

Aus dem Institut für Pharmakologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Jens W. Fischer

**Auswirkung von Diabetes mellitus sowie transientem Verschluss
der linken vorderen Herzkranzarterie auf die aktive
Kraftentwicklung und Kalzium-Sensitivität isolierter
Papillarmuskelpräparate**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Katharina Charlotte Beck

2026

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Joachim Schmitt

Zweitgutachterin: Prof. Dr. rer. nat. Martina Krüger

„My courage always rises at every attempt to intimidate me.“

– Jane Austen

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Funk F, Kronenbitter A, Isić M, Flocke V, Gorreßen S, Semmler D, Brinkmann M, Beck K, Steinhoff O, Srivastava T, Barbosa DM, Voigt K, Wang L, Bottermann K, Kötter S, Grandoch M, Flögel U, Krüger M, Schmitt JP, (2022), Diabetes disturbs functional adaptation of the remote myocardium after ischemia/reperfusion. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, (173) 47-60

Zusammenfassung

Nach einem Myokardinfarkt (MI) kommt es nicht nur im infarzierten Gewebe, sondern auch im nicht-ischämischen Myokard (*remote* Myokard, RM) zu funktionellen Veränderungen. So zeigten Voruntersuchungen der Arbeitsgruppe am Mausmodell, dass bereits 24 Stunden nach Ischämie und Reperfusion (I/R) die kontraktile Funktion des RM beeinträchtigt ist. Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der myokardialen Kraftentwicklung des RM im Anschluss an die akute inflammatorische Phase des Myokards, ca. 10 Tage nach I/R. Hierzu wurde im Organbad an elektrisch stimulierten Papillarmuskeln aus Mäusen 9-12 Tage nach einstündiger Ligation der linken vorderen Herzkranzarterie die aktiv generierte Kraft unter beta-adrenerger Stimulation mit Isoprenalin und unter steigender Vorspannung des Muskels analysiert. Darüber hinaus erfolgte die Untersuchung der Ca^{2+} -Sensitivität sowie der passiven Kraft mittels Triton an gehäuteten Papillarmuskelfasern. Da Diabetes mellitus ebenfalls zu pathophysiologischen Veränderungen des Myokards und einem Funktionsverlust im Sinne einer Kardiomyopathie führt, wurde im Zuge dieser Arbeit auch die Kraftentwicklung in Papillarmuskeln eines etablierten Mausmodells mit diabetischer Stoffwechsellage (db/db) im Vergleich zu Tieren ohne Diabetes mellitus (db/+) untersucht. 9-12 Tage nach I/R zeigte sich die Kraftentwicklung der Papillarmuskeln unter basalen Bedingungen sowie nach beta-adrenerger Stimulation unverändert zu scheinoperierten Mäusen. Die Fasermessungen ergaben eine moderate Linksverschiebung der Kraft-Kalzium-Kurve, was auf eine tendenziell erhöhte, jedoch nicht signifikant veränderte Ca^{2+} -Sensitivität hinweist. Auch die passive Steifigkeit der Muskeln war unverändert zur Kontrollgruppe. Es zeigte sich insgesamt eine normale kontraktile Funktion im RM 9-12 Tage nach I/R. Im diabetischen Myokard war die Kraftentwicklung überraschenderweise erhöht, sowohl unter basalen Bedingungen als auch nach Stimulation mit Isoprenalin. Auch die Ca^{2+} -Sensitivität der db/db-Gruppe war gesteigert und es zeigte sich eine deutliche Linksverschiebung der Kraft-Kalzium-Kurve. Die passive Steifigkeit unterschied sich hingegen nicht signifikant von der nicht-diabetischen Kontrollgruppe. Aus den Daten kann abgeleitet werden, dass die erhöhte mechanische Belastung des RM nach I/R binnen 10 Tagen durch Anpassungsprozesse kompensiert und so die kontraktile Kraftentwicklung stabilisiert werden kann. Im diabetischen Myokard war die Ca^{2+} -Sensitivität der Myofilamente erhöht, was im isolierten Muskel sogar zu einer Überkompensation eines mutmaßlichen Kraftverlustes des db/db-Myokards führte und als adaptiver Prozess dem Auftreten einer diabetischen Kardiomyopathie entgegenwirken könnte.

Summary

After a myocardial infarction (MI), functional changes occur not only in the infarcted tissue, but also in the non-ischemic myocardium (remote myocardium, RM). Preliminary studies by the research group using a mouse model showed that the contractile function of the RM is already impaired 24 hours after ischemia and reperfusion (I/R). One aim of the present study was to investigate myocardial force development in the RM following the acute inflammatory phase of the myocardium, approximately 10 days after I/R. For this purpose, electrically stimulated papillary muscles from mice were analyzed in an organ bath 9-12 days after one hour of ligation of the left anterior descending coronary artery. Active force generation under β -adrenergic stimulation with isoproterenol and increasing preload was assessed. Additionally, calcium sensitivity and passive force were examined using Triton-skinned papillary muscle fibers. Since diabetes mellitus also leads to pathophysiological changes in the myocardium and functional loss in the form of cardiomyopathy, this study also investigated force development in papillary muscles of an established mouse model with a diabetic metabolic profile (db/db) compared to non-diabetic control animals (db/+). 9-12 days after I/R, papillary muscle force development under basal conditions and after β -adrenergic stimulation was unchanged compared to sham-operated mice. Fiber measurements showed a moderate leftward shift of the force-calcium curve, indicating a trend toward increased, but not significantly altered, calcium sensitivity. Passive stiffness of the muscles was also unchanged compared to the control group. Overall, normal contractile function was observed in the RM 9–12 days after I/R. In diabetic myocardium, force development was surprisingly increased, both under basal conditions and after isoproterenol stimulation. Calcium sensitivity in the db/db group was also elevated and a marked leftward shift of the force-calcium curve was observed. However, passive stiffness did not differ significantly from the non-diabetic control group. The data suggest that the increased mechanical load on the RM after I/R can be compensated within 10 days through adaptive processes, thereby stabilizing contractile force development. In diabetic myocardium, increased calcium sensitivity of the myofilaments led to an overcompensation of an assumed force deficit in db/db myocardium in isolated muscle, which might represent an adaptive mechanism counteracting the development of diabetic cardiomyopathy.

Abkürzungsverzeichnis

+dF/dt	Geschwindigkeit des Kraftanstiegs
-dF/dt	Geschwindigkeit des Kraftabfalls
°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
AC	Adenylatzyklase
<i>Aqua dest.</i>	destilliertes Wasser
ATP	Adenosintriphosphat
BDM	2,3-Butandionmonoxim
Ca²⁺	Kalzium
CaCl₂ * 2H₂O	Calciumchlorid-Dihydrat
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CO₂	Kohlenstoffdioxid
DAMPs	<i>danger-associated molecular patterns</i>
db/+	Leptinrezeptor-defiziente heterozygote Maus
db/db	Leptinrezeptor-defiziente homozygote Maus
DTT	Dithiothreitol
EKG	Elektrokardiogramm
F_{amp}	Kraftamplitude
F_{max}	maximale Kraft
g	Gramm
g/mol	Gramm pro Mol
G_s	stimulatorisches G-Protein
HCl	Salzsäure
Hz	Hertz
I/R	Ischämie/Reperfusion
IL	Interleukin
KCl	Kaliumchlorid
KHK	Koronare Herzkrankheit
l	Liter

LAD	linke vordere Herzkranzarterie
LANUV	Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz des Landes Nordrhein-Westfalen
MDa	Megadalton
mg	Milligramm
mg/dl	Milligramm pro Deziliter
mg/kg	Milligramm pro Kilogramm
MI	Myokardinfarkt
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mN	Millinewton
mN/mm²	Millinewton pro Quadratmillimeter
mN/s	Millinewton pro Sekunde
mol/l	Mol pro Liter
MRT	Magnetresonanztomographie
ms	Millisekunden
NaOH	Natronlauge
NCX	Natrium-Kalzium-Austauscher
nmol/l	Nanomol pro Liter
O₂	Sauerstoff
PCI	perkutane Koronarintervention
PKA	Proteinkinase A
PLN	Phospholamban
PMCA	sarkolemmale Kalzium-ATPase
RM	<i>remote</i> Myokard
RyR2	Ryanodin-Rezeptor 2
SEM	Standardfehler des Mittelwerts
SERCA	sarkoplasmatische Kalzium-ATPase
SR	sarkoplasmatisches Retikulum

