläschchen überführt, mit 4 ml Szintillationsflüssigkeit versetzt und die Radioaktivität im Szintillationszähler bestimmt.

Die unspezifische Bindung von [³H]-Prazosin wurde definiert als Radioaktivität gebunden in Gegenwart von 10 μ M Phentolaminhydrochlorid. Die spezifische Bindung von [³H]-Prazosin wurde definiert als Differenz zwischen Gesamtbindung und unspezifischer Bindung und betrug üblicherweise bei 0.1 nM [³H]-Prazosin ca. 70%. Die α -1-AR-Dichte wurde in fmol spezifisch gebundenes [³H]-Prazosin/mg Protein angegeben.

2.2.11. Inositol-Phosphat-Bildung

Die Suspension von Kardiomyozyten aus rechtem bzw. linkem Ventrikel wurde für 24 Stunden mit 2.9 $\mu\text{Ci/ml}$ [^3H]-Myo-Inositol bei 37°C inkubiert. Daran anschließend wurde das nicht inkorporierte [^3H]-Myo-Inositol durch Zentrifugation ausgewaschen. Die Kardiomyozyten wurden in Hank's gepufferter Saline-Lösung, die 10 mM LiCl und 1% Rinderserum Albumin enthielt, resuspendiert. Aliquots dieser Kardiomyozyten-Suspension (5×10^4 Zellen/ml) wurden mit Noradrenalin (10^{-9} - 10^{-5} M) in einem Gesamtvolumen von 1 ml für 45 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Inkubation wurde durch Zugabe von 1 ml eiskaltem Methanol und 2 ml Chloroform gestoppt. Anschließend wurden die Testansätze intensiv geschüttelt und danach mit 820 g für 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert, so dass eine obere Methanol/Wasser-Phase und eine untere Chloroform-Phase entstand. Von der Methanol/Wasser-Phase wurden jeweils 1.6 ml auf Dowex AG 1-X8 Chromatografie-Säulen (200 mg/Säule) gegeben. Das freie Inositol wurde mit zweimal 5 ml H₂O und 5 ml 60 mM Ammoniumformiat-Lösung eluiert; daran anschließend wurden die Gesamt-Inositol-Phosphate durch Zugabe von 2 x 1ml 1 M Ammoniumformiat-Lösung verdünnt in 100 ml 0.1 M Ameisensäure eluiert. Zu jedem Testansatz wurden 8 ml Szintillationsflüssigkeit gegeben. Nach kräftigem Schütteln wurde die Radioaktivität der Proben dann im Szintillationszähler bestimmt.

2.2.12. Statistische Auswertung

Alle Daten werden als Mittelwerte \pm mittlerer Fehler des Mittelwertes (S.E.M.) von n Experimenten angegeben.

Alle statistischen Berechnungen und nichtlineare Regressionsanalysen wurden mit dem Softwareprogramm GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, Kalifornien; USA) durchgeführt.

Aus den Daten der Noradrenalin-induzierten IP-Bildung und Steigerung der Proteinsyntheserate wurden mit Hilfe des Softwareprogramms GraphPad Prism die passenden sigmoidalen Kurven errechnet. Bei diesen Berechnungen wurde der basale [^3H]-Phenylalanin-Einbau gleich 100% gesetzt. Der „Hill-slope“ wurde auf eins festgesetzt.

2. Material und Methoden

Mit Hilfe des Student's t-Tests für ungepaarte Proben (Vergleich Kontrolltiere gegen MCT-Ratten) und gepaarte Proben (Vergleich mit und ohne Zugabe von CGP 20712 A) wurde die Signifikanz von Unterschieden zwischen Mittelwerten ermittelt. Ein p-Wert < 0.05 wurde als signifikant angesehen.