

Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Innere Medizin III  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
(Komm. Direktor: PD Dr. Michel Noutsias)

## **Die Interleukin-6 Produktion neonataler Rattenkardiomyozyten wird durch die Schlagrate beeinflusst**

### **Dissertation**

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

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

von Heinrich Korth  
geboren am 16.11.1988 in Leipzig

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

Gutachter: Prof. Dr. Harald Loppnow  
Prof. Dr. Andreas Simm (Halle)  
Prof. Dr. Joerg Heineke (Hannover)

04.07.2017

16.04.2018

*Gewidmet den Menschen, die ich liebe: meiner Tochter Lilith, meiner Frau Saphira und  
meinen Eltern Dörte und Ralf-Uwe*

## Referat

Eine erhöhte kardiale Schlagrate und ein Anstieg des proinflammatorischen Zytokins Interleukin-6 sind unabhängige Risikofaktoren eines SIRS (*systemic inflammatory response syndrome*) und nehmen einen entscheidenden Einfluss auf die Mortalität kritisch kranker Patienten.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die experimentelle Untersuchung eines möglichen Einflusses der kardialen Schlagrate auf die Interleukin-6 Produktion neonataler Rattenkardiomyozyten.

Zur Etablierung eines kardialen Kontraktionssystems dienten kultivierte, neonatale Rattenkardiomyozyten. Bei den *in vitro* Experimenten wurde die Schlagrate pharmakologisch mittels Isoprenalin und Blebbistatin, sowie durch elektrische Pulsation gezielt verändert und eine Bestimmung der Interleukin-6 Produktion aus den Zellüberständen durchgeführt. Zur Bestimmung der Schlagrate wurde ein photoelektrisches Messsystem verwendet. Die Quantifizierung der Interleukin-6 Produktion erfolgte durch ein biologisches Messverfahren.

Das positiv chronotrope  $\beta$ -Sympathomimetikum Isoprenalin erhöhte die Schlagrate der kultivierten Rattenkardiomyozyten, während ein Anstieg der Interleukin-6 Produktion nicht beobachtet wurde. Der Myosin-II Inhibitor Blebbistatin senkte mit steigender Konzentration die Schlagrate bis zur vollständigen Blockade. Der Inflammationsmarker Interleukin-6 wurde in diesen Experimenten ebenfalls gesenkt. Die durch elektrische Pulsation stimulierten Kardiomyozyten zeigten mit zunehmender Schlagrate einen Anstieg der Interleukin-6 Produktion. Sowohl bei den Untersuchungen mit Blebbistatin als auch unter elektrischer Pulsation war der Einfluss der Schlagrate auf die IL-6 Produktion gering ausgeprägt.

Die Ergebnisse dieser Experimente zeigen, dass die Interleukin-6 Produktion neonataler Rattenkardiomyozyten durch deren Schlagrate beeinflusst wird. Allerdings scheint der Einfluss nur gering ausgeprägt zu sein.

Korth, Heinrich: Die Interleukin-6 Produktion neonataler Rattenkardiomyozyten wird durch die Schlagrate beeinflusst. Halle (Saale), Univ., Med. Fak., Diss., 47 Seiten, 2017.

---

## Inhaltsverzeichnis

Referat	
Inhaltsverzeichnis	I
Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole	III
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Definition und Pathogenese von SIRS bzw. Sepsis.....	1
1.2 Interleukin-6 und dessen Rolle als Prognosefaktor beim SIRS.....	2
1.3 Die erhöhte kardiale Schlagrate ist ein unabhängiger Risikofaktor beim SIRS.....	3
1.4 Die Absenkung der Schlagrate durch $\beta$ -Blocker und Ivabradin beim SIRS.....	3
1.5 Die Absenkung der Inflammation durch $\beta$ -Blocker und Ivabradin.....	4
<b>2 Zielstellung</b>	<b>6</b>
<b>3 Material und Methodik</b>	<b>7</b>
3.1 Zellkulturmaterialien und -zusätze.....	7
3.2 Zellkulturmedien.....	8
3.3 Präparation und Kultivierung neonataler Rattenkardiomyozyten.....	10
3.4 Messung der Schlagrate.....	11
3.5 Isoprenalin-Experimente .....	12
3.6 Blebbistatin-Experimente .....	12
3.7 Elektrische Pulsation der neonatalen Rattenkardiomyozyten.....	12
3.8 Bestimmung der Interleukin-6 Konzentration .....	13
3.9 Statistische Auswertung.....	14
<b>4 Ergebnisse</b>	<b>15</b>
4.1 Das verwendete Testsystem eignet sich zur Analyse der durch Isoprenalin und Endotoxin veränderten Schlagrate.....	15
4.2 Das Sympathomimetikum Isoprenalin steigert die Schlagrate, aber nicht die Interleukin-6 Produktion von neonatalen Rattenkardiomyozyten.....	18
4.3 Durch Blebbistatin wird die Schlagrate und die Interleukin-6 Produktion neonataler Rattenkardiomyozyten verringert.....	20
4.3.1 Die Inkubation mit Blebbistatin über 24 Stunden senkt die Schlagrate und die Interleukin-6 Produktion.....	20

4.3.2	Eine 5-stündige Inkubation mit Blebbistatin senkt die Schlagrate und die Interleukin-6 Produktion.....	23
4.4	Die elektrische Pulsation steigert die Schlagrate und die Interleukin-6 Produktion.....	25
4.4.1	Die 24-stündige elektrische Pulsation steigert die Schlagrate und die Interleukin-6 Produktion.....	25
4.4.2	Eine 2-stündige elektrische Pulsation steigert die Schlagrate und die Interleukin-6 Produktion.....	27
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>29</b>
5.1	Isoprenalin und LPS wirken chronotrop auf neonatale Rattenkardiomyozyten.....	29
5.2	Die durch Isoprenalin gesteigerte Schlagrate besitzt keinen Einfluss auf die Interleukin-6 Produktion.....	30
5.3	Die Absenkung der Interleukin-6 Produktion durch Blebbistatin ist geringer als die der Schlagrate.....	30
5.4	Der unter elektrischer Pulsation beobachtete Anstieg von Interleukin-6 wird durch die gesteigerte Schlagrate hervorgerufen.....	32
5.5	Die Schlagrate beeinflusst die Interleukin-6 Produktion in Skelettmuskelzellen.....	33
5.6	Die gezielte Veränderung der Schlagrate von neonatalen Rattenkardiomyozyten beeinflusst deren Interleukin-6 Produktion.....	34
5.7	Eine Vor-Inkubation mit LPS führt zu einer stärkeren Steigerung der Schlagrate durch Isoprenalin.....	34
5.8	Limitationen und Ausblick.....	35
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>36</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>37</b>
<b>8</b>	<b>Thesen</b>	<b>46</b>

Tabellarischer Lebenslauf

Selbstständigkeitserklärung

Erklärung über frühere Promotionsversuche

Danksagung

## Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole

7TD1-Zellen	B-Lymphozyten einer Interleukin-6 abhängigen murinen Zelllinie
BSA	Bovines Serumalbumin
CMRL	<i>Connaught Medical Research Laboratories</i>
FKS	Fetales Kälberserum
HCN-Kanal	<i>Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated cation channel</i>
HEPES	Hydroxyethylpiperazin-Ethansulfonsäure
IL-6	Interleukin-6
LPS	Lipopolysaccharid, Endotoxin
MODS	<i>Multi organ dysfunction syndrome</i>
MTT	<i>3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide</i>
n.s.	nicht signifikant
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SD	<i>Standard deviation</i>
SIRS	<i>Systemic inflammatory response syndrome</i>
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$

# 1 Einleitung

Sepsis und die damit verbundenen Komplikationen gehören zu den häufigsten Todesursachen in den Industrienationen (Brunkhorst, 2006).

„Sepsis ist die Gesamtheit der lebensbedrohlichen klinischen Krankheitserscheinungen und pathophysiologischen Veränderungen als Reaktion auf die Aktion pathogener Keime und ihrer Produkte, die aus einem Infektionsherd in den Blutstrom eindringen, die großen biologischen Kaskadensysteme und spezielle Zellsysteme aktivieren und die Bildung und Freisetzung humoraler und zellulärer Mediatoren auslösen.“  
(Müller-Werdan, 2003)

Die ACCP / SCCM (*American College of Chest Physicians / Society of Critical Care Medicine*) Konsensus Konferenz definierte standardisierte diagnostische Kriterien, zusammengesetzt aus einer Gruppe physiologischer Reaktionen auf die systemische Entzündungsreaktion (Bone et al., 1992). Dazu zählt auch das kardiovaskuläre Risikoprofil der Betroffenen, insbesondere die Tachykardie (Bone et al., 1992). Aktuell war auch der Anstieg von Entzündungsmediatoren wie Interleukin-6 (IL-6) in das Zentrum aktueller Forschungen gerückt (Schulte et al., 2013). Ob ein unmittelbarer Zusammenhang zwischen der erhöhten Schlagrate und dem akute Phase-Protein IL-6 existiert, blieb bisher unklar, jedoch schienen beide Parameter mit der Mortalität kritisch kranker Patienten zu korrelieren (Casey et al., 1993; Leibovici et al., 2007). Die Überprüfung einer möglichen elektromechanischen Kopplung von Schlagrate und dem Inflammationsparameter IL-6 ist Thema dieser Arbeit und könnte zum besseren Verständnis der Pathophysiologie der Sepsis beitragen.

## 1.1 Definition und Pathogenese von SIRS bzw. Sepsis

Das septische Krankheitskontinuum ist ein sehr häufiges und lebensbedrohliches Krankheitsbild. Allein auf deutschen Intensivstationen liegt die Prävalenz bei 12 %. Mit einer 90-Tage Sterblichkeit von 54 % ist die schwere Sepsis und der septische Schock die dritthäufigste Todesursache in Deutschland, noch vor dem Tod durch Herzinsuffizienz (Brunkhorst, 2006). Gemäß der klinischen Definition bezeichnet man das Krankheitsbild als Sepsis bzw. SIRS (*systemic inflammatory response syndrome*), wenn mindestens zwei der folgenden Kriterien erfüllt sind (Bone et al., 1992):

1. Fieber ( $\geq 38\text{ °C}$ ) oder Hypothermie ( $\leq 36\text{ °C}$ )
2. Tachykardie (Schlagrate  $\geq 90$  Schläge / Min)
3. Tachypnoe (Atemfrequenz  $\geq 20$  Atemzüge / Min) oder Hyperventilation ( $\text{paCO}_2 \leq 4,3\text{ kPa}$  /  $\leq 33\text{ mmHg}$ )
4. Leukozytose ( $\geq 12000 / \text{mm}^3$ ) oder Leukopenie ( $\leq 4000 / \text{mm}^3$ ) oder  $\geq 10\%$  unreife neutrophile Granulozyten im Differentialblutbild

Die Ursache einer Sepsis liegt zumeist in einer Infektion mit Bakterien, seltener mit Viren, Pilzen oder Parasiten. Hiervon abzugrenzen ist das SIRS, welches auch durch andere Ursachen, beispielsweise multiple Traumen (Seibel et al., 1985) oder eine akute Pankreatitis (Heath et al., 1993), hervorgerufen werden kann. Aus Gründen der Vereinfachung wird in der vorliegenden Arbeit für das Krankheitskontinuum der übergeordnete Begriff SIRS verwendet.

Im Laufe der Pathogenese eines SIRS geben die Körperzellen eine Vielzahl pro- und antiinflammatorischer Zytokine ab (Bone, 1996; Cohen, 2002). Dieser „Zytokin-Sturm“ im Blut führt zu einem Funktionsverlust von Endothelzellen und hat eine starke Vasodilatation zur Folge (Matsuda und Hattori, 2006). Daraus kann eine schwere Funktionseinschränkung oder ein Funktionsverlust lebenswichtiger Organe und Organsysteme resultieren (Goris et al., 1985; Anderson und Harken, 1990). Das lebensbedrohliche Krankheitsbild wird dann als MODS (*multi organ dysfunction syndrome*) bezeichnet (Bone et al., 1992).

## **1.2 Interleukin-6 und dessen Rolle als Prognosefaktor beim SIRS**

Mehrere klinische Studien haben gezeigt, dass sich das Outcome der Patienten mit SIRS und vermehrter Zytokin-Ausschüttung verschlechterte (Casey et al., 1993; Meduri et al., 1995; Gogos et al., 2000). Insbesondere der Anstieg des Zytokins IL-6 schien mit der Mortalität der Patienten zu korrelieren (Casey et al., 1993) und war als Prognosefaktor für das Überleben geeignet (Meduri et al., 1995). Dies spiegelt sich im klinischen Alltag wieder, in dem IL-6 neben dem Procalcitonin als empfindliche Marker für ein SIRS eingesetzt werden (Fraunberger et al., 2006; Anderson und Schmidt, 2010). IL-6 ist ein Interleukin der akuten Phase und wirkt synergistisch mit TNF- $\alpha$  und IL-1 (Interleukin-1) auf die peripheren Zielzellen (Andus et al., 1989). Das Protein wird von Zellen der Immunabwehr (Makrophagen, T- und B-Lymphozyten), aber auch von Endothelzellen und glatten Muskelzellen produziert (Loppnow und Libby, 1990). In geringeren Mengen können auch Kardiomyozyten IL-6 produzieren und sezernieren. Dies konnte an kultivierten Kardiomyozyten von Hunden (Gwechenberger et al., 1999),



Kaninchen (Dreyer et al., 2000) und humanen Kardiomyozyten *in vitro* gezeigt werden (Ancey et al., 2002). Die pathophysiologischen Mechanismen der IL-6 Produktion in Kardiomyozyten sind noch weitgehend unbekannt. Funktionell wird vermutet, dass die IL-6 Produktion zur Hypertrophie der Kardiomyozyten im Rahmen einer Herzinsuffizienz beiträgt (Ancey et al., 2002).

### **1.3 Die erhöhte kardiale Schlagrate ist ein unabhängiger Risikofaktor beim SIRS**

Bei einem SIRS können alle Organe und Organsysteme des Körpers beeinträchtigt sein. Der Organismus reagiert auf diese lebensbedrohliche Situation mit einer Aktivierung des Sympathikus, um die Oxygenierung der Organe aufrecht zu erhalten. Aus dieser Aktivierung resultiert ein erhöhtes Herzzeitvolumen, hervorgerufen durch einen Anstieg der Schlagrate des Herzens. Insbesondere bei einem schweren Verlauf der Erkrankung war der kardiovaskuläre Status der Patienten einer der wichtigsten Überlebensindikatoren (Parrillo, 1989) und die Herzfrequenz Prädiktor für das Outcome der Betroffenen mit SIRS (Parker et al., 1987). Gemäß der klinischen Definition gehört die Tachykardie mit einer Schlagrate von  $\geq 90$  Schlägen / Minute zu den diagnostischen Kriterien der Sepsis (Bone et al., 1992). Diese wurde infolge einer prospektiven Studie mit über 3800 Patienten als unabhängiger Risikofaktor für die Mortalität bei Patienten mit SIRS bewertet (Leibovici et al., 2007). In einer weiteren Untersuchung wurde die Schlagrate von Patienten mit MODS zum Diagnosezeitpunkt und die 28-Tage Mortalität ermittelt. Patienten mit einer Herzfrequenz von  $\geq 90$  Schläge / Minute wiesen eine Mortalität von 61 % auf, wohingegen nur 31 % der Patienten mit einer Schlagrate von  $< 90$  Schläge / Minute verstarben (Hoke et al., 2012). Schlussfolgernd ergaben sich aus dem Risikoprofil der Patienten mit erhöhter Herzfrequenz neue Therapieoptionen. Die medikamentöse Schlagratensenkung rückte in den Mittelpunkt klinischer und experimenteller Studien, sodass inzwischen negativ chronotrop wirkende Substanzen bei Patienten mit SIRS eingesetzt werden.