TGF-β	<i>Transforming growth factor-β</i>
TLR	<i>toll-like-Rezeptoren</i>
TnC	Troponin C
TNF-α	Tumornekrosefaktor-alpha
TnI	Troponin I
TnT	Troponin T
T-Tubuli	transversale Tubuli
UE	Untereinheit
V/mA	Volt pro Milliampere
Vol.-%	Volumenprozent
wt	Wildtyp
ZETT	Zentrale Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben
β	Beta
β-AR	Beta-adrenerger Rezeptor
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Akuter Myokardinfarkt	1
1.1.1 Klinische Bedeutung.....	1
1.1.2 Infarkttheilung	3
1.1.3 Ischämisches Myokard	4
1.1.4 Veränderungen im <i>remote</i> Myokard.....	5
1.2 Kontraktion und Ca²⁺-Kreislauf der Kardiomyozyten.....	7
1.2.1 Kontraktiler Apparat und Querbrückenzyklus.....	7
1.2.2 Elektromechanische Kopplung.....	8
1.3 Regulation der kardialen Kontraktion	10
1.3.1 β -adrenerge Stimulation	10
1.3.2 Ca ²⁺ -Sensitivität.....	11
1.4 Titin und die passive Steifigkeit des Myokards	12
1.5 Diabetes mellitus	13
1.5.1 Epidemiologie, Klassifizierung und Pathophysiologie.....	13
1.5.2 Kardiovaskuläre Erkrankungen und diabetische Kardiomyopathie	14
1.5.3 Mausmodell für Diabetes mellitus Typ 2	15
1.6 Ziele der Arbeit	17
2 Material und Methoden	18
2.1 Material	18
2.1.1 Versuchstiere	18
2.1.2 Chemikalien.....	19
2.1.3 Lösungen.....	20
2.1.4 Verbrauchsmaterial.....	21
2.1.5 Laborgeräte	22
2.1.6 Software.....	23
2.2 Methoden	23
2.2.1 Induktion eines Myokardinfarktes	23
2.2.2 Kraftmessungen am Organbad	26
2.2.2.1 Versuchsaufbau Organbad	26
2.2.2.2 Physiologische Nährlösung.....	30
2.2.2.3 Organentnahme und Präparation.....	30

2.2.2.4 Versuchsprotokoll	32
2.2.3 Kraftmessungen gehäuteter Muskelfasern.....	36
2.2.3.1 Gewinnung und Lagerung des vorderen Papillarmuskels.....	36
2.2.3.2 Häutungsvorgang und Präparation der Muskelfasern	37
2.2.3.3 Versuchsaufbau der Fasermessapparatur	38
2.2.3.4 Versuchslösungen.....	41
2.2.3.5 Aktive Kraftmessungen.....	42
2.2.3.6 Passive Kraftmessungen.....	44
2.3 Statistische Auswertung	45
3 Ergebnisse	46
3.1 remote Myokard nach I/R	46
3.1.1 Kraftmessungen isolierter Papillarmuskeln am Organbad	46
3.1.1.1 Basale Bedingungen.....	46
3.1.1.2 β -adrenerge Rezeptor-Stimulation mit Isoprenalin	49
3.1.1.3 Erhöhung der Vorspannung	54
3.1.2 Aktive Kraftmessungen an gehäuteten Muskelfasern	58
3.1.2.1 Ca^{2+} -Sensitivität	59
3.1.2.2 Maximale aktive Kraftentwicklung.....	60
3.1.3 Passive Kraftmessungen an gehäuteten Muskelfasern	61
3.2 Diabetisches Myokard	62
3.2.1 Kraftmessungen isolierter Papillarmuskeln am Organbad	63
3.2.1.1 Basale Bedingungen.....	63
3.2.1.2 β -adrenerge Rezeptor-Stimulation mit Isoprenalin	66
3.2.1.3 Erhöhung der Vorspannung	70
3.2.2 Aktive Kraftmessungen an gehäuteten Muskelfasern	74
3.2.2.1 Ca^{2+} -Sensitivität	74
3.2.2.2 Maximale aktive Kraftentwicklung.....	76
3.2.3 Passive Kraftmessungen an gehäuteten Muskelfasern	77
4 Diskussion.....	79
4.1 remote Myokard nach I/R	79
4.1.1 Unveränderte Kontraktilität des <i>remote</i> Myokards nach I/R.....	79
4.1.2 Unveränderte Kontraktilität des <i>remote</i> Myokards nach I/R nach β -adrenerger Rezeptor-Stimulation.....	80

4.1.3 Unveränderte Kontraktilität des <i>remote</i> Myokards nach I/R bei zunehmender Vorspannung.....	82
4.1.4 Unveränderte Ca ²⁺ -Sensitivität des <i>remote</i> Myokards nach I/R.....	83
4.1.5 Tendenziell erhöhte passive Steifigkeit des <i>remote</i> Myokards nach I/R.....	84
4.2 Diabetisches Myokard	85
4.2.1 Gesteigerte Kontraktilität des diabetischen Myokards	85
4.2.2 Gesteigerte Kontraktilität des diabetischen Myokards nach β-adrenerger Rezeptor-Stimulation.....	87
4.2.3 Tendenziell verringerte Kontraktilität des diabetischen Myokards bei zunehmender Vorspannung	88
4.2.4 Erhöhte Ca ²⁺ -Sensitivität des diabetischen Myokards	89
4.2.5 Unveränderte passive Steifigkeit des diabetischen Myokards.....	91
4.3 Kritische Beurteilung der verwendeten Tiermodelle und Methoden	93
4.3.1 Myokardiale Ischämie und Reperfusion im Mausmodell.....	93
4.3.2 Diabetes mellitus Typ 2 im Mausmodell.....	94
4.3.3 Kraftmessungen am Organbad	95
4.3.4 Kraftmessungen gehäuteter Muskelfasern.....	96
4.4 Schlussfolgerungen	97
4.5 Ausblick	98
5 Literaturverzeichnis	100

1 Einleitung

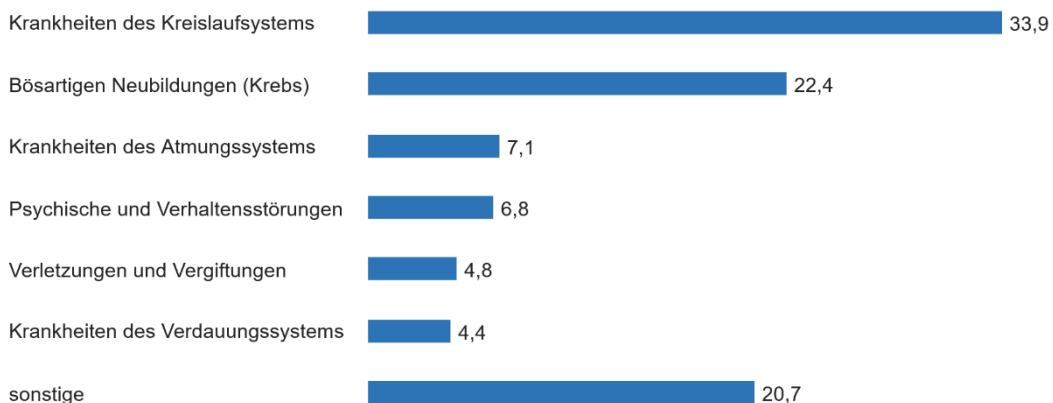
1.1 Akuter Myokardinfarkt

1.1.1 Klinische Bedeutung

Herz-Kreislauf-Erkrankungen verursachten im Jahr 2022 19,8 Millionen Sterbefälle und stellten damit weltweit die führende Todesursache dar (1). Auch in Deutschland führen die Herz-Kreislauf-Erkrankungen die Liste der Todesursachen an und waren im Jahr 2023 mit 348.312 Toten (2) für ca. ein Drittel aller Sterbefälle (33,9 %) verantwortlich (siehe Abbildung 1 [Abb.]) (3). Dazu gehört der akute Myokardinfarkt (MI), an dem laut Bericht des Statistischen Bundesamtes im Jahr 2023 43.839 Menschen verstarben (2).

Todesursachen nach Krankheitsarten 2023

in %



© Statistisches Bundesamt (Destatis), 2025

Abb. 1: Todesursachen nach Krankheitsarten 2023. Quelle: © Statistisches Bundesamt (Destatis), 2025 (3). Die Abbildung zeigt die Todesursachen nach Krankheitsarten in Deutschland in Prozent. Krankheiten des Kreislaufsystems machen 33,9 % aller Todesursachen aus und führen damit die Liste an.

Im Verlauf der Jahre zeigte sich eine Abnahme der Mortalität nach MI in Deutschland. Es wird angenommen, dass die Abnahme der Sterblichkeit mitunter durch Verbesserungen in Prävention, Therapie und Rehabilitation begründet ist (4).

Ein Myokardinfarkt ist definiert als Nekrose eines umschriebenen Myokardareals aufgrund einer Ischämie (5). Ursächlich ist ein Verschluss einer Koronararterie, zumeist als Folge einer fortgeschrittenen Atherosklerose (6). Die Atherosklerose ist eine Erkrankung des arteriellen Gefäßsystems, die hauptsächlich mittelgroße und große Gefäße betrifft (7). Die

Erkrankung schreitet langsam voran und führt allmählich zur arteriellen Lumeneinengung. Im Laufe der Zeit kommt es zunächst zur Akkumulation von Lipiden in der Gefäßwand und eine Entzündungsreaktion wird ausgelöst (8). Durch die fortschreitende Einlagerung von Lipiden und stattfindenden nekrotischen Prozessen wird die Architektur der inneren Gefäßwand (Intima) zerstört. Die Lipideinlagerungen formieren sich zu sogenannten Lipidkernen. Durch fibrotisches Gewebe entsteht eine fibröse Kappe, die den Lipidkern bedeckt. Eine atherosklerotische Plaque ist entstanden (9). Atherosklerotische Plaques können zur Einengung des Lumens (Stenosen) führen (10). Manifestiert sich die Atherosklerose an den Herzkranzgefäßen, wird dies als koronare Herzkrankheit (KHK) bezeichnet. Hierbei können Stenosen an den Koronararterien den Blutfluss limitieren und zur verminderten Versorgung des Myokards mit Sauerstoff führen (11). Wichtige Risikofaktoren für die Entwicklung einer KHK sind Hypertension, Rauchen, Diabetes, erhöhte Cholesterinspiegel, Übergewicht oder Adipositas, mangelnde körperliche Aktivität, ungesunde Ernährung und Stress sowie Geschlecht, Alter und Familiengeschichte (12). Im Rahmen einer KHK kann ein Myokardinfarkt auftreten (11). Dieser kann durch eine Plaqueruptur entstehen. Dabei reißt die fibröse Kappe der atherosklerotischen Plaque ein und der Lipidkern mit seinem thrombogenen Material wird freigelegt. Dieser kommt mit Blutbestandteilen in Kontakt und die Blutgerinnung wird aktiviert. Es bildet sich ein Thrombus aus, der das Gefäß okkludieren kann. Ein MI ist die Folge (6).

Leitsymptom eines Myokardinfarkts ist der akut auftretende, anhaltende Brustschmerz (Angina pectoris), der in Hals, Unterkiefer, linke Schulter sowie linkem Arm ausstrahlen kann. Begleitend können vegetative Symptome wie Schwitzen, Erbrechen und Übelkeit auftreten (13). Zum Teil treten keinerlei Schmerzen auf und der Infarkt verläuft stumm. Dies ist insbesondere bei Diabetikern der Fall (14).

Die Therapie des Myokardinfarkts stützt sich auf Maßnahmen der Reperfusion. Ziel ist es, die Okklusion des betroffenen Gefäßes zu beseitigen und eine Reperfusion des Myokards herzustellen (15). Dabei ist die Zeit, bis der Patient einer Reperfusionstherapie zugeführt wird, entscheidend (16, 17). Durch eine schnelle Reperfusion kann die Infarktgröße reduziert (16) und die klinische Prognose des Patienten verbessert werden (17).

Nach einem Myokardinfarkt können Komplikationen auftreten, die zum Tod des Patienten führen können. Dabei kommt es in der frühen Phase häufig zu Herzrhythmusstörungen und Patienten entwickeln eine akute Herzinsuffizienz mit Pumpversagen des Herzens (18). Eine Herzinsuffizienz kann auch als Spätkomplikation auftreten und sich erst im weiteren Verlauf

entwickeln (19). Relevant sind hier vor allem Prozesse im ischämischen und nicht-ischämischen Myokard, die entscheidenden Einfluss auf die Herzleistung nach MI haben (siehe Kapitel 1.1.4) (20).

1.1.2 Infarktheilung

Durch Verschluss einer Koronararterie kommt es zur Ischämie im jeweiligen Versorgungsgebiet und so zum Zelltod von Kardiomyozyten (Herzmuskelzellen) (21). Nach einem MI kommt es zur Reparatur des ischämischen Myokards und das geschädigte Gewebe wird durch eine Narbe ersetzt. Dieser Umbauprozess kann in drei Phasen unterteilt werden, die fließend ineinander übergehen (22). Es lassen sich die inflammatorische (Tag 1-3), die proliferative (Tag 3-10) und die Reifungsphase (> Tag 10) unterscheiden (23). Dabei ist jede Phase durch spezifische pathophysiologische Vorgänge und unterschiedlich vorherrschende Zelltypen gekennzeichnet (22). Die einzelnen Phasen werden im Folgenden beschrieben.

- Inflammatorische Phase: In der inflammatorischen Phase stehen das Auslösen einer Entzündungsreaktion und das Einwandern von Immunzellen im Vordergrund (22).

Durch Nekrose der Kardiomyozyten werden intrazelluläre Bestandteile der Zellen freigesetzt und dadurch eine inflammatorische Reaktion initiiert. Dabei werden sogenannte *danger-associated molecular patterns* (DAMPs) freigesetzt, die als Gefahrensignale (*danger signals*) wirken und durch Bindung an *toll-like*-Rezeptoren (TLR) intrazelluläre Signalkaskaden auslösen (24). Dies führt zur Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen wie Interleukin-1 β (IL), Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α) und IL-6 sowie von Chemokinen. Daraus folgt eine vermehrte Expression von endothelialen Adhäsionsmolekülen und Leukozyten wandern vom Blut in das infarzierte Gewebe ein. Dabei werden neutrophile Granulozyten und auch Monozyten rekrutiert, welche sich im ischämischen Gewebe teilweise von Monozyten zu Makrophagen ausdifferenzieren. (25)

Die Immunzellen sind entscheidend am Abräumen von toten Zellen und Überresten der extrazellulären Matrix beteiligt (4, 5). Hierfür setzen die neutrophilen Granulozyten proteolytische Enzyme und reaktive Sauerstoffspezies frei (25). Die Makrophagen können nekrotische Zellen phagozytieren (26). Die inflammatorische Reaktion führt damit durch Rekrutierung von Leukozyten zur Beseitigung von Zell- und Gewebetrümmern und bildet die Grundlage für den Ablauf der proliferativen Phase (25).

- Proliferative Phase: Nach Bereinigung des infarzierten Gewebes folgt die proliferative Phase und die inflammatorische Reaktion wird supprimiert (22). Dies wird mitunter durch Makrophagen vermittelt, die apoptotische neutrophile Granulozyten phagozytieren und dadurch antiinflammatorische Zytokine wie IL-10 und *Transforming growth factor-β* (TGF-β) ausschütten (25).

Ein weiterer wichtiger Vorgang in dieser Phase ist die Proliferation von Fibroblasten und deren Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten (27). Myofibroblasten produzieren strukturelle Proteine wie Kollagen und Fibronektin sowie matrizelluläre Proteine, die gemeinsam die extrazelluläre Matrix erhalten (28). Ein neu gebildetes Gefäßnetzwerk bildet die Grundlage für eine optimale Infarktheilung und dient der Versorgung mit Sauerstoffen und Nährstoffen. Am Ende der proliferativen Phase liegt ein Granulationsgewebe im Infarktgebiet vor, das der weiteren Ausreifung unterliegt (22).

- Reifungsphase: In der Reifungsphase finden weitere Alterationen in der strukturellen und zellulären Zusammensetzung des Gewebes statt und das Granulationsgewebe wird allmählich durch eine kollagenreiche Narbe ersetzt (22). Dabei kommt es zur vermehrten Quervernetzung des Kollagens (29) und die Myofibroblasten gehen in Apoptose (22). Der Prozess der Infarktheilung kann beim Menschen mehrere Wochen in Anspruch nehmen und umfasst einen Zeitraum von mindestens fünf bis sechs Wochen (30). Am Ende der Reifungsphase liegt eine kollagenfaserhaltige Narbe vor (22).

1.1.3 Ischämisches Myokard

Beim Myokardinfarkt kommt es durch Verschluss einer Koronararterie zur Ischämie im Myokard (31). Die anhaltende Ischämie hat den Zelltod der Kardiomyozyten zur Folge. Dieser beginnt in den Innenschichten des Herzens und breitet sich allmählich transmural bis zu der äußeren Herzschicht aus (21). Nach einem Myokardinfarkt kommt es in der Regel zum Untergang von über 1 Billionen Kardiomyozyten (32). Die Zellen sterben durch Apoptose und Nekrose (33).

Der Verschluss des Gefäßes hat die Unterbrechung der Blutversorgung des jeweiligen Herzareals zur Folge und führt zur Unterversorgung des Myokards mit Sauerstoff und Nährstoffen. Darüber hinaus sammeln sich Stoffwechselendprodukte an, die nicht abtransportiert werden können (31). Aufgrund des Sauerstoffmangels verschiebt sich die Energiegewinnung von der oxidativen Phosphorylierung zur anaeroben Glykolyse. Es fällt

Laktat an und der intrazelluläre pH reduziert sich (34). Es entsteht ein Mangel an ATP (Adenosintriphosphat) (34) und die Zellen werden mit Natrium und Kalzium (Ca^{2+}) überladen (35). Durch die intrazelluläre Ansammlung von Natrium und Abbauprodukten schwellen die Zellen an. Zuletzt werden apoptotische und nekrotische Signalwege aktiviert, die den Zelltod auslösen (31). Aber nicht nur die Ischämie trägt zum Zelltod von Kardiomyozyten nach MI bei (36). Die Thrombolyse und die perkutane Koronarintervention (*percutaneous coronary intervention* [PCI]) sind therapeutische Maßnahmen bei einem MI, die eine Wiederherstellung des Blutflusses erzielen können (37). So kann die Ischämie limitiert (31) und damit die Infarktgröße reduziert werden (37). Jedoch führt auch die Reperfusion selbst zur Schädigung des Myokards und resultiert im weiteren Untergang von Kardiomyozyten (36, 37). Dies wird als Reperfusionsschaden bezeichnet (36, 37). Es wird angenommen, dass die Reperfusion des Myokards für 50 % der finalen Infarktgröße verantwortlich ist (37).