### **1.4 Die Absenkung der Schlagrate durch $\beta$ -Blocker und Ivabradin beim SIRS**

Als therapeutische Konsequenz aus dem beobachteten Zusammenhang zwischen erhöhter Schlagrate und verringertem Outcome bei Patienten mit SIRS, ergaben sich Untersuchungen zur medikamentösen Beeinflussung der Schlagrate mit  $\beta$ -Blockern und in aktuellen Studien mit Ivabradin.  $\beta$ -Blocker gehören zu den am häufigsten verordneten Medikamenten und bewirken eine Blockade der  $\beta$ -Adrenorezeptoren, welche am Herzen, in der Gefäß- und in der Bronchialmuskulatur zu finden sind. Im

Rahmen des Einsatzes von  $\beta$ -Blockern bei Patienten mit MODS und septischem Schock, wurde eine Absenkung der Herzfrequenz und Mortalität festgestellt (Hennen et al., 2008). Insbesondere der Einsatz des  $\beta$ -Blockers Esmolol senkte in rezenten Studien die Sterblichkeit um 31 % und verkürzte den Aufenthalt unter intensivmedizinischer Überwachung um 5 Tage (Morelli et al., 2013). Eine weitere Untersuchung konnte zeigen, dass Patienten mit SIRS, die schon vor dem Krankenhausaufenthalt mit einem  $\beta$ -Blocker behandelt wurden, ein besseres Outcome haben als Patienten ohne eine solche Dauermedikation (Macchia et al., 2012).  $\beta$ -Blocker senken neben der Schlagrate auch die Kontraktilität des Herzens und bewirken eine Vasodilatation durch eine Verringerung des Gefäßtonus (Gorre und Vandekerckhove, 2010). Die Auswurfleistung des Herzens sinkt und die Oxygenierung lebenswichtiger Organe nimmt ab. Der Einsatz ist demzufolge bei hämodynamisch instabilen Patienten, wie es häufig bei Patienten mit SIRS der Fall ist, kontraindiziert (Nair und Gopal, 2013). Darüber hinaus existieren für  $\beta$ -Blocker weitere Kontraindikation, wie beispielsweise Asthma bronchiale.

Aufgrund der Vielzahl unerwünschter Wirkungen und Kontraindikationen von  $\beta$ -Blockern, wurden Pharmaka entwickelt, die spezifischer auf die Schlagrate wirken. Ein neuer Ansatz in der Therapie des SIRS ist Ivabradin (Bonadei et al., 2014). Ivabradin ist ein spezifischer Blocker des HCN-Kanals (*hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated cation channel*). Dieser befindet sich in den Schrittmacherzellen des Herzens und ist für die Entstehung der elektrophysiologischen Erregung und damit der Herzfrequenz im Sinusknoten verantwortlich. Durch die Blockade des Kanals mit Ivabradin werden somit keine Wirkungen auf die Kontraktilität oder andere Ionenkanäle beobachtet (Vilaine, 2006). In einer ersten Fallstudie konnte an drei Patienten mit MODS nachgewiesen werden, dass sich unter dem Einsatz von Ivabradin die Schlagrate verringerte und die hämodynamischen Parameter verbesserten (De Santis et al., 2014). Ergebnisse der aktuell durchgeführten prospektiven MODI<sub>Y</sub>-Studie zum Einfluss von Ivabradin auf das Outcome von Patienten mit MODS stehen noch aus (Nuding et al., 2011).

### **1.5 Die Absenkung der Inflammation durch $\beta$ -Blocker und Ivabradin**

Bei Untersuchungen mit  $\beta$ -Blockern zur Absenkung der Schlagrate wurde überraschenderweise ein Absinken von inflammatorischen Zytokinen im Blut beobachtet. So wurde bei Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie unter der Therapie mit  $\beta$ -Blockern eine Senkung zirkulierender Entzündungsmediatoren erfasst (Ohtsuka et al., 2001; Loppnow et al., 2002). Des Weiteren wurde bei Ratten mit induzierter

Sepsis, durch den Einsatz eines  $\beta$ -Blockers insbesondere die IL-6 Produktion verringert (Ackland et al., 2010). Auch bei einer Untersuchung mit Ivabradin zeigte sich eine erniedrigte Schlagrate des Herzens und eine Absenkung von Inflammationsmediatoren. Bei diesen Patienten mit akutem Koronarsyndrom wurde nach der Einnahme von Ivabradin eine Reduktion der IL-6 Produktion beobachtet (Dominguez-Rodriguez et al., 2012). Der zugrundeliegende Wirkmechanismus, mit dem  $\beta$ -Blocker bzw. Ivabradin eine Absenkung der Inflammationsmoleküle hervorrufen, bleibt Gegenstand aktueller Forschungen. Es gibt Vermutungen, dass das systemisch wirkende autonome Nervensystem direkten Einfluss auf die Inflammationsreaktion besitzt (Piccirillo et al., 2000). So steigert die Aktivierung des Sympathikus im Rahmen einer schweren Erkrankung die Sekretion proinflammatorischer Zytokine (Tracey, 2007). Durch  $\beta$ -Blocker bzw. Ivabradin kann die sympathische Aktivität verringert werden, sodass dies die Inflammationsreaktion begrenzen könnte (Pavlov et al., 2003). Außerdem wird angenommen, dass durch eine geringere Volumenbelastung des Blutkreislaufs die Dehnung von Endothelzellen verringert wird, sodass diese weniger IL-6 ausschütten (Cheng et al., 1996). Bisher gab es keine Hinweise darauf, dass neben der systemischen Kopplung von Schlagrate und IL-6 Produktion durch das autonome Nervensystem, auch Mechanismen in den Herzmuskelzellen selbst existieren könnten, die zu einer Absenkung der IL-6 Produktion beitragen.

Bei *in vitro* Experimenten in unserem Labor wurde an Ivabradin-behandelten neonatalen Rattenkardiomyozyten eine Senkung der Schlagrate bei paralleler Verringerung der IL-6 Produktion beobachtet. Hieraus wurde die Hypothese abgeleitet, dass ein direkter Wirkmechanismus zwischen der Kontraktion der Herzmuskelzellen und der IL-6 Produktion bestehen könnte. Dieser mögliche Zusammenhang wurde bisher in der Literatur weder untersucht noch beschrieben und ist Thema der vorliegenden Arbeit.

## 2 Zielstellung

Septische Patienten mit tachykarder Herzfrequenz und einem starkem Anstieg proinflammatorischer Mediatoren (insbesondere IL-6) haben eine schlechte Prognose. *In vitro* Experimente unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass die Blockade des Schrittmacherkanals im Herzen (HCN-Kanal) durch den selektiven HCN-Kanal-Inhibitor Ivabradin eine Senkung der Schlagrate und parallel hierzu eine Reduktion der IL-6 Produktion hervorrief. Es war unklar, ob Ivabradin die IL-6 Produktion direkt senkte oder durch elektromechanische Kopplung die IL-6 Produktion von der Schlagrate beeinflusst wurde. Bisher sind in der Literatur keine experimentellen Untersuchungen zum Einfluss des kardialen Kontraktionsmechanismus auf die Interleukin-6 Produktion beschrieben und es fehlte eine etablierte Methodik zur Analyse dieser Fragestellung. Um den genannten Punkten Rechnung zu tragen, soll in der vorliegenden Arbeit die kardiale Schlagrate kultivierter, spontan kontrahierender neonataler Rattenkardiomyozyten mittels pharmakologischer Intervention (Isoprenalin und Blebbistatin) und elektrischer Pulsation verändert und parallel dazu die IL-6 Produktion bestimmt werden.

Die Arbeit fasst folgende Frage auf:

1. Beeinflusst die kardiale Schlagrate neonataler Rattenkardiomyozyten die Interleukin-6 Produktion?

Zur Beantwortung dieser zentralen Frage wurden folgende Fragen bearbeitet:

2. Führen die verwendeten Methoden (Endotoxin, Isoprenalin, Blebbistatin, elektrische Pulsation) zu den erwarteten Veränderungen der Schlagrate?
3. Wirkt Endotoxin (LPS) negativ chronotrop?
4. Führt die Vor-Inkubation mit Endotoxin (LPS) zu einer stärkeren Steigerung der durch Isoprenalin gesteigerten Schlagrate?

### 3 Material und Methodik

#### 3.1 Zellkulturmaterialien und -zusätze

Folgende Materialien und Zusätze wurden von den hier aufgelisteten Firmen erworben: Die 175 cm<sup>2</sup>- und 25 cm<sup>2</sup>-Kulturflaschen, sowie die Gewebekulturröhrchen erhielten wir von Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland). Von der Firma BD Bioscience (Heidelberg, Deutschland) bezogen wir die 6-Loch Platten (9,6 cm<sup>2</sup> / Loch) aus Polystyrol mit Primaria Oberfläche und Zellfilter mit einer Porengröße von 70 µm. Die 96-Loch Mikrotiterplatten stammten von TPP Techno Plastic Products AG (Trasadingen, Schweiz). Die Mikroreaktionsgefäße wurden von der Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland) bezogen und die 4-Loch Platten (21,8 cm<sup>2</sup> / Loch) aus Polystyrol stammten von ThermoElectron LED GmbH (Langenselbold, Deutschland). Von der Firma Biochrom (Berlin, Deutschland) wurde VLE-(*Very low Endotoxin*)-RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*)-Medium 1640 ohne L-Glutamin, die Trockensubstanz für das CMRL (*Connaught Medical Research Laboratories*)-Medium 1415, Penicillin / Streptomycin (10.000 IE / 10.000 µg / ml), L-Glutamin (200 mM), Pferdeserum, FKS (Fetales Kälberserum), die Puffersubstanz HEPES (Hydroxyethylpiperazin-Ethansulfonsäure), PBS (*Phosphate Buffered Saline*) und Trypsin erworben. MTT (*Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide*) und BSA (Bovines Serumalbumin) bezogen wir von Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland). Den humanen, rekombinanten IL-6 (Interleukin-6)-Standard erhielten wir von der Peprotech GmbH (Hamburg, Deutschland). Transferrin wurde von Roche Pharma AG (Grenzach-Wyhlen, Deutschland) erworben und β-Mercaptoethanol stammten von der Firma Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland).

Endotoxin (Lipopolysaccharid, LPS) vom Gram-negativen Bakterium *Escherichia coli* O111-B4, Isoprenalin (Isoproterenol) und der Myosin II-Blocker Blebbistatin wurden von der Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Deutschland) erworben.

### 3.2 Zellkulturmedien

#### CMRL 1415-Trockensubstanz (100g)

##### Alkohole:

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

##### 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

##### Zucker:

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

##### Desoxynucleoside:

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

##### Energieträger:

7,88 g Na-Pyruvat

##### Enzyme:

0,04 g Cocarboxylase  
0,04 g Codecarboxylase

##### pH-Indikator:

0,74 g Phenolrot-Na

##### Proteine:

0,35 g Glutathion

##### Vitamine:

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

##### 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
135,00	mM	NaCl
5,40	mM	KCl
0,36	mM	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
1,30	mM	CaCl <sub>2</sub>
0,97	mM	MgSO <sub>4</sub>
1,40	mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
7,50	mM	Glukose
10,00	mM	HEPES

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

in CMRL-Grundmedium	10,00	%	Pferdeserum
	10,00	%	FKS
	40,00	mg / ml	Tobramycin

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

in CMRL-Grundmedium	25,00	µg / ml	Albumin
	25,00	µg / ml	Insulin
	2,50	µg / ml	Transferrin
	40,00	mg / ml	Tobramycin

**PBS- Lösung (pH = 7,4)**

in H <sub>2</sub> O	137,00	mM	NaCl
	2,70	mM	KCl
	10,60	mM	Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	2,10	mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	5,00	mM	Glukose

**Trypsinlösung**

in PBS-Lösung	0,125	%	Trypsin
	0,036	%	Kollagenase

**Stopplösung zur IL-6 Bestimmung**

50 %	Dodecylsulfat-Natrium-Salz
50 %	Dimethylformamid

**Verdünnungsmedium**

in RPMI 1640	1 %	Penicillin / Streptomycin
	1 %	L-Glutamin
	2 %	FKS

**3.3 Präparation und Kultivierung neonataler Rattenkardiomyozyten**

Rattenkardiomyozyten wurden aus den Herzen neonataler Wistar-Laborratten isoliert, die wir von der Zentralen Tierhaltung des Zentrums für Medizinische Grundlagenforschung (Halle (Saale), Deutschland) erhielten. Die im Folgenden beschriebene Methode zur Kultivierung der Kardiomyozyten (Werdan und Erdmann, 1989) wurde durch eine medizinisch-technische Laborassistentin durchgeführt. Die Organentnahme war unter dem internen Aktenzeichen "K6IIIM7" gemeldet. Die Anzahl der getöteten Tiere wurde mit der Versuchstiermeldung über den Tierschutzbeauftragten dem Landesverwaltungsamt gemeldet. Die 1 bis 3 Tage alten Ratten wurden mithilfe einer Pinzette durch Genickbruch getötet und in 70 %-igem Ethanol desinfiziert. Anschließend wurden die Tiere sternotomiert und die noch schlagende Herzen entnommen. Die Herzen wurden in einer Petrischale mit eisgekühlter PBS-AG1-Lösung von Blut und Zellen gesäubert, mithilfe eines Skalpells vorsichtig zerkleinert und für 15 Min unter leichtem Rühren in die vorgewärmte Trypsinlösung gegeben. Der erste Überstand wurde verworfen, da dieser zum größten Teil Zellfragmente und Fibroblasten enthielt. Anschließend wurde erneut 5 ml frische, vorgewärmte Trypsinlösung zugegeben, gefolgt von einer 10 minütigen Inkubation im Brutschrank (Typ B12, Heraeus, Hanau, Deutschland) unter leichtem Rühren. Die Überstände wurden entnommen und der Vorgang wurde insgesamt zehnmal wiederholt. Die abgenommenen Überstände wurden jeweils in eisgekühlte Zentrifugenröhrchen, die 2 ml CMRL-Wachstumsmedium enthielten, überführt und für 10 Min bei 1400 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Die entstandenen Pellets wurden in 5 ml CMRL-Wachstumsmedium resuspendiert, gesammelt und anschließend durch ein Zellsieb filtriert (70 µm) um die Herzmuskelzellen von Gewebestücken zu trennen. Anschließend wurde die Suspension in eine 175 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche überführt und für 1,5 Std im Brutschrank inkubiert. Da die Fibroblasten schneller als die Kardiomyozyten am Boden der Zellkulturflaschen adhärten (Kruse



und Patterson, 1973), waren nach 1,5 Std im Überstand vorwiegend Kardiomyozyten vorhanden. Die Kardiomyozyten wurden in einer Konzentration von  $1,2 \times 10^5$  Zellen /  $\text{cm}^2$  resuspendiert. Zur Bestimmung der Lebend-Zellzahl diente die Auszählung in einer Neubauer Zählkammer unter Trypanblaufärbung. Je nach anschließend verwendeter Methode wurden die Kardiomyozyten in 6-Loch bzw. 4-Loch Platten im Brutschrank 24 Std inkubiert. Währenddessen adhärten die Kardiomyozyten am Boden der Kulturgefäße und begannen spontan zu kontrahieren. Am ersten Tag nach Beginn der Zellpräparation wurde das CMRL-Wachstumsmedium abgesaugt, die Zellen zweimal mit 3 ml vorgewärmten CMRL-Grundmedium gewaschen und durch 3,5 bzw. 5 ml (6- bzw. 4-Loch Platten) vorgewärmtes, frisches synthetisches Medium ersetzt. Das hinzugefügte synthetische Medium enthielt kein Serum, um die weitere Teilung von Fibroblasten und damit die Überwucherung der Herzmuskelzellen zu reduzieren. Nach weiterer 24-stündiger Inkubation im Brutschrank wurden die Zellkulturen erneut gewaschen, das synthetische Medium durch frisches ersetzt und die Zellen anschließend in den Experimenten verwendet.

### **3.4 Messung der Schlagrate**

Die Schlagrate der neonatalen Rattenkardiomyozyten wurde unter dem Mikroskop mithilfe eines photoelektrischen Systems gemessen. Um den Objektisch des Mikroskops war eine Kammer installiert, die mit einem Gebläse verbunden war. Dadurch konnte die Temperatur für Arbeiten am Mikroskop konstant auf 37 °C gehalten werden. Die Umgebung wurde bei den Messungen weitestgehend abgedunkelt. Die Schlagratenmessung wurde je nach verwendeter Methode in 6-Loch (Isoprenalin und Blebbistatin) bzw. 4-Loch Platten (elektrische Pulsation) durchgeführt. Die Platten wurden nacheinander unter das Mikroskop geführt und zunächst in vier Gesichtsfeldern pro Loch das Aussehen und Schlagverhalten der Zellen beurteilt. Anschließend wurden vier Messungen pro Loch in den 6-Loch Platten bzw. zwei Messungen pro Loch in den 4-Loch Platten durchgeführt. Dabei erfolgte in jedem Loch aller Proben zunächst die erste Messung und in gleicher Reihenfolge die zweite, dritte bzw. vierte Messung, um eine möglichst hohe Vergleichbarkeit zu erzielen. Durch eine im Mikroskop integrierte Kamera wurde das Schlagverhalten der Zellen in einem Zeitraum von 72 Sek aufgezeichnet. Daraus wurde die Schlagrate der Kardiomyozyten pro Minute abgeleitet. Die Auswertung der Schlagraten erfolgte mit einem für diese Anwendung entwickelten Programm, welches mit dem grafischen Programmiersystem *LabView* von *National Instruments Germany GmbH* (München, Deutschland) entworfen worden war. Alle Messungen wurden als Video auf digitalen Medien gespeichert.