1.1.4 Veränderungen im *remote* Myokard

Durch den infarktbedingten Zellverlust kommt es zu Umbauvorgängen im ischämischen Bereich des Myokards, die unter dem Begriff *Remodeling* zusammengefasst werden können (38). Neben den Prozessen im Infarktareal finden jedoch auch im *remote* Myokard, dem nicht ischämischen Bereich des Myokards, Veränderungen statt (39). Diese Anpassungsmechanismen dienen grundsätzlich der Aufrechterhaltung der Herzleistung und kompensieren den Verlust des ischämischen Herzmuskelgewebes (20). Dabei sind die stattfindenden Prozesse nicht nur vorteilhaft, sondern können langfristig im Sinne eines maladaptiven *Remodelings* die Entwicklung einer Herzinsuffizienz fördern (39, 40).

Die Umbauvorgänge sind durch Fibrose (41), Hypertrophie und Dilatation (38) gekennzeichnet. Reguliert werden diese unter anderem durch neurohumorale Aktivierung und hämodynamische Faktoren (40).

Im Rahmen des *Remodelings* nach Myokardinfarkt kann es zur Ausdünnung und Dilatation des Infarktareals kommen und die systolische und diastolische Wandspannung steigt an (38). Die erhöhte Belastung des Herzens bewirkt eine kompensatorische Hypertrophie des nicht-infarzierten Myokards (20). Die Hypertrophie der Kardiomyozyten reduziert die Wandspannung und dient dem Erhalt einer ausreichenden Pumpfunktion (42). Auf lange Sicht ist die Hypertrophie des *remote* Myokards zur Kompensation jedoch unzureichend. Es kommt zur weiteren Dilatation des Ventrikels (20). In einer epidemiologischen Studie erwies

sich eine linksventrikuläre Hypertrophie als Risikofaktor für kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität (43). Auch das Auftreten eines plötzlichen Herztods ist mit einem hypertrophierten Myokard assoziiert (44).

Darüber hinaus findet im Infarktareal im Rahmen der Infarktheilung eine reparative Fibrosierung statt, die der Ausbildung einer Narbe dient. Die Fibrose führt zur Stabilisierung der Ventrikelwand und verhindert ihre Ruptur. Die Fibrosierung beschränkt sich jedoch nicht auf das Infarktgebiet und so kommt es im *remote* Myokard zur reaktiven, interstitiellen Fibrose. Die zunehmende Fibrose im *remote* Myokard bedingt eine Versteifung des Ventrikels und hat so eine Beeinträchtigung der kardialen Funktion zur Folge (45). Des Weiteren wirkt sich die Fibrose auf die elektrische Reizweiterleitung aus und fördert das Auftreten von Arrhythmien (46). Die strukturellen Veränderungen im *remote* Myokard stellen zunächst adaptive Prozesse im Rahmen des *Remodelings* dar, können aber langfristig zur Abnahme der Herzleistung führen und den Übergang in eine Herzinsuffizienz begünstigen (39, 40).

Neben diesen strukturellen Alterationen kommt es auch auf molekularer Ebene zu Veränderungen in den Kardiomyozyten. Ein zentraler Aspekt ist der gestörte Ca^{2+} -Kreislauf nach MI (47). Ca^{2+} spielt bei der Regulation der Muskelkontraktion eine entscheidende Rolle (48), was in den folgenden Kapiteln näher erläutert wird. Es hat sich gezeigt, dass im *remote* Myokard 24 h nach MI ein beeinträchtigter Ca^{2+} -Kreislauf vorliegt. So konnte in den Kardiomyozyten ein gestörter Ca^{2+} -Transport beobachtet werden, der mit geringeren Ca^{2+} -Transienten und reduzierten Geschwindigkeiten des zytosolischen Ca^{2+} -Anstiegs und -Abfalls einherging. Als Ursache wurde eine verringerte Phosphorylierung des Phospholambans (PLN), ein Ca^{2+} -regulierendes Protein (siehe Kapitel 1.3.1), identifiziert. Insgesamt waren die Veränderungen im Ca^{2+} -Kreislauf mit einer verminderten Kontraktionskraft assoziiert (47).

Abschließend zeigt sich, dass die Prozesse im *remote* Myokard entscheidend sind für die Herzfunktion nach Myokardinfarkt. Ein besseres Verständnis der ablaufenden Mechanismen im *remote* Myokard könnte maßgeblich sein, um Behandlung und Prognose von Patienten nach Myokardinfarkt zu verbessern. Dazu gehören Erkenntnisse über die Kraftentwicklung im *remote* Myokard.

1.2 Kontraktion und Ca^{2+} -Kreislauf der Kardiomyozyten

1.2.1 Kontraktiler Apparat und Querbrückenzyklus

Die Kontraktilität des Myokards wird maßgeblich durch die Herzmuskelzellen, den sogenannten Kardiomyozyten, bestimmt. Die Kardiomyozyten sind untereinander verzweigt und bestehen aus einem Bündel von Myofibrillen. Die Myofibrillen sind aus aneinandergereihten Sarkomeren aufgebaut (49). Das Sarkomer ist die kleinste kontraktile Einheit im Herzmuskel (Abb. 2) (50). Dieses wiederum besteht aus den Myofilamenten, Aktin und Myosin. Aktin und Myosin sind zueinander regelmäßig angeordnet, sodass eine Querstreifung entsteht. Aktin wird auch als dünnes Filament bezeichnet und wird durch Verankerung an der Z-Scheibe in Position gehalten. Das dicke Filament, Myosin, ist in der M-Bande verankert und über Titin elastisch mit der Z-Scheibe verbunden. Titin ist ein großes Molekül, das sich von der Z-Scheibe bis zur M-Bande erstreckt und relevant ist für die Steifigkeit bzw. Dehnbarkeit des Sarkomers (51). Ein Sarkomer erstreckt sich von Z-Scheibe zu Z-Scheibe. In der Mitte des Sarkomers befindet sich die M-Bande (49). Die A-Bande umfasst den Bereich, in dem Aktin- und Myosinfilamente überlappen (51).

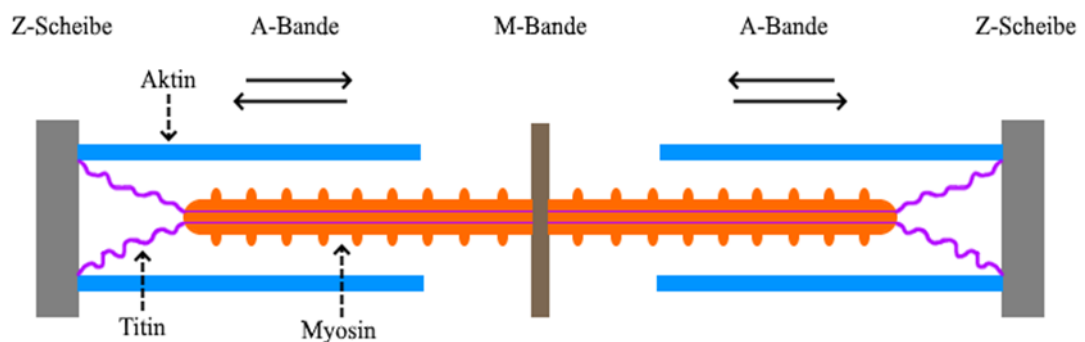


Abb 2: Schematischer Aufbau eines Sarkomers. Ein Sarkomer wird von zwei Z-Scheiben begrenzt. Das dünne Filament, Aktin, ist in der Z-Scheibe verankert, Myosin als dickes Filament in der M-Bande, in der Mitte des Sarkomers. Titin verbindet Myosin elastisch mit der Z-Scheibe und erstreckt sich insgesamt von der Z-Scheibe bis zur M-Bande. Aktin- und Myosinfilamente überlappen im Bereich der A-Banden (49, 51).

Angelagert an das Aktinfilament sind die Proteine Troponin und Tropomyosin. Der Troponinkomplex besteht aus den drei Untereinheiten (UE), Troponin C (Ca^{2+} -bindende UE; TnC), Troponin I (inhibitorische UE; TnI) und Troponin T (Tropomyosin-assoziierte UE; TnT) (49). Das Myosinfilament verfügt über Myosinköpfe, die seitlich über das Filament

herausragen und über eine Bindungsstelle für Aktin verfügen. Dies macht eine Interaktion von dicken und dünnen Filamenten möglich (51).

Bei der Kontraktion gleiten Myosin und Aktin aneinander vorbei und es kommt zur Verkürzung des Sarkomers. Auslöser ist der Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration im Zytosol der Kardiomyozyte (51) (siehe Kapitel 1.2.2). Ca^{2+} bindet an die TnC Untereinheit des Troponins und führt zu dessen Konformationsänderung (52). Dies ändert die Affinität von TnC und TnI, sodass TnI stärker gebunden wird. Dabei werden am Aktin Bindungsstellen für die Myosinköpfe frei und die Interaktion von Aktin und Myosin wird ermöglicht (48). Der Querbrückenzyklus kann ablaufen (49). Dabei kommt es zum Abknicken der Myosinköpfe und Aktin und Myosinfilamente werden gegeneinander verschoben, wobei ATP verbraucht wird. Durch mehrfache Wiederholung dieser Kippbewegung wird Aktin immer weiter in Richtung Sarkomermitte gezogen. Das Sarkomer verkürzt sich und es kommt zur Kontraktion (52).

Der Abfall von Ca^{2+} im Zytosol der Kardiomyozyte führt zur Relaxation. Ca^{2+} löst sich vom TnC und die Myosinbindungsstellen am Aktin werden blockiert. Dies verhindert die weitere Interaktion von Aktin- und Myosinfilamenten (49).

1.2.2 Elektromechanische Kopplung

Die Übersetzung einer elektrischen Erregung in eine mechanische Muskelkontraktion bezeichnet man als elektromechanische Kopplung (53). Ca^{2+} spielt dabei eine entscheidende Rolle in der Signalübertragung. Auch im Herzmuskel sind Ca^{2+} -Ströme bei der elektromechanischen Kopplung relevant (48). Der kardiomyozytäre Ca^{2+} -Kreislauf ist in Abb. 3 schematisch dargestellt.

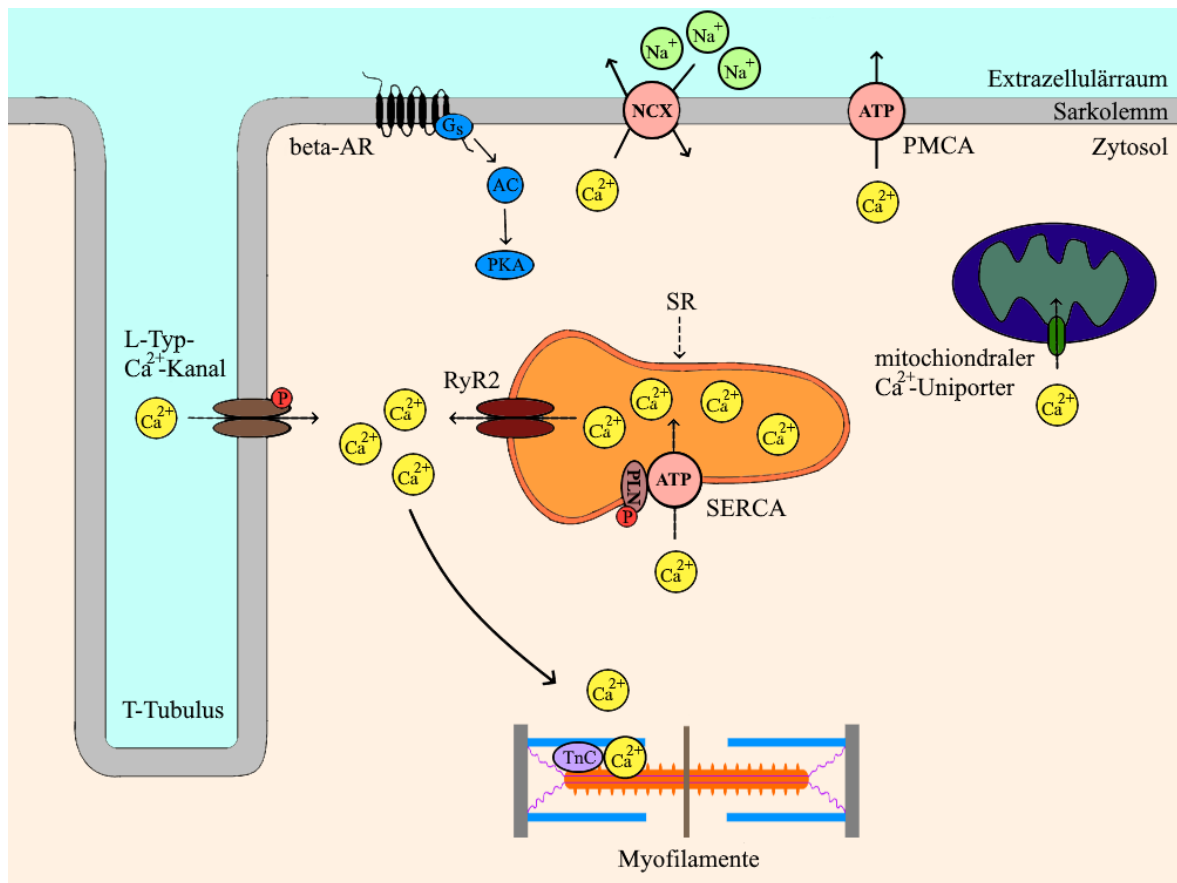


Abb 3: Schematische Darstellung des kardiomyozytären Ca^{2+} -Kreislaufs. AC = Adenylatzyklase; ATP = Adenosintriphosphat; beta-AR = beta-adrenerger Rezeptor; Ca^{2+} = Kalziumion; G_s = stimulatorisches G-Protein; Na^+ = Natriumion; NCX = Natrium-Kalzium-Austauscher; P = Phosphat; PKA = Proteinkinase A; PLN = Phospholamban; PMCA = *plasma membrane calcium ATPase*; RyR2 = Ryanodin-Rezeptor 2; SERCA = *sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase*; SR = sarkoplasmatisches Retikulum

Die Kardiomyozyten bilden zusammen ein funktionelles Synzytium, indem sie über Gap Junctions miteinander in Verbindung stehen. Diese dienen der Weiterleitung der elektrischen Signale von Zelle zu Zelle. Die Zellen verfügen über Einstülpungen der Plasmamembran (Sarkolemm), die transversalen Tubuli (T-Tubuli), die eine Fortleitung des Aktionspotentials ins Zellinnere möglich machen. Das sarkoplasmatische Retikulum (SR) hingegen ist longitudinal ausgerichtet und steht über die terminalen Zisternen mit den T-Tubuli in engem Kontakt. In der Zellmembran der T-Tubuli befinden sich die Dihydropyridinrezeptoren. Dies sind Ca^{2+} -Kanäle vom L-Typ (49). Kommt es zur Depolarisation der Zellmembran durch ein Aktionspotential, öffnen sich diese, was den Einstrom von Ca^{2+} ins Zytosol bewirkt (54). In unmittelbarer Nähe, gegenüber der L-Typ Ca^{2+} -Kanäle, befinden sich die Ryanodin-Rezeptoren 2 (RyR2) in der Membran des SR (55). Durch das einströmende Ca^{2+} werden die RyR2 aktiviert und setzen Ca^{2+} aus dem Speicher des SR frei (56). Es kommt zur Ca^{2+} -induzierten Ca^{2+} -Freisetzung und die Ca^{2+} -

Konzentration im Zytosol erhöht sich von 10^{-7} Mol pro Liter (mol/l) auf 10^{-5} mol/l (53). Das nun intrazellulär vorliegende Ca^{2+} bindet an TnC und führt durch Umlagerung zur Freigabe des Querbrückenzyklus, wodurch es zur Kontraktion kommt (siehe Kapitel 1.2.1). Um die Relaxation einzuleiten, muss die Ca^{2+} -Konzentration wieder auf unter 10^{-7} mol/l sinken und Ca^{2+} aus dem Zytosol eliminiert werden (49). Dafür wird ein Großteil der Kalziumionen, ca. 70 %, über die sarkoplasmatische Kalzium-ATPase (*sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase* [SERCA]) ins SR wiederaufgenommen. Der Natrium-Kalzium-Austauscher (NCX) befördert Ca^{2+} im Austausch von Natrium in den Extrazellulärraum. Darüber hinaus wird ein geringer Anteil des Ca^{2+} über die sarkolemmale Kalzium-ATPase (*plasma membrane calcium ATPase* [PMCA]) und einem mitochondrialen Ca^{2+} -Uniporter aus dem Zytosol entfernt (54).

1.3 Regulation der kardialen Kontraktion

1.3.1 β -adrenerge Stimulation

Die Menge an intrazellulär vorliegendem Ca^{2+} bestimmt die Kontraktionskraft. Durch Änderung der Ca^{2+} -Konzentration im Zytoplasma kann die Kontraktilität moduliert und die Herzleistung den jeweiligen Erfordernissen des Organismus angepasst werden. Beta (β)-adrenerge Signale führen dazu, dass die kardiale Pumpfunktion kurzfristig einem steigenden Bedarf angepasst wird und sich die kardiale Kontraktionskraft des Herzens erhöht (49).