### **3.5 Isoprenalin-Experimente**

Die Experimente zur Steigerung der Schlagrate durch Isoprenalin wurden in 6-Loch Platten durchgeführt. 48 Stunden nach Beginn der Kardiomyozyten-Isolation wurden die Zellen zweimal mit 3 ml CMRL-Grundmedium gewaschen und schließlich 2,5 ml synthetisches Medium hinzugefügt, um das Austrocknen der Zellen zu verhindern. Den Stimulantien wurde 1 ml synthetisches Medium zugegeben (pro Loch 3,5 ml Gesamtvolumen). Da die Schlagratenmessung einer 6-Loch Platte 30 Min benötigte, wurde die Stimulation der Platten in einem Abstand von 30 Min durchgeführt. Die Endkonzentrationen der Stimulantien betragen 100 ng / ml LPS (Lipopolysaccharid, Endotoxin) bzw. 10  $\mu$ M Isoprenalin. Zunächst wurde die Hälfte der Zellkulturplatten für 24 Std mit LPS inkubiert, die anderen Platten wurden ohne LPS inkubiert. Diese Behandlung wird im Weiteren als Vor-Inkubation mit bzw. ohne LPS bezeichnet, um sie von der anschließenden Inkubation mit Isoprenalin abzugrenzen. Nach der Vor-Inkubation wurde die Schlagrate gemessen und anschließend Isoprenalin zugegeben. Nach 10 Min und 24 Std Inkubation mit Isoprenalin wurde die Schlagrate erneut bestimmt.

Bei den Experimenten, die einen Einfluss der Schlagrate auf die IL-6 Produktion überprüfen sollten, wurden vor Zugabe von Isoprenalin und nach 24 Std Inkubation mit Isoprenalin die Zellüberstände entnommen und die IL-6 Konzentration im 7TD1-Test gemessen.

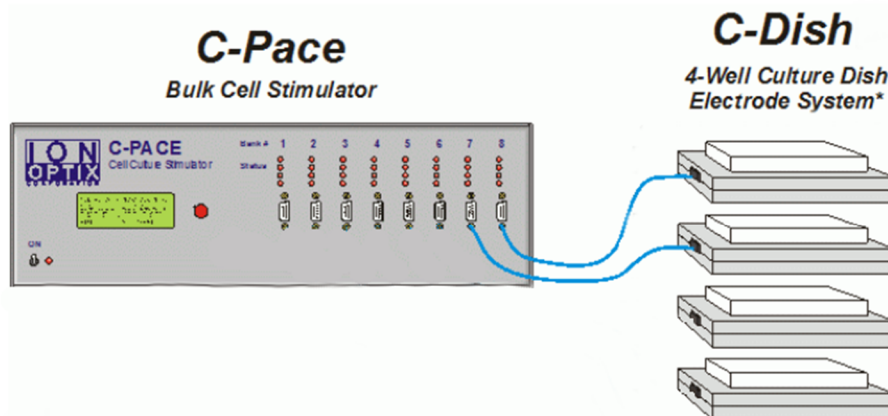
### **3.6 Blebbistatin-Experimente**

Für die Experimente mit Blebbistatin wurden 6-Loch Platten verwendet. 48 Stunden nach Beginn der Zellpräparation wurden die Zellen zweimal mit 3 ml CMRL-Grundmedium gewaschen und 2,5 ml synthetisches Medium hinzugefügt. Nach Zugabe von Blebbistatin (0,1, 1 bzw. 10  $\mu$ M) bzw. LPS (100 ng / ml) betrug das Gesamtvolumen 3,5 ml pro Loch. Jede Bedingung wurde in Duplikaten angesetzt. Die Inkubation wurde über 24 Std im Brutschrank durchgeführt. Anschließend erfolgte die Schlagratenmessung und die Abnahme der Überstände für die Bestimmung der IL-6 Konzentration. Zusätzlich wurde in einem Experiment bereits nach 5 Std Inkubation die Schlagrate gemessen und die Zellüberstände entnommen.

### **3.7 Elektrische Pulsation der neonatalen Rattenkardiomyozyten**

Für Experimente mit elektrischer Pulsation wurden 4-Loch Platten verwendet. Vor Beginn der Pulsation wurden die Zellen zweimal mit 5 ml CMRL-Grundmedium gewaschen und 5 ml synthetisches Medium zugefügt. In einigen Experimenten wurde

zusätzlich Blebbistatin (1  $\mu\text{M}$ ) vor Beginn der Pulsation hinzugefügt. Zur elektrischen Pulsation wurde das „C-Pace“ und das dazugehörige „C-Dish“ von der Firma IonOptix Limited (Dublin, Irland) genutzt (Abb. 1). Das C-Pace ist ein Pulsationsgerät welches speziell für Zellkulturen in Inkubatoren entwickelt worden ist. Die Pulsationsfrequenz (0,1 Hz – 10 Hz), die elektrische Spannung (0 V – 40 V) und die Pulsationsdauer (0,4 ms – 24 ms) konnten separat verändert werden. Das „C-Dish“, ein zweiteiliges, autoklavierbares Bauteil, wurde mithilfe eines Bandkabels mit dem „C-Pace“ verbunden. Über Karbonelektroden wurden die vom C-Pace generierten elektrischen Impulse auf die im „C-Dish“ enthaltene 4-Loch Platte übertragen. Insgesamt konnten pro Experiment zwei Platten elektrisch pulsiert werden. Für jede Platte wurden unterschiedliche Pulsationsparameter verwendet. Diese beiden Kombinationen wurden in allen nachfolgenden Experimente mit elektrischer Pulsation verwendet: „Pulsation 1“ mit einer Pulsationsdauer von 24 msec und einer Spannung von 10 V; „Pulsation 2“ mit einer Pulsationsdauer von 5 msec und einer Spannung 25 V. Die Schlagfrequenz wurde für beide Kombinationen auf 4 Hz definiert. In den Experimenten wurden zwei weitere 4-Loch-Platten nicht an das Pulsationsgerät angeschlossen. Diese dienten als Kontrollbedingung. Nach 2 Std bzw. 24 Std elektrischer Pulsation wurde die Schlagrate gemessen und ein Teil der Zellüberstände entnommen, um darin die IL-6 Konzentration zu bestimmen.



**Abb. 1: Culture Pacing System.** Zur elektrischen Pulsation wurde das Pulsationsgerät C-Pace und die dazugehörigen C-Dish verwendet (IonOptix, 2014).

### 3.8 Bestimmung der Interleukin-6 Konzentration

Generell wurden zur IL-6 Bestimmung je 0,5 ml Zellüberstand entnommen und für 10 Min bei 500 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Anschließend wurden davon 0,45 ml Überstand entnommen und in Gegenwart von BSA (0,2 %; 0,1 ml) bei - 20 °C tiefgefroren. Die Bestimmung der IL-6 Konzentration erfolgte mithilfe eines

biologischen Testverfahrens. Dafür wurde eine von IL-6-abhängige Mäuse-B-Zelllinie (7TD1) verwendet (van Snick et al., 1986). Die Zellen wurden in 25 cm<sup>2</sup>-Kulturflaschen im Brutschrank (37 °C, 7,5 % CO<sub>2</sub>) inkubiert. Dreimal in der Woche wurden 400000 Zellen mit 8 ml RPMI-Kulturmedium (RPMI 1640, 10 % FKS, IL-6 (100 pg / ml) und β-Mercaptoethanol (0,5 μM)) subkultiviert. Zur Bestimmung der IL-6 Konzentration wurden 96-Loch Mikrotiterplatten verwendet. Zu Beginn wurde in jedes Loch 50 μl Verdünnungsmedium aufgetragen. Die Proben bzw. eine IL-6 Standardlösung (10 ng / ml) wurden in die oberste Reihe der Platte gegeben (17 μl) und in 1:4 Verdünnungsschritten verdünnt. Die 7TD1-Zellen aus der Dauerkultur wurden in ein Zentrifugenröhrchen überführt und bei 800 rpm für 10 Min dreimal zentrifugiert. Zwischen den Zentrifugenschritten wurden sie in IL-6-freiem Medium aus RPMI 1640, 1 % Penicillin / Streptomycin und 1 % L-Glutamin resuspendiert. Nach der Zellzählung in einer Neubauer-Zählkammer wurden 30.000 Zellen / ml in RPMI 1640 mit 18 % FKS, 1 % Penicillin / Streptomycin, 1 % L-Glutamin und 1 μM β-Mercaptoethanol gegeben. Die Zellsuspension (50 μl) wurde in jedes Loch der Mikrotiterplatte pipettiert und die Platten für 72 Std im Brutschrank inkubiert. Daraufhin wurde MTT (10 μl / Loch) zugegeben. Nach 4 Std Inkubation im Brutschrank wurde die Reaktion durch Zugabe von 100 μl Stopplösung pro Loch (5 % SDS, 50 % Dimethylformamide) gestoppt. Die Platten wurden anschließend über Nacht auf einem Plattenschüttler (Titramax 1000, Heidolph, Schwabach, Deutschland) geschüttelt, sodass sich die gebildeten Kristalle auflösten. Am nächsten Morgen erfolgte die Messung der Extinktion bei 570 nm an einem ELISA- (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*) Messgerät (SpectraFluor, Tecan, Berlin, Deutschland). Mithilfe der ED<sub>50</sub>-Analyse (Mittlere effektive Dosis) wurde anschließend die IL-6 Konzentration bestimmt. Durch den Vergleich der ED<sub>50</sub>-Werte der Proben mit den ED<sub>50</sub>-Werten des IL-6 Standard, wurde die IL-6 Konzentration in den Proben berechnet.

### **3.9 Statistische Auswertung**

Zur statistischen Auswertung der Daten wurde die Software *IBM SPSS Statistics Version 19* verwendet. Es wurden häufig mehrere Einzelerperimente als Mittelwert ± Standardabweichung zusammengefasst. Die Berechnung der Signifikanzen wurde mithilfe des Mann-Whitney-Tests durchgeführt.

## 4 Ergebnisse

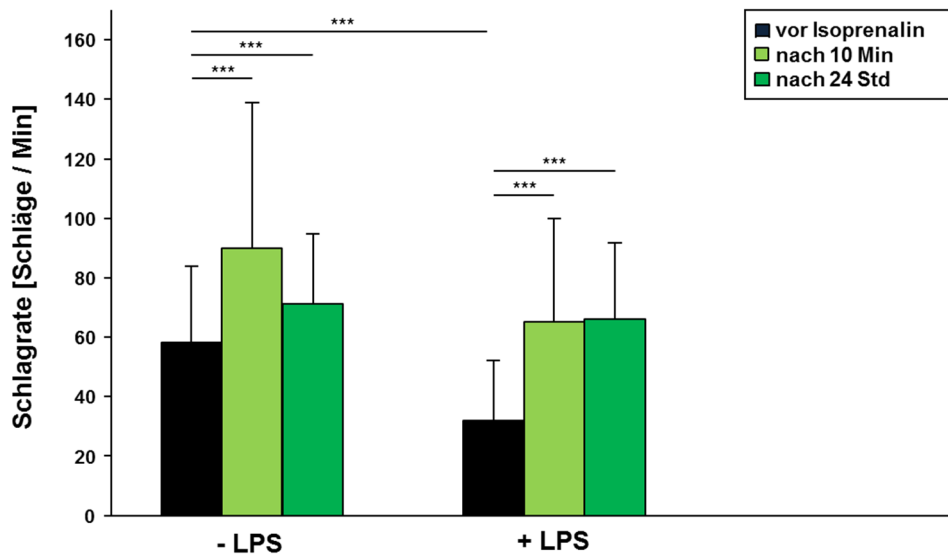
Frühere experimentelle Arbeiten in unserem Labor an Ivabradin-behandelten neonatalen Rattenkardiomyozyten wiesen darauf hin, dass ein direkter Zusammenhang zwischen der Kontraktion der Herzmuskelzellen von Ratten und der Interleukin-6 (IL-6) Produktion dieser Zellen bestehen könnte. Ziel der vorliegenden Arbeit besteht daher in der Untersuchung, inwieweit eine gezielte Veränderung der Schlagrate die IL-6 Produktion beeinflussen könnte. Hierzu wurde die Schlagrate durch drei, auf unterschiedlichen Wirkmechanismen beruhenden Methoden verändert. Durch das Sympathomimetikum Isoprenalin wurde die Schlagrate pharmakologisch gesteigert, wohingegen mithilfe des Myosin-Blockers Blebbistatin die Schlagrate pharmakologisch inhibiert wurde. Darüber hinaus erfolgte durch elektrische Pulsation die rhythmische Depolarisation, die zur Steigerung der Schlagrate führte. Parallel zur gezielten Veränderung der Schlagrate wurde die IL-6 Produktion in den Zellüberständen bestimmt.

### 4.1 Das verwendete Testsystem eignet sich zur Analyse der durch Isoprenalin und Endotoxin veränderten Schlagrate

Bevor der Einfluss der Schlagrate auf die IL-6 Produktion untersucht wurde, sollte zunächst dargestellt werden, ob eine Veränderung der Schlagrate in dem verwendeten *in vitro* Testsystem mit kultivierten Rattenkardiomyozyten möglich war. Hierzu wurden die kultivierten Rattenkardiomyozyten mit Isoprenalin inkubiert und die Schlagrate an zwei Messzeitpunkten bestimmt. Weiterhin ging aus früheren Untersuchungen hervor, dass Lipopolysaccharid (LPS) an die Schrittmacherkanäle des Herzens bindet und dadurch die Chronotropie von Myokardzellen beeinflusst (Klößner et al., 2011). Daher wurde die Wirkung von Isoprenalin auf die Schlagrate auch nach Vor-Inkubation mit LPS bestimmt (Abb. 2).

Die Kardiomyozyten ohne LPS-Vor-Inkubation und vor Zugabe von Isoprenalin wiesen eine spontane Kontraktion auf ( $58 \pm 26$  Schläge / Min). Die Zugabe von Isoprenalin erhöhte die Schlagrate der Kardiomyozyten zu beiden Messzeitpunkten (nach 10 Min auf  $90 \pm 49$  Schläge / Min bzw. nach 24 Std auf  $71 \pm 24$  Schläge / Min). Die Kardiomyozyten, die mit LPS vor-inkubiert wurden, wiesen vor Zugabe von Isoprenalin eine spontane Kontraktion von  $32 \pm 20$  Schläge / Min auf. Dies bestätigte den von unserer Arbeitsgruppe beschriebenen hemmenden Einfluss von LPS auf die Schlagrate der Kardiomyozyten (Ebelt et al., 2015). Die Zugabe von Isoprenalin zu den mit LPS vor-inkubierten Kardiomyozyten führte ebenfalls zu einer Steigerung der Schlagrate. Unmittelbar nach Zugabe von Isoprenalin (10 Min) wurde die Schlagrate

der Kardiomyozyten auf  $65 \pm 35$  Schläge / Minute gesteigert. Auch 24 Std nach Zugabe von Isoprenalin war noch eine ähnlich starke Steigerung der Schlagrate auf  $66 \pm 26$  Schläge / Minute messbar.

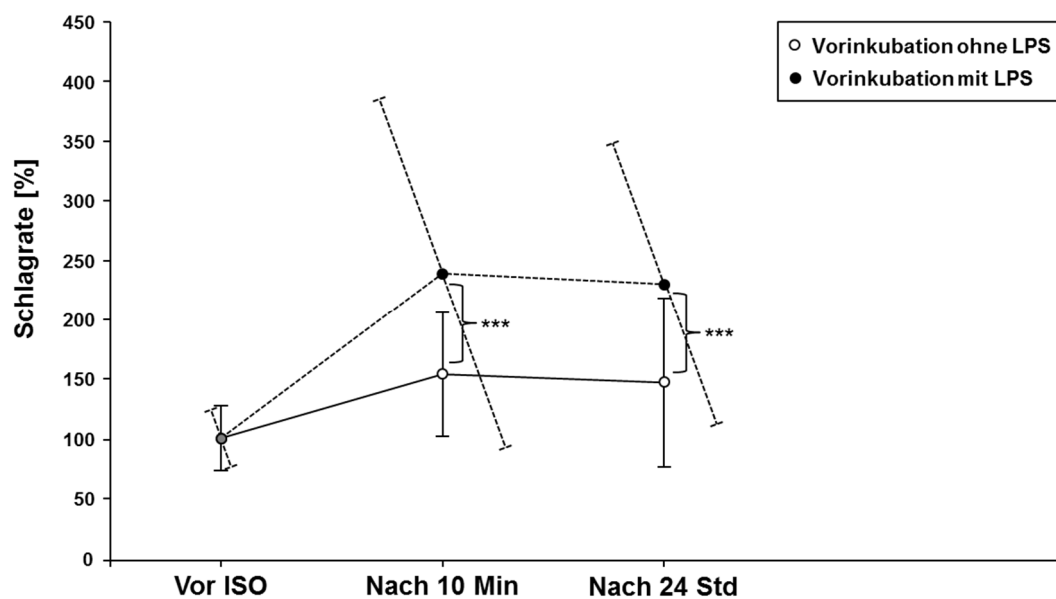


**Abb. 2: Isoprenalin steigert die Schlagrate in Ab- und Anwesenheit von LPS.**

Spontan kontrahierende Rattenkardiomyozyten wurden in 6-Loch Platten kultiviert ( $1,2 \times 10^5$  Zellen /  $\text{cm}^2$ ) und 24 Std in Ab- bzw. Anwesenheit von 100 ng / ml LPS inkubiert. Anschließend wurde Isoprenalin ( $10 \mu\text{M}$ ) zugegeben. Die Schlagrate wurde vor der Zugabe von Isoprenalin, nach 10 Min und nach 24 Std Isoprenalininkubation gemessen. Dazu erfolgte die Messung der Schlagrate an vier Positionen jeder Kultur für jeweils 72 Sek. Die Abbildung stellt die Zusammenfassung der Messungen von sieben Experimenten mit unabhängigen Zellisolaten dar. Dargestellt wurden die Mittelwerte der Schlagrate  $\pm$  Standardabweichung [Schläge / Min]. Statistisch analysiert wurden die Daten mithilfe des Mann-Whitney-Tests.