Katecholamine binden dabei an die kardialen G-Protein-gekoppelten Beta-adrenergen Rezeptoren (β -AR), stimulieren diese und führen zum Ablauf einer Signalkaskade (Abb. 3). Über das stimulatorische G-Protein (G_s) wird die Adenylatzyklase (AC) aktiviert und cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP) vermehrt gebildet. cAMP ist ein sekundärer Botenstoff, der die Proteinkinase A (PKA) aktiviert. Die PKA phosphoryliert Schlüsselproteine mit Funktion im kardiomyozytären Kontraktionsvorgang und wirkt so regulierend auf Kontraktion und Relaxation (57, 58). Dazu gehören die sarkolemmalen L-Typ Ca^{2+} -Kanäle. Werden diese von der PKA phosphoryliert, kommt es zum erhöhten Ca^{2+} -Einstrom und folglich zum Anstieg der Kontraktionskraft (positiv inotrope Wirkung) (59, 60). Darüber hinaus bewirkt eine β -adrenerge Stimulation auch eine beschleunigte Relaxation des Herzmuskels (57). Vermittelt wird der positiv lusitrope Effekt durch die Phosphorylierung von PLN durch die PKA (61, 62). PLN kann als Regulator der SERCA-Aktivität betrachtet werden. Im unphosphorylierten Zustand inhibiert PLN die SERCA-Aktivität (63). Wird PLN phosphoryliert, wird die inhibitorische Wirkung des PLN auf die

SERCA aufgehoben (63) und die Ca^{2+} -Aufnahme in das SR gesteigert (64). Bei β -adrenerger Stimulation und Phosphorylierung von PLN durch die PKA ist dies mit einer beschleunigten Relaxationsgeschwindigkeit assoziiert (61, 62).

Zusammenfassend kommt es nach Sympathikusaktivierung und folgender β -adrenerger Stimulation zur Steigerung der Kontraktionskraft und beschleunigten Relaxation des Herzmuskels.

1.3.2 Ca^{2+} -Sensitivität

Zuvor wurde bereits beschrieben, dass eine erhöhte zytoplasmatische Ca^{2+} -Konzentration mit einer erhöhten Kraftentwicklung des Muskels einhergeht (49). Änderungen der Kontraktionskraft sind aber nicht nur abhängig von der absoluten Menge an Ca^{2+} im Zytosol, sondern auch von der Sensitivität der Myofilamente für Ca^{2+} (65). Bei gegebener Ca^{2+} -Konzentration kann die Kraftentwicklung daher durch Änderungen der Ca^{2+} -Sensitivität variieren (66). Eine erhöhte Ca^{2+} -Sensitivität bedingt eine gesteigerte Kontraktilität des Muskels, gleichzeitig kann jedoch auch die Relaxation erschwert sein, da Ca^{2+} sich langsamer vom Troponin C löst (67). Faktoren, die Einfluss auf die Ca^{2+} -Sensitivität nehmen sind unter anderem die Sarkomerlänge (68, 69), der pH-Wert (70) und die Phosphorylierung von Proteinen des Sarkomers (71, 72).

Es wurden bereits die β -adrenergen Signalwege dargestellt, die die Kontraktion und Relaxation des Herzmuskels maßgeblich beeinflussen. Durch β -adrenerge Stimulation wird auch die Ca^{2+} -Sensitivität des Herzens moduliert. So kommt es durch Phosphorylierung des kardialen Troponin I durch die PKA zur Reduktion der Ca^{2+} -Sensitivität der Myofilamente. Die Dissoziation von Ca^{2+} vom Troponin C wird erleichtert und trägt zu einer beschleunigten Relaxation bei (73). Des Weiteren bedingt eine erhöhte Sarkomerlänge eine Zunahme der Ca^{2+} -Sensitivität (68, 69). Es wird angenommen, dass dies mitunter beim Frank-Starling-Mechanismus eine Rolle spielt (74). Dabei kommt es bei Dehnung des Muskels zur Steigerung der Kraftentwicklung. Dieser Mechanismus ist insbesondere bei einer zunehmenden Ventrikelfüllung relevant (67).

Zusammenfassend zeigt sich, dass die Ca^{2+} -Sensitivität der Myofilamente maßgeblichen Einfluss auf Kontraktion und Relaxation des Herzmuskels hat und auf unterschiedliche Art und Weise moduliert wird.

1.4 Titin und die passive Steifigkeit des Myokards

Zuvor wurde bereits beschrieben, wie Aktin- und Myosinfilamente im Rahmen des Querbrückenzyklus interagieren und dadurch zur Kontraktion des Muskels führen (siehe Kapitel 1.2.1). Diese aktive Kraftentwicklung ist von der passiven Kraftentwicklung des Muskels zu unterscheiden. Diese wird bei physiologischen Sarkomerlängen vorrangig durch ein drittes Filament im Sarkomer vermittelt, das Titin (75, 76).

Titin ist das größte bekannte menschliche Protein (77). Sowohl in Herz- als auch Skelettmuskel ist Titin Teil des Sarkomers (78) und erstreckt sich von der Z-Scheibe bis zur M-Bande (75). Es wird durch ein einziges Gen auf Chromosom 2 codiert, welches 363 Exons umfasst (79). Durch alternatives Spleißen entstehen verschiedene muskelspezifische Isoformen des Titinmoleküls. Im Herzmuskel wird die kurze, steifere N2B (ca. 3 Megadalton [MDa]) und die lange, elastischere N2BA-Isoform (ca. 3,3 MDa) exprimiert (75). Das Verhältnis in der Expression der beiden kardialen Isoformen ist nicht nur speziesspezifisch, sondern auch abhängig von der Lokalisation innerhalb des Herzmuskels (80).

Funktionell sind vor allem die elastischen Eigenschaften des Titins entscheidend, die die passive Steifigkeit des Myokards wesentlich beeinflussen (81). Titin verfügt über eine elastische Region in der I-Bande des Sarkomers, die wie eine molekulare Feder fungiert (82, 83). Wird das Sarkomer gedehnt, entsteht eine passive Spannung bzw. Kraft, die der weiteren Dehnung des Sarkomers entgegenwirkt (83). Die passive Spannung ist insbesondere für die diastolische Funktion des Herzmuskels relevant und beeinflusst so die Ventrikelfüllung und das Schlagvolumen (76). Titin spielt in diesem Zusammenhang auch beim Frank-Starling-Mechanismus (siehe Kapitel 1.3.2) eine zentrale Rolle: Bei erhöhter Vordehnung nimmt die Titin-vermittelte passive Spannung zu, wodurch die Kraftentwicklung im Rahmen der längenabhängigen Aktivierung gefördert wird (84, 85). Neben Titin ist auch Kollagen als Bestandteil der extrazellulären Matrix für die passive Steifigkeit von Herzmuskelfasern verantwortlich (76).

Titin übernimmt zusätzlich zu seinen elastischen Eigenschaften auch eine strukturgebende Funktion. So sorgt Titin für Stabilität und garantiert durch die Positionierung von Myosin im Zentrum des Sarkomers eine optimale aktive Kraftentwicklung (81, 86).

Die durch Titin vermittelte Elastizität ist variabel und kann sowohl unter physiologischen Bedingungen als auch im Rahmen von Erkrankungen des Herzens moduliert werden. Eine Möglichkeit besteht in der Änderung des Expressionsverhältnisses der beiden kardialen

Isoformen. So zeigt sich beispielsweise bei Herzinsuffizienzen mit systolischer Dysfunktion ein höherer Anteil der elastischeren N2BA-Isoform und die kardiale passive Steifigkeit nimmt ab. Kurzfristig können posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierung und Oxidation das Titinmolekül verändern. Diese Mechanismen haben allesamt Auswirkungen auf das Titinmolekül und bedingen Änderungen der passiven Steifigkeit des Myokards (81).

1.5 Diabetes mellitus

Herz-Kreislauf-Erkrankungen wie der Myokardinfarkt gelten als die führende Todesursache unter Diabetikern (87). Im Folgenden wird das Krankheitsbild des Diabetes mellitus näher beschrieben und die myokardialen Veränderungen, die im Rahmen einer diabetischen Kardiomyopathie auftreten, herausgestellt.

1.5.1 Epidemiologie, Klassifizierung und Pathophysiologie

Weltweit leben schätzungsweise mehr als 500 Millionen Menschen mit Diabetes (88). In den vergangenen Jahren zeigte sich weltweit eine stete Zunahme der Prävalenz und die Zahl der Betroffenen vervierfachte sich beinahe innerhalb von 1980 bis 2014 (89). Die *International Diabetes Federation* sagt voraus, dass die Zahl Betroffener sich im Jahre 2030 auf über 600 Millionen Menschen erhöhen wird (90). Im Jahr 2045 könnten es über 700 Millionen sein (88). Dies zeigt die enorme Relevanz der Erkrankung, die eine bedeutsame wirtschaftliche Belastung für das Gesundheitssystem darstellt (91, 92).

Der Diabetes mellitus beschreibt eine chronische Erkrankung des Stoffwechsels mit dem Symptom der Hyperglykämie, bedingt durch eine fehlerhafte Insulinsekretion und/oder Insulinwirkung. Es werden verschiedene Diabetesformen unterschieden: Dazu gehören der Diabetes mellitus Typ 1 und 2 (93). Der Diabetes mellitus Typ 1 ist charakterisiert durch einen autoimmunen Prozess, bei dem es zur Zerstörung der Insulin-produzierenden Betazellen im Pankreas kommt (90). Daraus resultiert ein absoluter Insulinmangel (90). Eine Insulintherapie ist daher für Patienten unverzichtbar und überlebenswichtig (94). Da die Erkrankung häufig in der Kindheit und jungem Erwachsenenalter auftritt (90), wurde der Diabetes mellitus Typ 1 früher als insulinabhängiger Diabetes oder auch juveniler Diabetes bezeichnet (94). Der Diabetes mellitus Typ 2, ehemals als Altersdiabetes oder nicht-insulinabhängiger Diabetes bezeichnet (93), ist der häufigste Diabetestyp und macht mehr als 90 % aller Diabetesfälle aus (90). Dieser ist gekennzeichnet durch eine Insulinresistenz. Das bedeutet, dass Körperzellen ein verringertes Ansprechen auf das Hormon Insulin zeigen. Kompensatorisch kommt es zur erhöhten Insulinproduktion. Im Verlauf kann die erhöhte

Produktion durch Versagen der Betazellen im Pankreas nicht aufrechterhalten werden (90). Neben einer familiären Prädisposition (95) sind vor allem Faktoren wie mangelnde Bewegung und Übergewicht in der Pathogenese relevant (96). Es sind vor allem ältere Erwachsene betroffen (97). Global zeigt sich in den letzten Jahren jedoch ein gehäuftes Auftreten von Diabetes Typ 2 im jungen Erwachsenen- und auch Kindesalter (98, 99).

Durch die andauernde Hyperglykämie beim Diabetes kann es zur Entwicklung von lebensbedrohlichen Folge- und Begleiterkrankungen kommen. Betroffen sind verschiedene Organsysteme wie Herz, Gefäße, Augen, Nieren und Nerven (100).

1.5.2 Kardiovaskuläre Erkrankungen und diabetische Kardiomyopathie

Der Diabetes mellitus geht mit einem erhöhten Risiko einher, eine kardiovaskuläre Erkrankung zu entwickeln (101). Sie gelten als die führende Todesursache unter Diabetikern (87). Dazu gehört der Myokardinfarkt, der bei Menschen mit Diabetes häufiger vorkommt als in der Allgemeinbevölkerung (102). Auch die Mortalitätsrate ist bei Diabetikern nach Myokardinfarkt erhöht (103). Neben dem Myokardinfarkt sind aber auch die Herzinsuffizienz (104) und der plötzlicher Herztod (105) bedeutsam und tragen entscheidend zum Krankheitsbild vom Diabetiker bei.

Zusammenfassend zeigt sich, dass kardiale Erkrankungen beim Diabetiker eine entscheidende Rolle in Morbidität und Mortalität spielen. Es stellt sich somit die Frage, welche wesentlichen Faktoren beim Diabetiker zu den Pathologien am Herzen beitragen. Wichtig ist daher, genaue Kenntnis über grundlegende pathologische Veränderungen und Vorgänge am Myokard des Diabetikers zu erlangen.

Eine Erkrankung des Myokards, die beim Diabetiker unabhängig von der koronaren Herzerkrankung, dem arteriellen Hypertonus und Herzklappenerkrankungen auftritt, ist die diabetische Kardiomyopathie (106). Sie geht mit strukturellen und funktionellen Veränderungen im Myokard des Diabetikers einher (107). Dabei ist insbesondere der veränderte kardiale Glucose- und Fettsäurestoffwechsel relevant (108). Zudem kommt es zur Fibrose und kardialer Hypertrophie sowie zu einer Belastung durch oxidativen Stress, Inflammation und Zelltod. Die kontraktile Dysfunktion wird mitunter durch Veränderungen im Ca^{2+} -Kreislauf bedingt (109). Hier zeigte sich in Mausmodellen des Diabetes mellitus Typ 2 ein gestörter Ca^{2+} -Transport der Kardiomyozyten, gekennzeichnet durch kleinere Ca^{2+} -Transienten und verringerte Geschwindigkeiten des zytosolischen Ca^{2+} -Anstiegs und Ca^{2+} -Abfalls (**Funk et al., 2022 (110)**). Darüber hinaus wurde eine verringerte SERCA-

Aktivität bei verstärkter Hemmung durch PLN identifiziert, die mit einer verminderten Ca^{2+} -Wiederaufnahme einhergeht und eine reduzierte Beladung des SR mit Ca^{2+} bedingt. Die Veränderungen im intrazellulären Ca^{2+} -Transport waren mit einer verringerten kontraktilen Funktion sowie einer verlangsamten Relaxation der Kardiomyozyten assoziiert (111, 112).

Trotz ausgiebiger Forschung sind die pathophysiologischen Grundlagen der diabetischen Kardiomyopathie noch unzureichend geklärt (107). Erkenntnisse über zugrunde liegende Ursachen und Mechanismen könnten wegweisend in der Entwicklung von Therapiestrategien sein und so die Prognose von kardiovaskulären Erkrankungen beim Diabetiker verbessern (108).

Ein Teil der vorliegenden Arbeit befasst sich mit der Frage, ob Diabetes Veränderungen der Ca^{2+} -Sensitivität bewirkt und welche Auswirkungen dieser auf Kontraktion, Relaxation und passive Steifigkeit hat.

1.5.3 Mausmodell für Diabetes mellitus Typ 2

Zur Untersuchung von Diabetes mittels Tiermodellen werden häufig Nagetiere verwendet (113). Ein etabliertes Tiermodell für den Diabetes Typ 2 ist die Leptinrezeptor-defiziente homozygote Maus (db/db) (114). Dieses Tiermodell beruht auf einer spontan aufgetretenen Mutation, die erstmalig in den Jackson Laboratories in Maine entdeckt wurde. Bei der db/db-Maus liegt eine autosomal-rezessive Mutation vor (115). Das betroffene Gen codiert für den Leptin-Rezeptor (116, 117). Leptin ist ein Hormon, das im Fettgewebe gebildet wird. Es wirkt endokrin auf das Gehirn und reguliert Appetit, Nahrungsaufnahme und Energieverbrauch (118). Homozygote db/db-Tiere, bei denen die Wirkung von Leptin ausfällt, entwickeln daher Übergewicht, Hyperinsulinämie und Hyperglykämie (119). Die db/db-Maus zeigt schon ab der vierten Lebenswoche ein erhöhtes Körpergewicht (119) und fällt durch große Fettablagerung in der Axillar- und Leistengegend auf (120). Es kommt zur schnellen Gewichtszunahme und db/db-Mäuse erreichen nach zwei Monaten ein Körpergewicht von ungefähr 40 Gramm (g). Im Vergleich dazu liegt das Gewicht von Wildtyp-Mäusen bei ca. 20 g. Zudem zeigen sich ab der vierten Woche erhöhte Insulinwerte im Blut der db/db-Maus. Die Hyperglykämie entwickelt sich innerhalb der vierten bis achten Lebenswoche (119). db/db-Mäuse weisen Blutzuckerkonzentrationen bis zu 300 Milligramm pro Deziliter (mg/dl) auf, während in gesunden Mäusen Konzentrationen von 130-160 mg/dl im Blut vorliegen. Ältere diabetische Mäuse erreichen sogar regelhaft Blutzuckerkonzentrationen von 600 mg/dl (120). Die Hyperglykämie geht mit Symptomen

wie Glucosurie, Polyurie, Polydipsie und Polyphagie einher (115). Zudem können auf Ebene des Pankreas zelluläre Veränderungen beobachtet werden und die insulinproduzierenden Beta-Zellen degranulieren (120). Die db/db-Maus entwickelt ein schwerwiegendes diabetisches Syndrom mit verkürzter Lebenszeit. Leptinrezeptor-defiziente heterozygote Tiere (db/+) zeigen einen normalen Phänotyp und keine diabetische Stoffwechsellaage (115). In dieser Arbeit wurden Leptinrezeptor-defiziente homozygote db/db und als nicht-diabetische Kontrollen heterozygote db/+ -Mäuse verwendet.

1.6 Ziele der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, die Kraftgenerierung im *remote* Myokard und im diabetischen Myokard mit Hilfe von Mausmodellen zu analysieren.