Aus Patch-clamp Untersuchungen von Zorn-Pauly et al. (2007) geht hervor, dass der durch Isoprenalin hervorgerufene Ionenstrom durch den Schrittmacher-Kanal (HCN-Kanal) größer war, wenn die Kardiomyozyten mit LPS vor-inkubiert wurden. Wäre diese Beobachtung auf das hier verwendete Testsystem mit spontan kontrahierenden Rattenkardiomyozyten übertragbar, sollten die Kardiomyozyten die mit LPS vor-inkubiert wurden, auf die Zugabe von Isoprenalin mit einer höheren Steigerung der Schlagrate reagieren, als Kardiomyozyten ohne LPS-Vor-Inkubation. Um die Daten hierauf zu untersuchen war es notwendig, die jeweiligen Schlagraten vor Zugabe von Isoprenalin mit den Schlagraten nach Isoprenalin-Zugabe in ein prozentuales Verhältnis zu setzen. Um diese Auswertung durchzuführen, wurde dafür die Schlagrate vor Isoprenalin-Zugabe in jedem Well separat als 100 % definiert (Abb. 3; „vor ISO“).

Nach Zugabe von Isoprenalin wurde die gemessene Schlagrate in jedem Well mit der durchschnittlichen Schlagrate in diesem Well vor Zugabe von Isoprenalin in ein prozentuales Verhältnis gesetzt. Die Schlagrate der Kardiomyozyten die ohne LPS vor-inkubiert wurden, stieg von  $100 \pm 25 \%$  vor Zugabe von Isoprenalin auf  $154 \pm 52 \%$  nach 10 Min an. Nach 24 Std zeigte sich eine vergleichbare Steigerung der Schlagrate auf  $147 \pm 71 \%$ . Bei den Kardiomyozyten die mit LPS vor-inkubiert waren, wurde die Schlagrate durch Isoprenalin von  $100 \pm 27 \%$  auf  $239 \pm 151 \%$  nach 10 Min bzw. auf  $230 \pm 122 \%$  nach 24 Std Inkubation gesteigert. Der Vergleich der Steigerungen der Schlagraten zeigte, dass die Kardiomyozyten die mit LPS vor-inkubiert wurden zu beiden Messzeitpunkten (10 Min und 24 Std nach Zugabe von Isoprenalin) signifikant höhere Schlagraten aufwiesen als diejenigen, die ohne LPS vor-inkubiert waren. Damit konnten die durchgeführten Experimente mit spontan-kontrahierenden Kardiomyozyten in dem hier verwendeten Testsystem die Ergebnisse der Patch-clamp Untersuchungen von Zorn-Pauly et al. (2007) unterstützen.



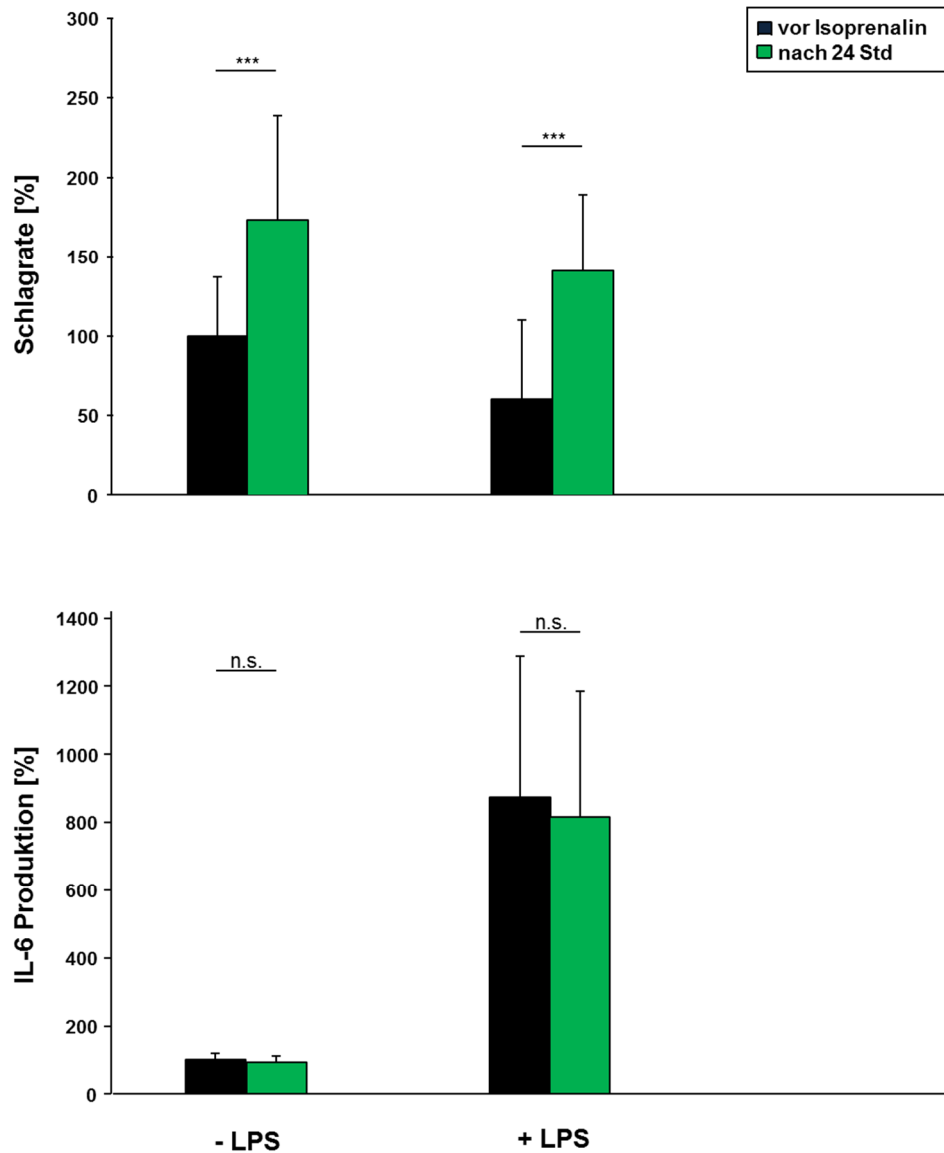
**Abb. 3: Die LPS-Vor-Inkubation erhöht die Stimulierbarkeit der Kardiomyozyten auf Isoprenalin.** Die in Abb. 2 dargestellten Daten wurden hier in anderer Form analysiert. Nach Zugabe von Isoprenalin wurde die gemessene Schlagrate in jedem Well mit der durchschnittlichen Schlagrate in diesem Well vor Zugabe von Isoprenalin, in ein prozentuales Verhältnis gesetzt (vor ISO  $\triangleq$  100 %). Dargestellt wurden die Mittelwerte der Schlagrate  $\pm$  Standardabweichung [%]. Statistisch analysiert wurden die Daten mithilfe des Mann-Whitney-Tests (\*\*\*,  $p < 0,001$ ).

#### **4.2 Das Sympathomimetikum Isoprenalin steigert die Schlagrate, aber nicht die Interleukin-6 Produktion von neonatalen Rattenkardiomyozyten**

Die folgenden Experimente haben das Ziel, in dem zuvor beschriebenen Testsystem den Einfluss der Schlagrate auf die IL-6 Produktion zu untersuchen. Hierzu wurde die Schlagrate in Gegenwart und Abwesenheit von LPS durch Isoprenalin gesteigert. Parallel dazu wurde die IL-6 Produktion der Zellen bestimmt (Abb. 4). In Übereinstimmung mit den zuvor gezeigten Daten (siehe Abb. 2), wiesen die Kardiomyozyten eine spontane Schlagrate in Abwesenheit von LPS und vor Zugabe von Isoprenalin von  $47 \pm 22$  Schläge / Min ( $\pm 100 \pm 34$  %) auf. Die Inkubation mit Isoprenalin (24 Std) erhöhte die Schlagrate auf  $173 \pm 66$  %. Die Schlagrate wurde durch LPS in den hier dargestellten Experimenten auf  $60 \pm 50$  % gesenkt. Die Inkubation mit Isoprenalin erhöhte in Gegenwart von LPS die Schlagrate auf  $141 \pm 48$  %. In den Kulturen wurde die IL-6 Produktion bestimmt.

Die IL-6 Produktion betrug in Abwesenheit von LPS und vor Zugabe von Isoprenalin  $956 \pm 316$  pg / ml ( $\pm 100 \pm 21$  %). Nach 24-stündiger Inkubation mit Isoprenalin wurde die IL-6 Produktion nicht signifikant verändert und betrug  $93 \pm 20$  %. In Anwesenheit von LPS wurde die IL-6 Produktion deutlich auf  $875 \pm 412$  % gesteigert. Nach der Inkubation mit Isoprenalin erfolgte keine weitere Steigerung der IL-6 Produktion ( $816 \pm 369$  %). Die unter Verwendung von Isoprenalin durchgeführten Experimente deuteten damit nicht darauf hin, dass eine durch Isoprenalin erhöhte Schlagrate eine Steigerung der IL-6 Produktion zur Folge hat.





**Abb. 4: Isoprenalin steigert die Schlagrate der neonatalen Rattenkardiomyozyten, während die IL-6 Produktion unverändert bleibt.** Spontan kontrahierende Rattenkardiomyozyten wurden in 6-Loch Platten kultiviert ( $1,2 \times 10^5$  Zellen /  $\text{cm}^2$ ) und 24 Std in Ab- und Anwesenheit von 100 ng / ml LPS inkubiert. Anschließend wurde Isoprenalin (10  $\mu\text{M}$ ) zugegeben. Vor der Zugabe von Isoprenalin und nach 24 Std Inkubation wurde die Schlagrate für jeweils 72 Sek an vier Positionen jeder Kultur gemessen. Die Überstände für die IL-6 Bestimmung wurden ebenfalls vor Isoprenalinzugabe und nach 24 Std abgenommen und mithilfe des 7TD1-Tests im Triplikat quantifiziert. Dargestellt wurden die Mittelwerte der Schlagraten  $\pm$  Standardabweichung [%] und die Mittelwerte der IL-6 Produktion  $\pm$  Standardabweichung [%]. Die Bedingung „vor Isoprenalin - ohne LPS“ wurde als 100 % definiert. Die Graphik fasst die Messungen von drei Experimenten mit unabhängigen Zellisolaten zusammen. Statistisch analysiert wurden die Daten mithilfe des Mann-Whitney-Tests (n.s., nicht signifikant; \*\*\*,  $p < 0,001$ ).

### **4.3 Durch Blebbistatin wird die Schlagrate und die Interleukin-6 Produktion neonataler Rattenkardiomyozyten verringert**

Zur weiteren Untersuchung der Abhängigkeit der IL-6 Produktion von der Schlagrate wurden neben Experimenten mit Isoprenalin, Untersuchungen mit anderen Wirkmechanismen zur gezielten Beeinflussung der Schlagrate durchgeführt. Zur gezielten Veränderung der Schlagrate diente im Folgenden der Myosinblocker Blebbistatin.

#### **4.3.1 Die Inkubation mit Blebbistatin über 24 Stunden senkt die Schlagrate und die Interleukin-6 Produktion**

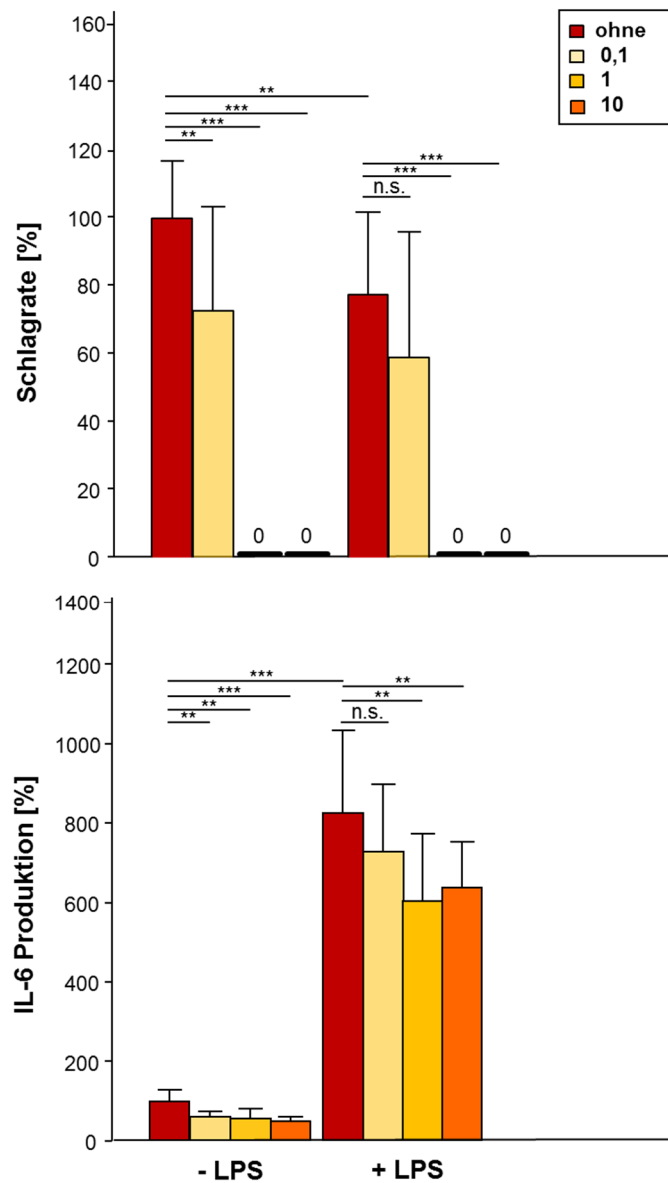
In Abb. 5 wurde der Einfluss von Blebbistatin auf die Schlagrate und die IL-6 Produktion der neonatalen Rattenkardiomyozyten in Ab- und Anwesenheit von LPS dargestellt. Die Schlagrate der neonatalen Rattenkardiomyozyten in Abwesenheit von LPS und in Abwesenheit von Blebbistatin betrug  $56 \pm 19$  Schläge / Min ( $\pm 100 \pm 17$  %). Durch die Zugabe von 10 bzw. 1  $\mu\text{M}$  Blebbistatin wurde die Schlagrate der Rattenkardiomyozyten vollständig blockiert. Die Zugabe der niedrigsten Blebbistatinkonzentration (0,1  $\mu\text{M}$ ) bewirkte keine vollständige Blockade, sondern eine Absenkung der Schlagrate auf  $73 \pm 30$  %. Durch LPS wurde die Schlagrate wie erwartet gesenkt ( $78 \pm 24$  %). Blebbistatin (10 und 1  $\mu\text{M}$ ) blockierte auch in Anwesenheit von LPS die Kontraktion der Kardiomyozyten vollständig. Anders als in Abwesenheit von LPS, wurde in Anwesenheit von LPS die Schlagrate durch die niedrigste Blebbistatinkonzentration (0,1  $\mu\text{M}$ ) nicht signifikant gesenkt ( $59 \pm 37$  %).

Da die Experimente zum Ziel hatten die Abhängigkeit der IL-6 Produktion von der Schlagrate zu untersuchen, wurde parallel zur Schlagrate auch die IL-6 Produktion der Kardiomyozyten bestimmt. In Abwesenheit von LPS senkte die höchste Blebbistatinkonzentration (10  $\mu\text{M}$ ) die IL-6 Produktion ( $51 \pm 11$  %). Durch 1  $\mu\text{M}$  Blebbistatin wurde die IL-6 Produktion auf  $58 \pm 25$  % gesenkt und durch 0,1  $\mu\text{M}$  Blebbistatin auf  $60 \pm 14$  %. Darüber hinaus zeigte sich erneut, dass LPS die IL-6 Produktion der Kardiomyozyten erheblich steigerte ( $825 \pm 209$  %). Die beiden höchsten Blebbistatinkonzentrationen (10 und 1  $\mu\text{M}$ ) senkten auch die durch LPS stimulierte IL-6 Produktion (10  $\mu\text{M}$ :  $638 \pm 114$  %; 1  $\mu\text{M}$ :  $604 \pm 169$  %). Bei der Inkubation mit der niedrigsten Blebbistatinkonzentration (0,1  $\mu\text{M}$ ) unter LPS-Stimulation zeigte sich hingegen keine signifikante Absenkung der IL-6 Produktion ( $729 \pm 169$  %).

Werden die Stärke der Absenkung der Schlagrate bzw. der IL-6 Produktion miteinander verglichen, zeigte sich, dass die Absenkung der Schlagrate wesentlich

ausgeprägter war als die Absenkung der IL-6 Produktion. Die beiden höchsten Konzentrationen Blebbistatin (10 und 1  $\mu\text{M}$ ) führten in Abwesenheit und Gegenwart von LPS zu einer vollständigen Inhibition der Schlagrate. Die IL-6 Produktion wurde unter diesen Blebbistatinkonzentrationen wesentlich schwächer gesenkt.

Zusammenfassend zeigte sich bei den Untersuchungen nach 24 Std Inkubation, dass eine signifikante Absenkung der Schlagrate durch die unterschiedlichen Konzentrationen von Blebbistatin, jeweils auch eine Absenkung der IL-6 Produktion zur Folge hatte. Darüber hinaus wurde die Schlagrate und die IL-6 Produktion unterschiedlich stark abgesenkt. Es lässt sich daher aus den oben gezeigten Experimenten schlussfolgern, dass ein Einfluss der Schlagrate auf die IL-6 Produktion existieren könnte, dieser jedoch gering ausgeprägt ist.



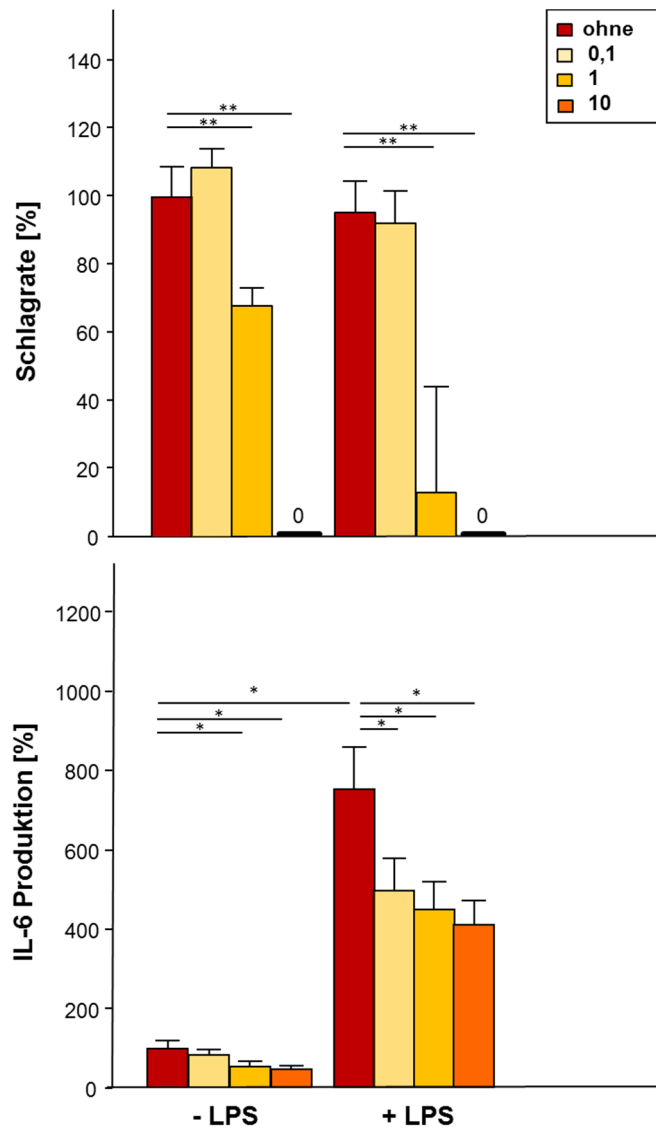
**Abb. 5: Die Inkubation mit Blebbistatin verringert die Schlagrate und die IL-6 Produktion neonataler Rattenkardiomyozyten in unterschiedlichem Maße.** Spontan kontrahierende Rattenkardiomyozyten wurden in 6-Loch Platten kultiviert ( $1,2 \times 10^5$  Zellen /  $\text{cm}^2$ ). Anschließend wurde Blebbistatin (0,1, 1 und 10  $\mu\text{M}$ ) in Gegenwart bzw. Abwesenheit von LPS (100 ng / ml) zugegeben. Nach 24 Std Inkubation wurde die Schlagrate für jeweils 72 Sek an drei Positionen jeder Kultur gemessen. Die Überstände für die IL-6 Bestimmung wurden ebenfalls nach 24 Std Inkubation entnommen und mithilfe des 7TD1-Tests im Triplikate quantifiziert. Die Bedingung „ohne Blebbistatin – ohne LPS“ wurde als 100 % definiert. Dargestellt wurden die Mittelwerte der Schlagrate  $\pm$  Standardabweichung [%] und der IL-6 Produktion  $\pm$  Standardabweichung [%]. Die Graphik stellt die Messungen von drei Experimenten mit unterschiedlichen Zellisolaten dar. Statistisch analysiert wurden die Daten mithilfe des Mann-Whitney-Tests (\*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ , n.s., nicht signifikant).

#### 4.3.2 Eine 5-stündige Inkubation mit Blebbistatin senkt die Schlagrate und die Interleukin-6 Produktion

Zur besseren Beurteilung der Ergebnisse mit Blebbistatin wurde zusätzlich ein Experiment durchgeführt, bei dem die Schlagrate und die IL-6 Produktion bereits nach 5-stündiger Inkubation mit Blebbistatin bestimmt wurden (Abb. 6). Die Kontraktion der Kardiomyozyten nach 5 Std Inkubation in Abwesenheit von Blebbistatin wurde als 100 % definiert ( $\pm 130 \pm 12$  Schläge / Min). Die 5-stündige Inkubation mit  $10 \mu\text{M}$  Blebbistatin blockierte die Kontraktion vollständig. Durch  $1 \mu\text{M}$  Blebbistatin wurde die Schlagrate auf  $68 \pm 5$  % gesenkt. In Gegenwart von  $0,1 \mu\text{M}$  Blebbistatin wurde keine Absenkung der Schlagrate gemessen ( $109 \pm 6$  %). Parallel wurden die Kardiomyozyten mit LPS inkubiert. Die LPS-Inkubation über 5 Std hatte keinen signifikanten Effekt auf die Schlagrate der Kardiomyozyten ( $95 \pm 9$  %). Wie in den Zellkulturen ohne LPS, wurde die Schlagrate durch  $10 \mu\text{M}$  Blebbistatin auch in Anwesenheit von LPS vollständig blockiert. Die Inkubation mit  $1 \mu\text{M}$  Blebbistatin senkte die Schlagrate auf  $13 \pm 31$  %. Die Inkubation mit  $0,1 \mu\text{M}$  Blebbistatin zeigte, wie auch in Abwesenheit von LPS, keine Absenkung der Schlagrate ( $92 \pm 10$  %).

Neben der Schlagrate wurde auch die IL-6 Produktion in den Zellüberständen bereits nach 5 Std quantifiziert. Es zeigte sich in Abwesenheit von LPS, dass die Inkubation mit  $10 \mu\text{M}$  Blebbistatin die IL-6 Produktion auf  $48 \pm 8$  % und die Inkubation mit  $1 \mu\text{M}$  Blebbistatin die IL-6 Produktion auf  $54 \pm 13$  % absenkte. Nach Zugabe der niedrigsten Blebbistatinkonzentration ( $0,1 \mu\text{M}$ ) wurde keine signifikante Absenkung gemessen ( $84 \pm 14$  %). Die Inkubation mit LPS bewirkte eine Steigerung der IL-6 Produktion auf  $754 \pm 105$  % gegenüber unstimulierten Kardiomyozyten. In Anwesenheit von LPS bewirkte die Inkubation mit allen drei Blebbistatinkonzentrationen ( $10$ ,  $1$  und  $0,1 \mu\text{M}$ ) eine Absenkung der IL-6 Produktion. Die Inkubation mit  $10 \mu\text{M}$  Blebbistatin senkte die IL-6 Produktion auf  $412 \pm 64$  %. Die Inkubation mit  $1$  bzw.  $0,1 \mu\text{M}$  Blebbistatin senkte die IL-6 Produktion auf  $449 \pm 70$  % bzw.  $498 \pm 81$  % ab.

Zusammenfassend zeigte sich auch bei der Messung nach 5 Std Inkubation mit Blebbistatin eine Absenkung der Schlagrate und der IL-6 Produktion. Wird die Stärke der Absenkung von Schlagrate und IL-6 Produktion unter der höchsten Blebbistatinkonzentration verglichen, zeigte sich in Abwesenheit und Gegenwart von LPS eine vollständigen Inhibition der Schlagrate, wohingegen die IL-6 Produktion unter dieser Blebbistatinkonzentration wesentlich schwächer abgesenkt wurde. Die Schlussfolgerung aus den Experimenten nach 24 Std Inkubation, dass ein geringer ausgeprägter Einfluss der Schlagrate auf die IL-6 Produktion existieren könnte, wird somit durch das Experiment nach 5 Std Inkubation unterstützt.



**Abb. 6: Die Inkubation mit Blebbistatin über 5 Std verringert die Schlagrate und die IL-6 Produktion neonataler Rattenkardiomyozyten unterschiedlich stark.** Spontan kontrahierende Rattenkardiomyozyten wurden in 6-Loch Platten kultiviert ( $1,2 \times 10^5$  Zellen /  $\text{cm}^2$ ). Anschließend wurde Blebbistatin (0,1, 1 und 10  $\mu\text{M}$ ) in Gegenwart bzw. Abwesenheit von LPS (100 ng / ml) zugegeben. Nach 5 Std Inkubation wurde die Schlagrate für jeweils 72 Sek an drei Positionen jeder Kultur gemessen. Die Überstände für die IL-6 Bestimmungen wurden ebenfalls nach 5 Std Inkubation entnommen und mithilfe des 7TD1-Tests im Triplikat quantifiziert. Die Bedingung „ohne Blebbistatin - ohne LPS“ wurde als 100 % definiert. Dargestellt wurden die Mittelwerte der Schlagrate  $\pm$  Standardabweichung [%] und der IL-6 Produktionen  $\pm$  Standardabweichung [%]. Es wurde ein Experiment durchgeführt. Statistisch analysiert wurden die Daten mithilfe des Mann-Whitney-Tests (\*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ).

#### **4.4 Die elektrische Pulsation steigert die Schlagrate und die Interleukin-6 Produktion**

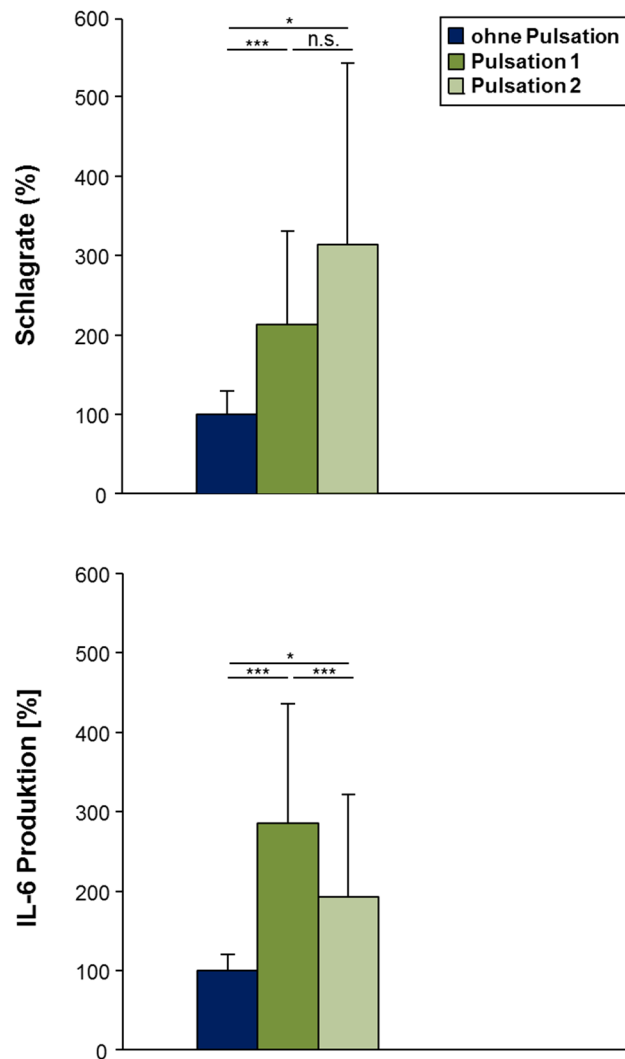
Die Experimente unter Verwendung von Isoprenalin zeigten keine Hinweise auf eine Abhängigkeit der IL-6 Produktion von der Schlagrate. Im Gegensatz dazu deuteten die Experimente mit Blebbistatin auf eine, wenn auch gering ausgeprägte, Abhängigkeit hin. Für eine exaktere Beurteilung sollte im Folgenden über einen weiteren Wirkmechanismus die Schlagrate gezielt verändert werden. Hierzu wurden die kultivierten Kardiomyozyten elektrischer Pulsation ausgesetzt. Durch rhythmische Membrandepolarisation sollte hierbei die Schlagrate der Kardiomyozyten gesteigert und parallel dazu die IL-6 Produktion der Zellüberstände bestimmt werden.

##### **4.4.1 Die 24-stündige elektrische Pulsation steigert die Schlagrate und die Interleukin-6 Produktion**

In Abb. 7 wurde der 24-stündige Einfluss der elektrischen Pulsation auf die Schlagrate bzw. die IL-6 Produktion dargestellt. Die Kardiomyozyten kontrahierten spontan mit  $100 \pm 27 \%$  ( $\approx 32 \pm 14$  Schläge / Min). Unter elektrischer Pulsation mit einer Pulsationsdauer von 24 msec und einer elektrischen Spannung von 10 V (= Pulsation 1) wurde die Schlagrate auf  $213 \pm 117 \%$  erhöht. Unter Pulsation mit einer Pulsationsdauer von 5 msec und einer Spannung von 25 V (= Pulsation 2) wurde die Schlagrate auf  $310 \pm 234 \%$  gesteigert. Die Schlagraten, die durch Pulsation 1 bzw. 2 hervorgerufen worden sind, waren nicht signifikant unterschiedlich.

Die parallel hierzu gemessene IL-6 Produktion ohne Pulsation betrug  $777 \pm 293$  pg / ml ( $\approx 100 \pm 21 \%$ ). Durch Pulsation 1 wurde die IL-6 Produktion auf  $258 \pm 151 \%$  erhöht. Durch Pulsation 2 wurde die IL-6 Produktion auf  $192 \pm 129 \%$  gesteigert. Die durch Pulsation 1 hervorgerufene IL-6 Produktion war dabei signifikant höher als die IL-6 Produktion durch Pulsation 2.

Die Daten zeigten zusammenfassend, dass die elektrische Pulsation in den Kulturen sowohl die Schlagrate als auch die IL-6 Produktion erhöhte. Dieser Verlauf könnte auf einen Einfluss der Schlagrate auf die IL-6 Produktion hinweisen.

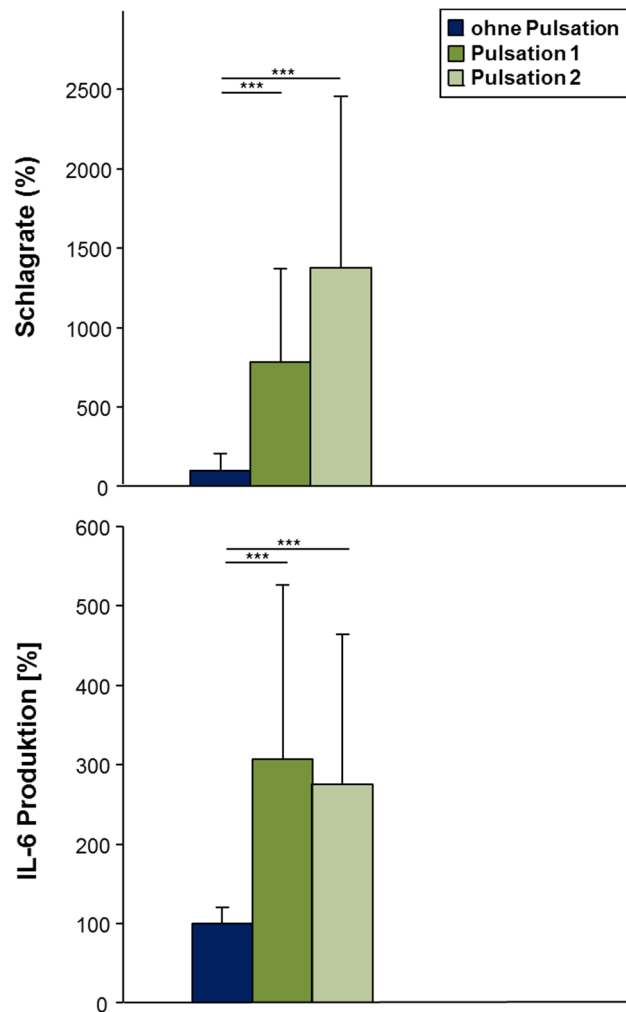


**Abb. 7: Die 24-stündige elektrische Pulsation steigert die Schlagrate und die IL-6 Produktion.** Spontan kontrahierende Rattenkardiomyozyten wurden in 4-Loch Platten kultiviert ( $1,2 \times 10^5$  Zellen /  $\text{cm}^2$ ) und mit einer Frequenz von 4 Hz pulsiert („Pulsation 1“: 10 V elektrische Spannung, 24 msec Pulsationsdauer; „Pulsation 2“: 25 V elektrische Spannung, 5 msec Pulsationsdauer). Nach 24 Std wurde die Schlagrate an drei zufällig ausgewählten Punkten für jeweils 72 Sek gemessen. Die Zellüberstände wurden ebenfalls nach 24 Std abgenommen und die IL-6 Konzentration mithilfe des 7TD1-Tests im Triplikate quantifiziert. Dargestellt wurden die Mittelwerte der Schlagrate  $\pm$  Standardabweichung [%] und der IL-6 Produktion  $\pm$  Standardabweichung [%]. Die Bedingung „ohne Pulsation“ wurde jeweils als 100 % definiert. Die Graphik fasst die Messungen von drei Experimenten mit unterschiedlichen Zellisolaten zusammen. Statistisch analysiert wurden die Daten mithilfe des Mann-Whitney-Tests (\*,  $p < 0,05$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ ; n.s., nicht signifikant).



#### **4.4.2 Eine 2-stündige elektrische Pulsation steigert die Schlagrate und die Interleukin-6 Produktion**

Zur Untersuchung, ob eine Abhängigkeit der IL-6 Produktion von der Schlagrate bereits nach 2 Std Pulsation besteht, wurden weitere Experimente nach diesem Zeitraum durchgeführt (Abb. 8). Die Kardiomyozyten kontrahierten spontan nach 2 Std ohne Pulsation mit  $12 \pm 14$  Schläge / Min ( $\cong 100 \pm 9$  %). Nach 2 Std mit Pulsation 1 stieg die Schlagrate auf  $785 \pm 591$  % an. Durch Pulsation 2 wurde die Schlagrate auf  $1279 \pm 1077$  % gesteigert. Die IL-6 Produktion betrug nach 2 Std ohne Pulsation  $479 \pm 186$  pg / ml ( $\cong 100 \pm 21$  %). Unter elektrischer Pulsation mit Pulsation 1 bzw. 2 wurde die IL-6 Produktion auf  $307 \pm 220$  % bzw.  $275 \pm 189$  % gesteigert. Wie bereits die Ergebnisse der 24-stündigen Pulsation zeigten, deuteten auch die Messwerte nach 2-stündiger Pulsation auf einen Einfluss der Schlagrate auf die IL-6 Produktion hin.



**Abb. 8: Die 2-stündige elektrische Pulsation steigert die Schlagrate und die IL-6 Produktion.** Spontan kontrahierende Rattenkardiomyozyten wurden in 4-Loch Platten kultiviert ( $1,2 \times 10^5$  Zellen /  $\text{cm}^2$ ) und mit einer Frequenz von 4 Hz pulsiert („Pulsation 1“: 10 V elektrische Spannung, 24 msec Pulsationsdauer; „Pulsation 2“: 25 V elektrische Spannung, 5 msec Pulsationsdauer). Nach 2 Std wurde die Schlagrate an drei zufällig ausgewählten Punkten für jeweils 72 Sek gemessen. Die Zellüberstände wurden ebenfalls nach 2 Std abgenommen und die IL-6 Konzentration mithilfe des 7TD1-Tests quantifiziert. Dargestellt wurden die Mittelwerte der Schlagrate  $\pm$  Standardabweichung [%] und der IL-6 Produktion  $\pm$  Standardabweichung [%]. Die Bedingung „ohne Pulsation“ wurde jeweils als 100 % definiert. Die Darstellung fasst die Messungen von drei Experimenten mit unterschiedlichen Zellisolaten zusammen. Statistisch analysiert wurden die Daten mithilfe des Mann-Whitney-Tests (\*\*\*,  $p < 0,001$ ).

## 5 Diskussion

Eine erhöhte kardiale Schlagrate und ein Anstieg des Zytokins IL-6 im Plasma sind anerkannte Risikofaktoren und prognosebestimmend bei Patienten mit SIRS (Casey et al., 1993; Meduri et al., 1995; Leibovici et al., 2007). Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Evaluation eines möglichen Einflusses der Schlagrate neonataler Rattenkardiomyozyten auf die IL-6 Produktion dieser Zellen. Als Grundlage dienten vorangegangene pharmako-physiologische Experimente unserer Arbeitsgruppe mit dem HCN-Kanal-Blocker Ivabradin. Aufgrund der Ergebnisse dieser Untersuchungen, die darauf hinwiesen, dass ein Abhängigkeit der IL-6 Produktion von der Schlagrate existieren könnte, wurden hier unter Anwendung von drei verschiedenen Methoden weiterführende Experimente mit der Fragestellung durchgeführt, ob die Kontraktion einen Einfluss auf die Produktion von Interleukin-6 hat.

### 5.1 Isoprenalin und LPS wirken chronotrop auf neonatale Rattenkardiomyozyten

Das in unserer Arbeitsgruppe verwendete Modell isolierter neonataler Rattenkardiomyozyten stellt keine weit verbreitete Methode dar. Zur Validierung des Testsystems wurden daher zwei Substanzen mit bekanntermaßen unterschiedlichen chronotropen Eigenschaften verwendet. Isoprenalin, ein  $\beta$ -Sympathomimetikum mit einer positiv chronotropen Wirkung, bewirkt eine Steigerung der Schlagrate. Freyss-Beguin et al. (1983) beschrieben eine Erhöhung der Schlagrate um ca. 20 %. Dies konnte in den hier durchgeführten Experimenten bestätigt werden. Andererseits wurde LPS verwendet. Das Endotoxin LPS (Lipopolysaccharid) ist ein Bestandteil der Zellwand gram-negativer Bakterien und besitzt im Rahmen des SIRS eine Schlüsselrolle bei der Initiierung der proinflammatorischen Reaktion. Darüber hinaus ist LPS in der Lage direkt an die Schrittmacherzellen des Herzens zu binden und die Schlagrate abzusenken (Klößner et al., 2011). Die von uns durchgeführten *in vitro* Untersuchungen an neonatalen Rattenkardiomyozyten zeigten einen negativ chronotropen Einfluss von LPS auf die Schlagrate (Ebelt et al., 2015) und konnten durch die Daten der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Sowohl Isoprenalin als auch LPS veränderten also in dem von uns verwendeten Testsystem die Schlagrate wie in der Literatur beschrieben. Dies interpretierten wir als Eignung des verwendeten Modells isolierter neonataler Rattenkardiomyozyten zur Durchführung weiterer führender Untersuchungen.

### **5.2 Die durch Isoprenalin gesteigerte Schlagrate besitzt keinen Einfluss auf die Interleukin-6 Produktion**

Zur Untersuchung der Fragestellung, ob ein Einfluss der Schlagrate auf die IL-6-Produktion besteht, wurde parallel zur Schlagrate auch die IL-6-Produktion in den Zellüberständen bestimmt. Es wurde erwartet, dass die gesteigerte Schlagrate durch Isoprenalin eine Steigerung der IL-6-Produktion zur Folge hat. Diese These stützte sich auf Experimente, bei denen erstmals eine Steigerung der IL-6-Produktion von neonatalen Rattenkardiomyozyten durch die positiv chronotrope Substanz Isoprenalin beschrieben wurde (Rohrbach et al., 2007). Im Gegensatz dazu zeigte sich in den Experimenten nach Inkubation mit Isoprenalin kein Anstieg der IL-6-Produktion. Die Konzentration des Inflammationsmarkers blieb nach 24 Std Inkubation im Vergleich zu dem Messwert vor Beginn der Inkubation unverändert, obwohl ein geringer Anstieg des Inflammationsparameters über einen Zeitraum von 24 Std erwartet wurde (Loppnow und Libby, 1990). Dieses Ergebnis deutet auf eine vollständige Inhibierung der IL-6-Produktion durch Isoprenalin hin. Schlussfolgernd wäre eine zu hohe Konzentration des Pharmakons auf die Zellen und deren empfindliche IL-6-Produktion denkbar. Gestützt werden könnte diese Vermutung durch Untersuchungen, die eine toxische Wirkung von Isoprenalin auf die Funktion der Mitochondrien und Zellmembranen von Kardiomyozyten nachweisen (Ramos et al., 1983; Toseland et al., 1996). Somit konnte kein Einfluss der Schlagrate auf die IL-6-Produktion mithilfe von Isoprenalin gezeigt werden. Um eine sichere Aussage treffen zu können, inwiefern ein Einfluss der Schlagrate auf die IL-6-Produktion existiert, wurden weitere Experimente unter Einsatz von anderen Methoden notwendig.

### **5.3 Die Absenkung der Interleukin-6 Produktion durch Blebbistatin ist geringer als die der Schlagrate**

Das 2003 erstmals beschriebene Pharmakon Blebbistatin wurde ursprünglich zur Blockade der Zellteilung entwickelt (Straight et al., 2003). Es bindet mit einer hohen Affinität und Spezifität an den Kopf von Myosin II in Muskel- und Nicht-Muskelzellen. Die Inhibierung der ATPase verhindert das Zurückgelangen des Myosinkopfs in die Ausgangsposition (Kovacs et al., 2004) und blockiert den Kontraktionsmechanismus. Es wurde gezeigt, dass sich Blebbistatin zur Inhibition des Kontraktionsmechanismus von Rattenkardiomyozyten eignet und darüber hinaus bisher keine pleiotrope Wirkungen beschrieben wurden (Fedorov et al., 2007; Farman et al., 2008). Durch die spezifische Wirkung eignete sich die Verwendung von Blebbistatin zur Überprüfung der

vorliegenden Fragestellung. In unseren Untersuchungen wurde mittels Blebbistatin die Schlagrate neonataler Rattenkardiomyozyten ab einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  vollständig blockiert (siehe Abb. 5). In der Literatur wird ebenfalls eine Inhibition durch Blebbistatin beschrieben und eine vollständige Blockade der Kontraktion ab 5  $\mu\text{M}$  gezeigt (Fedorov et al., 2007). Bei diesen Experimenten wurden jedoch keine kultivierten Herzzellen, sondern perfundierte Rattenherzen und rechte Herzventrikel verwendet, sodass für eine vergleichbare Wirkung vermutlich eine höhere Dosis nötig gewesen war.

Die IL-6 Produktion der neonatalen Rattenkardiomyozyten wurde in Ab- und in Anwesenheit von LPS bei jeder Blebbistatinkonzentration abgesenkt, bei der auch eine Reduktion der Schlagrate nachgewiesen wurde (siehe Abb. 5). Das sowohl eine Absenkung der Schlagrate als auch eine Absenkung der IL-6 Produktion gemessen wurde, deutet auf eine Beeinflussung der IL-6 Produktion durch die Schlagrate hin. Vergleicht man die Stärke der Absenkungen von Schlagrate bzw. IL-6 Produktion miteinander, fällt jedoch eine deutlich stärkere Absenkung der Schlagrate auf. Unter Verwendung der beiden höchsten Konzentrationen an Blebbistatin (1 und 10  $\mu\text{M}$ ) kommt es zu einer vollständigen Blockade der Schlagrate. Die IL-6 Produktion wird jeweils geringfügiger abgesenkt. Es lässt sich daher schlussfolgern, dass der zu untersuchende Einfluss der Schlagrate auf die IL-6 Produktion durchaus existiert, diese Beeinflussung jedoch eine geringere Rolle für die IL-6 Produktion als für die Schlagrate zu spielen scheint. Dies steht im Konsens mit Untersuchungen aus der Literatur, bei der von einer Vielzahl von Signalwegen berichtet wird, welche die IL-6 Produktion in Kardiomyozyten beeinflussen können (Craig et al., 2000).

Diskutiert werden muss auch die Möglichkeit einer direkten Beeinflussung der IL-6 Produktion durch Blebbistatin. In der beschriebenen Signalkaskade zur Produktion von IL-6 in neonatalen Rattenkardiomyozyten spielt Myosin II keine Rolle (Craig et al., 2000), während Blebbistatin spezifisch auf diese Zielstruktur wirkt und pleiotrope Effekte des Pharmakons bisher nicht beschrieben wurden. Da die Wirkung von Blebbistatin spezifisch auf den Kontraktionsmechanismus in Rattenkardiomyozyten ist, scheint eine Beeinflussung durch Blebbistatin unwahrscheinlich.

#### **5.4 Der unter elektrischer Pulsation beobachtete Anstieg von Interleukin-6 wird durch die gesteigerte Schlagrate hervorgerufen**

Die elektrische Pulsation stellte neben den bereits erwähnten pharmakologischen Beeinflussungen der Schlagrate isolierter Rattenkardiomyozyten eine weitere Methode zur Überprüfung einer möglichen Abhängigkeit der IL-6 Produktion von der Schlagrate

dar. Die elektrische Pulsation wurde schon früh zur gezielten Veränderung der Kontraktion an Skelettmuskelzellen (Brevet et al., 1976) und später auch an Herzmuskelzellen eingesetzt (McDonough und Glembotski, 1992). Durch die Auslösung rhythmischer Membrandepolarisationen kommt es zu einem Calcium-Einstrom in die Zellen und demzufolge zu einer Synchronisation der Kontraktionen in der Zellkultur (Berger et al., 1994; Stoppel et al., 2016). Bei Experimenten an Skelettmuskelzellen ist die elektrische Pulsation ein etabliertes Modell um die Kontraktion zu steigern und eine Abhängigkeit der Inflammation von der Schlagrate zu untersuchen (Nikolic et al., 2012; Scheler et al., 2013; Bustamante et al., 2014). Analog zur Anwendung bei Skelettmuskelzellen, wurde in der vorliegenden Arbeit die elektrische Pulsation bei Herzmuskelzellen genutzt. Untersuchungen zur IL-6 Produktion von Kardiomyozyten infolge einer gesteigerten Schlagrate durch elektrische Pulsation existieren bisher nicht.

Die vorliegenden Untersuchungen bestätigten den in der Literatur beschriebenen Effekt, dass die elektrische Pulsation von Rattenkardiomyozyten deren Schlagrate steigert (siehe Abb. 7 und 8). Unter beiden Pulsationsbedingungen stieg die Schlagrate deutlich an. Zur Untersuchung, inwieweit eine Abhängigkeit der IL-6 Produktion von der Schlagrate besteht, musste auch die IL-6 Produktion gemessen werden. Unter beiden Pulsationsbedingungen ließ sich auch ein Anstieg der IL-6 Produktion nachweisen. Das sowohl eine Steigerung der Schlagrate als auch eine Steigerung der IL-6 Produktion gemessen wurde, könnte auf einen Einfluss der Schlagrate auf die IL-6 Produktion hinweisen. Wird die Stärke der Steigerung von Schlagrate und IL-6 Produktion unter den beiden Pulsationsbedingungen verglichen, zeigte sich, dass aus der stärksten Steigerung der Schlagrate nicht die stärkste Steigerung der IL-6 Produktion resultierte. Es lässt sich daher aufgrund der Untersuchungen mit elektrischer Pulsation ableiten, dass der zu untersuchende Einfluss der Schlagrate auf die IL-6 Produktion durchaus existieren könnte, dieser jedoch eine geringe Rolle für die IL-6 Produktion zu spielen scheint.

### **5.5 Die Schlagrate beeinflusst die Interleukin-6 Produktion in Skelettmuskelzellen**

In der Literatur wurden bisher keine Untersuchungen über den Einfluss des Kontraktionsmechanismus auf die IL-6 Produktion in neonatalen Kardiomyozyten beschrieben. Einige wenige Arbeiten beschäftigten sich mit anderen Zellfunktionen in Herzmuskelzellen, beispielsweise der Expression der Stickstoffmonoxid-Synthase (Chu et al., 2012) oder von Ionenkanälen (Knoll et al., 2003; Judice et al., 2009), die durch

den Kontraktionsmechanismus beeinflusst werden. Untersuchungen am Skelettmuskel, die bereits einen Einfluss der Schlagrate auf die IL-6 Produktion zeigen konnten, sind wesentlich weiter fortgeschritten (Pedersen und Febbraio, 2008; Schnyder und Handschin, 2015). Grundlage beider Untersuchungen waren zahlreiche Studien, die einen Anstieg des Inflammationsmarkers IL-6 unter körperlicher Belastung, beispielsweise während eines Marathonlaufs, im Blut nachwiesen (Drenth et al., 1995; Castell et al., 1997; Hellsten et al., 1997; Nehlsen-Cannarella et al., 1997; Starkie et al., 2000). Vermutungen, dass die erhöhte IL-6-Produktion bei vermehrter Bewegung durch die Aktivierung von Makrophagen (Nehlsen-Cannarella et al., 1997), eine gesteigerte IL-6-Produktion in der Leber (Liao et al., 1995) oder durch den Anstieg von Adrenalin (Steensberg et al., 2001) zustande kam, konnten jeweils nicht bestätigt werden. Stattdessen zeigten *in vivo* Experimente an Probanden, dass sich nach körperlicher Anstrengung die Konzentration von IL-6 nicht nur systemisch, sondern auch direkt im Skelettmuskel erhöhte (Ostrowski et al., 1998). Weiterführende Untersuchungen schlossen einen Zusammenhang mit einer Muskelschädigung aus (Croisier et al., 1999). Der Skelettmuskel scheint daher das akute Phase Protein selbständig zu sezernieren (Pedersen und Febbraio, 2008). Der entscheidende Mechanismus, der zur Aktivierung intrazellulärer Signalwege durch die Kontraktion beiträgt, bleibt jedoch auch für den Skelettmuskel noch weitestgehend unklar. Unter anderem wurde diskutiert, ob der Anstieg von NF $\kappa$ B (*nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*), Calcineurin-NFAT (*nuclear factor of activated T-cells*) oder Stickstoffmonoxid die IL-6 Produktion beeinflusste (Pedersen und Febbraio, 2008). Da die anatomischen Gegebenheiten und die Physiologie des Kontraktionsmechanismus zwischen Skelettmuskel und Herzmuskel vergleichbar sind, wäre eine Kopplung zwischen Schlagrate und IL-6 Produktion, der auf einem dieser Signalwege beruht, auch im Herzmuskel denkbar.

## **5.6 Die gezielte Veränderung der Schlagrate von neonatalen Rattenkardiomyozyten beeinflusst deren Interleukin-6 Produktion**

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals an neonatalen Kardiomyozyten ein Einfluss der Schlagrate und somit des kontraktiven Apparates auf deren IL-6 Produktion untersucht. Dazu wurde gezielt die Schlagrate mittels Isoprenalin, Blebbistatin und elektrischer Pulsation verändert. Mit Ausnahme der Experimente mit Isoprenalin, zeigen die Ergebnisse der Arbeit, dass eine Änderung der Schlagrate eine gleichsinnige Änderung der IL-6 Produktion zur Folge hat. Somit deuten die Experimente auf einen Einfluss der Schlagrate auf die IL-6 Produktion hin. Damit wären die hier dargestellten Untersuchungen analog zu den Untersuchungen im

Skelettmuskel zu betrachten, bei dem dieser Einfluss seit langem angenommen wird. Aus den hier gezeigten Experimenten war jedoch auch abzuleiten, dass der Einfluss der Schlagrate auf die IL-6 Produktion als gering einzuschätzen ist und das auch andere Signalwege existieren müssen, die die IL-6 Produktion beeinflussen.

### **5.7 Eine Vor-Inkubation mit LPS führt zu einer stärkeren Steigerung der Schlagrate durch Isoprenalin**

Patch-clamp Untersuchungen an humanen Myokardzellen zeigten, dass der durch Isoprenalin hervorgerufene Ionenstrom durch den HCN-Kanal ( $I_i$ ) größer ist, wenn zuvor eine Inkubation der Kardiomyozyten mit LPS erfolgte (Zorn-Pauly et al., 2007). Die in unseren Experimenten verwendeten kultivierten, neonatalen Rattenkardiomyozyten zeigten nach Vor-Inkubation mit LPS und anschließender Inkubation mit Isoprenalin, einen stärkeren Anstieg der Schlagrate, als ohne Vor-Inkubation mit LPS. Die Ergebnisse stehen damit im Konsens mit vorbeschriebenen Untersuchungen von Zorn-Pauly et al. und bestätigten uns die Eignung des hier verwendeten Testsystems für weitere Untersuchungen. Die Ursache hierfür ist noch nicht vollständig verstanden. In der Literatur wird davon ausgegangen, dass die Vor-Inkubation mit LPS den intrazellulären cAMP- (cyclisches Adenosinmonophosphat) Spiegel ansteigen lässt, woraus eine höhere Sensitivität auf Isoprenalin resultierte (Zorn-Pauly et al., 2007). Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnten einen cAMP-Anstieg durch LPS jedoch nicht bestätigen (I. Geißler; persönliche Mitteilung). Ein weiterer Erklärungsansatz wäre der Anstieg des Zytokins TNF- $\alpha$  durch LPS-Stimulation. Für den Inflammationsmarker TNF- $\alpha$  wiederum wurde gezeigt, dass das Zytokin die Ansprechrate von cAMP auf Isoprenalin steigern kann (Reithmann et al., 1991). Um zu klären welcher Mechanismus für die gesteigerte Sensitivität auf Isoprenalin verantwortlich ist, wären noch weitere Untersuchungen nötig, wie beispielsweise die Bestimmung des TNF- $\alpha$  Spiegels, nachdem die Zellen mit LPS vorinkubiert wurden.

### **5.8 Limitationen und Ausblick**

Die Experimente unserer Arbeitsgruppe weisen darauf hin, dass die IL-6 Produktion durch die Schlagrate bei neonatalen Rattenkardiomyozyten beeinflusst wird. Eine direkte Abhängigkeit können die Ergebnisse nicht zeigen, da eine Dosis-Wirkungs-Beziehung zwischen Schlagrate und IL-6 Produktion nicht gezeigt werden kann. Grund dafür ist, dass in den hier aufgeführten Experimenten mit einer großen Anzahl an Kardiomyozyten gearbeitet wurde und die Messwerte von Schlagrate und IL-6



Produktion dem Mittelwert aller verwendeten Zellen entspricht. Zur weiteren Klärung wären Untersuchungen nötig, die an einzelnen Kardiomyozyten durchgeführt werden und die Schlagrate und die IL-6 Produktion dieser Zelle bestimmen. Aufgrund der Variabilität der Kontraktion der Kardiomyozyten aus den unterschiedlichen Experimenten, musste häufig eine relative Angabe von Schlagrate oder IL-6 Produktion genutzt werden.

In dieser Arbeit dienten kultivierte Rattenkardiomyozyten als Modell zur Erhebung der Daten. Mit entsprechenden Methoden wurde versucht Zellen wie Fibroblasten oder Endothelzellen zu entfernen. Ob es jedoch minimale Verunreinigungen durch andere Zellen gab, kann nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden.

Die Methoden zur Veränderung der Schlagrate (Blebbistatin und elektrische Pulsation) wurden so ausgewählt, dass gezielt die Kontraktion der Rattenkardiomyozyten verändert wurde. Pleiotrope Effekte, insbesondere auf die Inflammediatoren sollten vermieden werden. Eine ausführliche Literaturrecherche lieferte keine Hinweise auf einen möglichen Einfluss von Blebbistatin oder elektrischer Pulsation auf die IL-6 Produktion von Kardiomyozyten und kamen deshalb als spezifische Methoden in Frage. In aktuellen Studien wurde hingegen für Skelettmuskelzellen die Aktivierung einer Vielzahl von Signalwegen beschrieben (Stoppel et al., 2016). Jedoch wurde auch für Skelettmuskelzellen bisher kein eigenständiger Einfluss der elektrischen Pulsation auf die IL-6 Produktion gezeigt. Eine Beeinflussung kann jedoch sowohl in Kardiomyozyten als auch in Skelettmuskelzellen nicht ausgeschlossen werden. Dass auch Blebbistatin einen direkten Einfluss auf die IL-6 Produktion besitzt, lässt sich trotz fehlender Hinweise aus der Literatur letztlich nicht sicher ausschließen. Somit könnte die veränderte IL-6 Produktion nicht nur aus einer Schlagratenveränderung resultieren, sondern auch durch diese Methode direkt beeinflusst worden sein. Für weitere Untersuchungen wäre denkbar, diese lediglich an spontan kontrahierenden, nicht stimulierten Rattenkardiomyozyten durchzuführen. Dadurch könnte ausgeschlossen werden, dass auch die angewandte Methode selbst die IL-6 Produktion beeinflusst.

## 6 Zusammenfassung

Eine erhöhte kardiale Schlagrate und der Anstieg des Inflammationsmarkers Interleukin-6 sind unabhängige Risikofaktoren beim SIRS. Bei vorangegangenen *in vitro* Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe mit dem HCN-Kanalblocker Ivabradin wurde eine Reduktion der kardialen Schlagrate und eine parallele Absenkung der IL-6 Produktion gezeigt. Es blieb unklar, ob die Muskelkontraktion in den Herzmuskelzellen die Mediatorproduktion direkt beeinflusst. Ziel dieser Arbeit war es daher, den Einfluss der Schlagrate auf die IL-6 Produktion zu untersuchen. Dafür wurde die Schlagrate kultivierter, neonataler Rattenkardiomyozyten mittels Isoprenalin, Blebbistatin und elektrischer Pulsation gezielt modifiziert. Parallel hierzu wurde die IL-6 Konzentration aus den Zellüberständen bestimmt.

Das zur Validierung des Testsystems verwendete Endotoxin (LPS) wirkte wie erwartet negativ chronotrop auf die Rattenkardiomyozyten. Das  $\beta$ -Sympathomimetikum Isoprenalin steigerte die Schlagrate der kultivierten Rattenkardiomyozyten. Die Steigerung der Schlagrate durch Isoprenalin war stärker, wenn die Kardiomyozyten mit Endotoxin (LPS) vor-inkubiert worden waren. Die IL-6 Produktion blieb trotz gesteigerter Schlagrate unverändert, was sich durch eine zu hohe Konzentration von Isoprenalin erklären könnte. Die Inkubation mit dem spezifischen Myosin II-Inhibitor Blebbistatin bewirkte mit steigender Konzentration eine Absenkung der Schlagrate bis zur vollständigen Blockade. Die IL-6 Produktion wurde bei diesen Untersuchungen ebenfalls abgesenkt. Durch die elektrische Pulsation wurde die Schlagrate der Kardiomyozyten gesteigert und parallel dazu ein Anstieg der IL-6 Produktion gemessen.

Die vorliegende Arbeit untersuchte erstmals einen Einfluss der Schlagrate auf die IL-6 Produktion an Kardiomyozyten. Die Ergebnisse zeigten, dass ein Einfluss der Schlagrate auf die IL-6 Produktion bei neonatalen Rattenkardiomyozyten existiert. Die Beeinflussung der IL-6 Produktion durch die Schlagrate scheint jedoch nur gering ausgeprägt zu sein.

## 7 Literaturverzeichnis

**Ackland GL, Yao ST, Rudiger A, Dyson A, Stidwill R, Poputnikov D, Singer M, Gourine AV (2010)** Cardioprotection, attenuated systemic inflammation, and survival benefit of beta1-adrenoceptor blockade in severe sepsis in rats. *Crit Care Med* 38: 388-394.

**Ancey C, Corbi P, Froger J, Delwail A, Wijdenes J, Gascan H, Potreau D, Lecron J (2002)** Secretion of IL-6, IL-11 and LIF by human cardiomyocytes in primary culture. *Cytokine* 18: 199-205.

**Anderson BO, Harken AH (1990)** Multiple organ failure: inflammatory priming and activation sequences promote autologous tissue injury. *J Trauma* 30: 44-49.

**Anderson R, Schmidt R (2010)** Clinical biomarkers in sepsis. *Front Biosci (Elite Ed)* 2: 504–520.

**Andus T, Heinrich PC, Castell JC, Gerok W (1989)** Interleukin-6: a key hormone of the acute phase reaction. *Dtsch Med Wochenschr* 114: 1710-1716.

**Berger HJ, Prasad SK, Davidoff AJ, Pimental D, Ellingsen O, Marsh JD, Smith TW, Kelly RA (1994)** Continual electric field stimulation preserves contractile function of adult ventricular myocytes in primary culture. *Am J Physiol* 266: H341-H349.

**Bonadei I, Vizzardi E, Sciatti E, Carubelli V, Lombardi CM, D'Aloia A, Metra M (2014)** Is there a role for ivabradine beyond its conventional use? *Cardiovasc Ther* 32:189-192.

**Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, Schein RM, Sibbald WJ (1992)** Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest* 101: 1644-1655.

**Bone RC (1996)** Immunologic dissonance: a continuing evolution in our understanding of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS) and the multiple organ dysfunction syndrome (MODS). *Ann Intern Med* 125: 680-687.

**Brevet A, Pinto E, Peacock J, Stockdale FE (1976)** Myosin synthesis increased by electrical stimulation of skeletal muscle cell cultures. *Science* 193: 1152-1154.

**Brunkhorst FM (2006)** Epidemiologie, Ökonomie und Praxis - Ergebnisse der deutschen Prävalenzstudie des Kompetenznetzwerkes Sepsis (SepNet). *Anästhesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* 41: 43-44.

**Bustamante M, Fernandez-Verdejo R, Jaimovich E, Buvinic S (2014)** Electrical stimulation induces IL-6 in skeletal muscle through extracellular ATP by activating Ca<sup>2+</sup> signals and an IL-6 autocrine loop. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 306: E869-E882.

**Casey LC, Balk RA, Bone RC (1993)** Plasma cytokine and endotoxin levels correlate with survival in patients with the sepsis syndrome. *Ann Intern Med* 119: 771-778.

**Castell LM, Poortmans JR, Leclercq R, Brasseur M, Duchateau J, Newsholme EA (1997)** Some aspects of the acute phase response after a marathon race, and the effects of glutamine supplementation. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 75: 47-53.

**Cheng JJ, Wung BS, Chao YJ, Wang DL (1996)** Cyclic strain enhances adhesion of monocytes to endothelial cells by increasing intercellular adhesion molecule-1 expression. *Hypertension* 28: 386-391.

**Chu M, Koshman Y, Iyengar R, Kim T, Russell B, Samarel AM (2012)** Contractile activity regulates inducible nitric oxide synthase expression and NO(i) production in cardiomyocytes via a FAK-dependent signaling pathway. *J Signal Transduct* 2012: 1-11.

**Cohen J (2002)** The immunopathogenesis of sepsis. *Nature* 420: 885-891.

**Craig R, Larkin A, Mingo AM, Thuerauf DJ, Andrews C, McDonough PM, Glembotski CC (2000)** p38 MAPK and NF-kappa B collaborate to induce interleukin-6 gene expression and release. Evidence for a cytoprotective autocrine signaling pathway in a cardiac myocyte model system. *J Biol Chem* 275: 23814-23824.

**Croisier JL, Camus G, Venneman I, Deby-Dupont G, Juchmes-Ferir A, Lamy M, Crielaard JM, Deby C, Duchateau J (1999)** Effects of training on exercise-induced muscle damage and interleukin-6 production. *Muscle Nerve* 22: 208-212.

**De Santis V, Frati G, Greco E, Tritapepe L (2014)** Ivabradine: a preliminary observation for a new therapeutic role in patients with multiple organ dysfunction syndrome. *Clin Res Cardiol* 103: 831-834.

**Dominguez-Rodriguez A, Consuegra-Sanchez L, Blanco-Palacios G, Abreu-Gonzalez P, Sanchez-Grande A, Bosa-Ojeda F, Kaski JC (2012)** Anti-inflammatory effects of ivabradine in patients with acute coronary syndrome: a pilot study. *Int J Cardiol* 158: 160-162.

**Drenth JP, Van Uum SH, Van Deuren M, Pesman GJ, Van der Ven-Jongekrijg J, Van der Meer JW (1995)** Endurance run increases circulating IL-6 and IL-1ra but downregulates ex vivo TNF-alpha and IL-1 beta production. *J Appl Physiol* 79: 1497-1503.

**Dreyer WJ, Phillips SC, Lindsey ML, Jackson P, Bowles NE, Michael LH, Entman ML (2000)** Interleukin-6 induction in the canine myocardium after cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg* 120: 256-263.

**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 (2015)** Direct inhibition, but indirect sensitization of pacemaker activity to sympathetic tone by the interaction of endotoxin with HCN-channels. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 42: 874-880.

**Farman GP, Tachampa K, Mateja R, Cazorla O, Lacampagne A, de Tombe, Pieter P (2008)** Blebbistatin: use as inhibitor of muscle contraction. *Pflugers Arch* 455: 995-1005.

**Fedorov VV, Lozinsky IT, Sosunov EA, Anyukhovskiy EP, Rosen MR, Balke CW, Efimov IR (2007)** Application of blebbistatin as an excitation-contraction uncoupler for electrophysiologic study of rat and rabbit hearts. *Heart Rhythm* 4: 619-626.

**Fraunberger P, Wang Y, Holler E, Parhofer KG, Nagel D, Walli AK, Seidel D (2006)** Prognostic value of interleukin-6, procalcitonin, and C-reactive protein levels in intensive care unit patients during first increase of fever. *Shock* 26: 10-12.

**Freyss-Beguín M, Griffaton G, Lechat P, Picken D, Quenedey MC, Rouot B, Schwartz J (1983)** Comparison of the chronotropic effect and the cyclic AMP accumulation induced by beta 2-agonists in rat heart cell culture. *Br J Pharmacol* 78: 717-723.

**Ginsburg KS, Bers DM (2004)** Modulation of excitation-contraction coupling by isoproterenol in cardiomyocytes with controlled SR Ca<sup>2+</sup> load and Ca<sup>2+</sup> current trigger. *J Physiol* 556: 463-480.

**Gogos CA, Drosou E, Bassaris HP, Skoutelis A (2000)** Pro- versus anti-inflammatory cytokine profile in patients with severe sepsis: a marker for prognosis and future therapeutic options. *J Infect Dis* 181: 176-180.

**Goris RJ, te Boekhorst TP, Nuytinck JK, Gimbrère JS (1985)** Multiple-organ failure. Generalized autodestructive inflammation? *Arch Surg* 120: 1109-1115.

**Gorre F, Vandekerckhove H (2010)** Beta-blockers: focus on mechanism of action. Which beta-blocker, when and why? *Acta cardiologica* 65: 565-570.

**Gwechenberger M, Mendoza LH, Youker KA, Frangogiannis NG, Smith CW, Michael LH, Entman ML (1999)** Cardiac myocytes produce interleukin-6 in culture and in viable border zone of reperfused infarctions. *Circulation* 99: 546-551.

**Heath DI, Cruickshank A, Gudgeon M, Jehanli A, Shenkin A, Imrie CW (1993)** Role of interleukin-6 in mediating the acute phase protein response and potential as an early means of severity assessment in acute pancreatitis. *Gut* 34: 41-45.

**Hellsten Y, Frandsen U, Orthenblad N, Sjodin B, Richter EA (1997)** Xanthine oxidase in human skeletal muscle following eccentric exercise: a role in inflammation. *J Physiol* 498: 239-248.

**Hennen R, Friedrich I, Hoyer D, Nuding S, Rauchhaus M, Schulze M, Schliske S, Schwesig R, Schlitt A, Buerke M (2008)** Autonomic dysfunction and beta-adrenergic blockers in multiple organ dysfunction syndrome. *Dtsch Med Wochenschr* 133: 2500-2504.

**Hoke RS, Müller-Werdan U, Lautenschlager C, Werdan K, Ebel 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.

**IonOptix (2014)** Culture pacing system. [Online im Internet:] [www.ionoptix.com/wp-content/uploads/2014/07/large.cspace\\_cdish1.gif](http://www.ionoptix.com/wp-content/uploads/2014/07/large.cspace_cdish1.gif) [Aufgerufen am 13.02.2016, 14:05]

**Judice CC, Marin TM, Franchini KG (2009)** Calcium and the mechanotransduction in cardiac myocytes. *Front Biosci (Elite Ed)* 1: 189-199.

**Klößner U, Rueckschloss U, Grossmann C, Ebel 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.

**Knoll R, Hoshijima M, Chien K (2003)** Cardiac mechanotransduction and implications for heart disease. *J Mol Med* 81: 750-756.

**Kovacs M, Toth J, Hetenyi C, Malnasi-Csizmadia A, Sellers JR (2004)** Mechanism of blebbistatin inhibition of myosin II. *J Biol Chem* 279: 35557-35563.

**Kruse PF, Patterson MK (1973)** *Tissue Culture: Methods and Applications*. Academic Press New York 1: 77-80.

**Leibovici L, Gafter-Gvili A, Paul M, Almanasreh N, Tacconelli E, Andreassen S, Nielsen AD, Frank U, Cauda R (2007)** Relative tachycardia in patients with sepsis: an independent risk factor for mortality. *QJM* 100: 629-634.

**Liao J, Keiser JA, Scales WE, Kunkel SL, Kluger MJ (1995)** Role of epinephrine in TNF and IL-6 production from isolated perfused rat liver. *Am J Physiology* 268: R896-R901.

**Loppnow H, Libby P (1990)** Proliferating or interleukin-1-activated human vascular smooth muscle cells secrete copious interleukin-6. *J Clin Invest* 85: 731-738.

**Loppnow H, Werdan K, Werner C (2002)** The enhanced plasma levels of soluble tumor necrosis factor receptors (sTNF-R1; sTNF-R2) and interleukin-10 (IL-10) in patients suffering from chronic heart failure are reversed in patients treated with beta-adrenoceptor antagonist. *Auton Autacoid Pharmacol* 22: 83-92.

**Macchia A, Romero M, Comignani PD, Mariani J, D'Ettoire A, Prini N, Santopinto M, Tognoni G (2012)** Previous prescription of beta-blockers is associated with reduced mortality among patients hospitalized in intensive care units for sepsis. *Crit Care Med* 40: 2768-2772.

**Matsuda N, Hattori Y (2006)** Systemic inflammatory response syndrome (SIRS): molecular pathophysiology and gene therapy. *J Pharmacol Sci* 101: 189-198.

**McDonough PM, Glembotski CC (1992)** Induction of atrial natriuretic factor and myosin light chain-2 gene expression in cultured ventricular myocytes by electrical stimulation of contraction. *J Biol Chem* 267: 11665-11668.

**Meduri GU, Headley S, Kohler G, Stentz F, Tolley E, Umberger R, Leeper K (1995)** Persistent elevation of inflammatory cytokines predicts a poor outcome in ARDS. Plasma IL-1 beta and IL-6 levels are consistent and efficient predictors of outcome over time. *Chest* 107: 1062-1073.

**Morelli A, Ertmer C, Westphal M, Rehberg S, Kampmeier T, Ligges S, Orecchioni A, D'Egidio A, D'Ippoliti F, Raffone C, Venditti M, Guarracino F, Girardis M, Tritapepe L, Pietropaoli P, Mebazaa A, Singer M (2013)** Effect of heart rate control with esmolol on hemodynamic and clinical outcomes in patients with septic shock: a randomized clinical trial. *JAMA* 310: 1683-1691.

**Müller-Werdan U (2003)** Septic shock and systemic inflammatory response syndrome-treatment. *Dtsch Med Wochenschr* 128: 2372-2376.

**Nair AS, Gopal, TVS (2013)** Ivabradine in sepsis. *J Anaesthesiol Clin Pharmacol* 29: 570-571.



**Nehlsen-Cannarella SL, Fagoaga OR, Nieman DC, Henson DA, Butterworth DE, Schmitt RL, Bailey EM, Warren BJ, Utter A, Davis JM (1997)** Carbohydrate and the cytokine response to 2.5 h of running. *J Appl Physiol* 82: 1662-1667.

**Nikolic N, Bakke SS, Kase ET, Rudberg I, Flo Halle I, Rustan AC, Thoresen GH, Aas V (2012)** Electrical pulse stimulation of cultured human skeletal muscle cells as an in vitro model of exercise. *PLoS One* 7: 1-10.

**Nuding S, Ebel 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.

**Ohtsuka T, Hamada M, Hiasa G, Sasaki O, Suzuki M, Hara Y, Shigematsu Y, Hiwada K (2001)** Effect of beta-blockers on circulating levels of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in patients with dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 37: 412-417.

**Ostrowski K, Rohde T, Zacho M, Asp S, Pedersen BK (1998)** Evidence that interleukin-6 is produced in human skeletal muscle during prolonged running. *J Physiol* 508: 949-953.

**Parker MM, Shelhamer JH, Natanson C, Alling DW, Parrillo JE (1987)** Serial cardiovascular variables in survivors and nonsurvivors of human septic shock: heart rate as an early predictor of prognosis. *Crit Care Med* 15: 923-929.

**Parrillo JE (1989)** The cardiovascular pathophysiology of sepsis. *Annu Rev Med* 40: 469-485.

**Pavlov VA, Wang H, Czura CJ, Friedman SG, Tracey KJ (2003)** The cholinergic anti-inflammatory pathway: a missing link in neuroimmunomodulation. *Mol Med* 9: 125-134.

**Pedersen BK, Febbraio MA (2008)** Muscle as an endocrine organ: focus on muscle-derived interleukin-6. *Physiol Rev* 88: 1379-1406.

**Piccirillo G, Luparini RL, Celli V, Moise A, Lionetti M, Marigliano V, Cacciafiesta M (2000)** Effects of carvedilol on heart rate and blood pressure variability in subjects with chronic heart failure. *Am J Cardiol* 86: 1392-1395.

**Ramos K, Combs AB, Acosta D (1983)** Cytotoxicity of isoproterenol to cultured heart cells: effects of antioxidants on modifying membrane damage. *Toxicol Appl Pharmacol* 70: 317-323.

**Reithmann C, Gierschik P, Werdan K, Jakobs KH (1991)** Tumor necrosis factor alpha up-regulates Gi-alpha and G-beta proteins and adenylyl cyclase responsiveness in rat cardiomyocytes. *Eur J Pharmacol* 206: 53-60.

**Rohrbach S, Engelhardt S, Lohse MJ, Werdan K, Holtz J, Müller-Werdan U (2007)** Activation of AP-1 contributes to the beta-adrenoceptor-mediated myocardial induction of interleukin-6. *Mol med* 13: 605-614.

**Scheler M, Irmeler M, Lehr S, Hartwig S, Staiger H, Al-Hasani H, Beckers J, Hrabě de Angelis M, Haring H, Weigert C (2013)** Cytokine response of primary human myotubes in an in vitro exercise model. *Am J Physiol Cell Physiol* 305: C877-C886.

**Schnyder S, Handschin C (2015)** Skeletal muscle as an endocrine organ: PGC-1 alpha, myokines and exercise. *Bone* 80: 115-125.

**Schulte W, Bernhagen J, Bucala R (2013)** Cytokines in sepsis: potent immunoregulators and potential therapeutic targets-an updated view. *Mediators Inflamm* 2013: 1-16.

**Seibel R, LaDuca J, Hassett JM, Babikian G, Mills B, Border DO, Border JR (1985)** Blunt multiple trauma (ISS 36), femur traction, and the pulmonary failure-septic state. *Ann Surg* 202: 283-295.

**Starkie RL, Angus DJ, Rolland J, Hargreaves M, Febbraio MA (2000)** Effect of prolonged, submaximal exercise and carbohydrate ingestion on monocyte intracellular cytokine production in humans. *J Physiol* 528: 647-655.

**Steensberg A, Toft AD, Schjerling P, Halkjaer-Kristensen J, Pedersen BK (2001)** Plasma interleukin-6 during strenuous exercise: role of epinephrine. *Am J Physiol Cell Physiol* 281: C1001-C1004.

**Stoppel WL, Kaplan DL, Black, Lauren D (2016)** Electrical and mechanical stimulation of cardiac cells and tissue constructs. *Adv Drug Deliv Rev* 96: 135-155.

**Straight AF, Cheung A, Limouze J, Chen I, Westwood NJ, Sellers JR, Mitchison TJ (2003)** Dissecting temporal and spatial control of cytokinesis with a myosin II inhibitor. *Science* 299: 1743-1747.

**Tamura K, Yoshida S, Iwai T, Watanabe I (1992)** Effects of isoprenaline and ouabain on cytosolic calcium and cell motion in single rat cardiomyocytes. *Cardiovasc Res* 26: 179-185.

**Toseland CD, Seaman CW, Francis I, White DJ, Earl LK (1996)** Study of the effects of cardiovascular drugs in heart cell cultures. *Toxicol In Vitro* 10: 765-773.

**Tracey KJ (2007)** Physiology and immunology of the cholinergic antiinflammatory pathway. *J Clin Invest* 117: 289-296.

**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 U S A* 83: 9679-9683.

**Vilaine JP (2006)** The discovery of the selective I(f) current inhibitor ivabradine. A new therapeutic approach to ischemic heart disease. *Pharmacol Res* 53:4 24-434.

**Werdan K, Erdmann E (1989)** Preparation and culture of embryonic and neonatal heart muscle cells: modification of transport activity. *Methods in Enzymology* 173: 634-662.

**Zorn-Pauly K, Pelzmann B, Lang P, Machler 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

## 8 Thesen

Aus der Universitätsklinik Klinik für Innere Medizin III  
der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
(Direktor: Komm. Direktor: PD Dr. Ulrich Hofmann)

### Thesen der Dissertation

Die Interleukin-6 Produktion neonataler Rattenkardiomyozyten wird durch die  
Schlagrate beeinflusst

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

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

von Heinrich Korth  
geboren am 16. November 1988 in Leipzig

1. Die im Rahmen eines SIRS auftretende Tachykardie und der Anstieg des Zytokins Interleukin-6 sind unabhängige Risikofaktoren und verschlechtern die Prognose der Patienten. Vorangegangene experimentelle Studien unserer Arbeitsgruppe ließen vermuten, dass ein Zusammenhang zwischen der Herzmuskelkontraktion und Interleukin-6 Produktion besteht.
2. Kardiomyozyten, die kleinste kontraktile Einheit des Herzens, sind imstande Zytokine zu produzieren. Zu den wichtigsten proinflammatorischen Entzündungsmediatoren gehört Interleukin-6, das an eine Vielzahl komplexer Signalkaskaden verknüpft ist.
3. Endotoxin (LPS) wirkt negativ chronotrop auf neonatale Rattenkardiomyozyten.
4. Isoprenalin steigert die Schlagrate neonataler Rattenkardiomyozyten. Ein Einfluss auf die Interleukin-6 Produktion ist nicht messbar.
5. Blebbistatin senkt die Schlagfrequenz der Kardiomyozyten mit steigender Konzentration bis zur vollständigen Blockade. Parallel dazu wird die Interleukin-6 Produktion verringert.
6. Die elektrische Pulsation der kultivierten Rattenherzzellen steigert die Schlagrate und die Interleukin-6 Produktion.
7. Der gleichgerichtete Verlauf der Veränderung der Herzfrequenz und Interleukin-6 Produktion lassen einen Zusammenhang vermuten. Allerdings ist die Änderung der Schlagrate durch Blebbistatin und elektrische Pulsation stärker ausgeprägt, als die Veränderung der Interleukin-6 Produktion.
8. Die Vor-Inkubation mit Endotoxin (LPS) lässt die Steigerung der Schlagrate der Rattenkardiomyozyten sensitiver auf Isoprenalin reagieren.

## Lebenslauf

Name: Heinrich Korth

Geburtsdatum: 16.11.1988

Geburtsort: Leipzig

Staatsangehörigkeit: deutsch

Anschrift: Ernst-Moritz-Arndt-Straße 5, 06114 Halle (Saale)

Familienstand: verheiratet

### Schulbildung

1995-1999 119. Grundschule, Leipzig

1999-2007 Wilhelm-Ostwald-Gymnasium, Leipzig

06/2007 Allgemeine Hochschulreife (Abitur)

### Studium

2008-2015 Humanmedizin an der Martin-Luther-Universität  
Halle-Wittenberg

12/2015 Approbation als Arzt

### Berufstätigkeit

Seit 02/2016 Assistenzarzt für Innere Medizin am Martha-Maria Krankenhaus  
Halle-Dölau

Halle, den 20.06.2017

---

## **Selbstständigkeitserklärung**

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel: „Die Interleukin-6 Produktion neonataler Rattenkardiomyozyten wird durch die Schlagrate beeinflusst“ selbstständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Die Arbeit ist bisher weder im In - noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer Prüfungskommission vorgelegt worden

Halle (Saale), den 20.06.2017

---

## **Erklärung über frühere Promotionsversuche**

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertationsschrift vorgelegt.

Halle (Saale), den 20.06.2017

---



## **Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Harald Loppnow für die Betreuung, die hilfreichen Diskussionen und wissenschaftlichen Impulse. Herrn Prof. Dr. Karl Werdan danke ich für die Vorgabe des Themas und die Heranführung an die Thematik. Mein besonderer Dank gilt Frau Pilowski und Frau Koch für die Einführung in die Labortechniken, die Unterstützung bei der Umsetzung und die angenehme Arbeitsatmosphäre. Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. Uwe Rückschloss für die Leihgabe des Pulsationsgerätes, sowie die fachliche Unterstützung und wertvollen Diskussionen. Nicht zuletzt danke ich meiner Familie und insbesondere meiner Frau Saphira, für die unermüdliche Unterstützung und Motivation.

---