Teil 1: Nach einem MI muss der Funktionsverlust des ischämischen Gewebes durch das *remote* Myokard kompensiert werden, um die Perfusion des Organismus aufrechtzuerhalten. Es ist bekannt, dass bereits 24 Stunden nach 60-minütiger Ischämie Kontraktion und Relaxation isolierter Kardiomyozyten des *remote* Myokards beeinträchtigt sind (47, 121). Bisher ist jedoch unklar, ob sich die kontraktile Funktion im Anschluss an die akute Inflammation nach I/R erholt und wie sich die aktiven und passiven Kräfte im *remote* Myokard verändern. In dieser Arbeit wurde diesen Fragen mit Hilfe eines Mausmodells für I/R durch 60-minütige Ligation der linken vorderen Herzkranzarterie nachgegangen. Untersucht wurden die isolierten Papillarmuskeln des linken Ventrikels 9-12 Tage nach I/R. Beide Papillarmuskeln waren nicht von der Ischämie betroffen. Zum Vergleich dienten scheinoperierte Mäuse ohne I/R. Konkret wurden folgende Fragestellungen untersucht:

- Ist die aktive Kraftgenerierung im *remote* Myokard verändert?
- Wie verändert sich die aktive Kraftgenerierung im *remote* Myokard unter Stress (β -adrenerge Rezeptor-Stimulation, Erhöhung der Vorspannung des Muskels)?
- Ändert sich die Ca^{2+} -Sensitivität im *remote* Myokard?
- Ändern sich die passiven Kräfte im *remote* Myokard?

Teil 2: Das Myokard von Diabetikern unterliegt Veränderungen, die zu einer Beeinträchtigung der myokardialen Kontraktilität führen können (111, 112). In der vorliegenden Arbeit wurden daher die aktive und passive Kraftentwicklung im diabetischen Myokard Leptin-Rezeptor-defizienter Mäuse untersucht. Auch hier wurden die beiden Papillarmuskeln des linken Ventrikels isoliert. Im Fokus standen dabei folgende Fragestellungen:

- Kommt es im diabetischen Myokard zu Veränderungen in der aktiven Kraftgenerierung?
- Welchen Einfluss hat die β -adrenerge Rezeptor-Stimulation sowie die Erhöhung der Vorspannung?
- Ist die Ca^{2+} -Sensitivität verändert?
- Wie verändern sich die passiven Kräfte im diabetischen Myokard?

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Versuchstiere

Bei den Versuchen wurden 10-12 Wochen alte, männliche C57BL/6J Wildtyp-Mäuse (wt) 9-12 Tage nach Ischämie und Reperfusion untersucht (siehe Kapitel 2.2.1). Zum Vergleich wurden scheinoperierte Wildtyp-Mäuse ohne Myokardinfarkt betrachtet.

Als Tiermodell für den Diabetes mellitus Typ 2 wurden Leptin-Rezeptor defiziente, homozygote db/db-Mäuse verwendet. Heterozygote, nicht-diabetische db/+ Geschwistermäuse dienten als Kontrollgruppe. Zur Überprüfung des Phänotyps wurden die db/db-Mäuse nach der Herzentnahme gewogen. Zudem wurde bei der Herzentnahme ein Blutstropfen gewonnen und der Blutzucker mittels Blutzuckermessgerät bestimmt. In allen Fällen bestand erhöhtes Körpergewicht (> 35 g) und Hyperglykämie mit einer Blutglukosekonzentration von mindestens 300 mg/dl. Es wurden sowohl heterozygote als auch homozygote Männchen und Weibchen in einem Alter von 10-12 Wochen untersucht.

Die Versuchstiere wurden in der Zentralen Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben (ZETT) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf versorgt und teilweise gezüchtet. Ein Großteil der db/db und db/+ Tiere wurde bei Charles River Laboratories (Wilmington, Massachusetts, USA) erworben. Alle C57BL/6J Wildtyp-Tiere wurden bei Janvier Labs (Le Genest-Saint-Isle, Frankreich) gekauft. Der zugehörige Tierversuchsantrag wurde unter dem Aktenzeichen 84-02.04.2017.A145 vom Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz des Landes Nordrhein-Westfalen (LANUV) genehmigt. Die Promovendin hat an der Vermittlung von notwendigen Kenntnissen und praktischen Fähigkeiten zum Töten von Wirbeltieren der Spezies Maus und Ratte zu wissenschaftlichen Zwecken nach § 4 Abs.1 des geltenden Tierschutzgesetzes teilgenommen. Bei Tierversuchen erfolgte der Umgang mit den Tieren bis zur Tötung durch die auf dem oben bezeichneten Tierversuchsantrag gemeldeten Mitarbeitern der Arbeitsgruppe. Für Organentnahmen aus getöteten Mäusen lautete das zugehörige Aktenzeichen der ZETT O95/13.

2.1.2 Chemikalien

Tabelle 1: Übersicht der verwendeten Chemikalien

Chemikalie	Hersteller	Ort
(-)-Isoprenalin-hydrochlorid	Sigma-Aldrich®	St. Louis, Missouri, USA
2,3-Butanedionmonoxid (BDM)	Sigma-Aldrich®	St. Louis, Missouri, USA
Adenosin-5'-triphosphorsäure-Dinatriumsalz (Na ₂ ATP)	AppliChem	Darmstadt, Deutschland
Calciumchlorid-Dihydrat (CaCl ₂ * 2H ₂ O)	Merck	Darmstadt, Deutschland
cOmplete™ Protease-Inhibitor-Cocktail Tabletten	Roche	Basel, Schweiz
D(+)-Glucose	Carl Roth®	Karlsruhe, Deutschland
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich®	St. Louis, Missouri, USA
Ethylenglykol-bis-(2-aminoethyl)-N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA)	Sigma-Aldrich®	St. Louis, Missouri, USA
Glycerol	Sigma-Aldrich®	St. Louis, Missouri, USA
Imidazol	Sigma-Aldrich®	St. Louis, Missouri, USA
Kaliumchlorid (KCl)	Merck	Darmstadt, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	Sigma-Aldrich®	St. Louis, Missouri, USA
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck	Darmstadt, Deutschland
Kaliumhydroxid (KOH)	Honeywell Fluka™	Charlotte, North Carolina, USA
Kalziumchlorid (CaCl ₂) -Lösung	Honeywell Fluka™	Charlotte, North Carolina, USA
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Sigma-Aldrich®	St. Louis, Missouri, USA
Magnesiumchloridhexahydrat (MgCl ₂ * 6H ₂ O)	Sigma-Aldrich®	St. Louis, Missouri, USA
Magnesiumsulfat-Heptahydrat (MgSO ₄ * 7 H ₂ O)	Carl Roth®	Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth®	Karlsruhe, Deutschland
Natriumcreatinphosphat (Na ₂ CrP)	Merck	Darmstadt, Deutschland
Natriumfluorid (NaF)	Sigma-Aldrich®	St. Louis, Missouri, USA

Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3)	Merck	Darmstadt, Deutschland
Natriumorthovanadat (Na_3VO_4)	Sigma-Aldrich®	St. Louis, Missouri, USA
Natriumpyrophosphate-Decahydrat ($\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$)	Sigma-Aldrich®	St. Louis, Missouri, USA
Natronlauge (NaOH)	Carl Roth®	Karlsruhe, Deutschland
Protease-Inhibitor-Cocktail	Sigma-Aldrich®	St. Louis, Missouri, USA
Salzsäure (HCl)	Carl Roth®	Karlsruhe, Deutschland
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid (Tris-HCl)	Carl Roth®	Karlsruhe, Deutschland
Triton™ X-100	Sigma-Aldrich®	St. Louis, Missouri, USA
β -Glycerophosphat	Sigma-Aldrich®	St. Louis, Missouri, USA

2.1.3 Lösungen

Tabelle 2: Übersicht der verwendeten Lösungen

Lösung	Zusammensetzung
Dithiothreitol (DTT)-Lösung	1 M DTT
Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA)-Lösung	250 mM EGTA 500 mM Kaliumchlorid (KCl) pH-Wert mit Kaliumhydroxid (KOH) auf 7,0 einstellen Lösung bei 4 °C lagern
Imidazol-Lösung	1 M Imidazol
Kalzium-EGTA-Lösung	250 mM EGTA 250 mM einer Kalziumchlorid (CaCl_2)-Lösung pH-Wert mit KOH auf 7,0 einstellen Lösung bei 4 °C lagern
Magnesiumchlorid (MgCl_2)-Lösung	100 mM MgCl_2
Na_2MgATP -Lösung	50 mM Adenosin-5'-triphosphat-Dinatriumsalz (Na_2ATP)

	50mM Magnesiumdichloridhexahydrat ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) pH-Wert mit KOH auf 7,0 einstellen Lösung bei -20 °C lagern
Phosphatase-Inhibitor-Cocktail	500 mM Natriumfluorid (NaF) 10 mM Natriumorthovanadat (Na_3VO_4) 100 mM Natriumpyrophosphat-Decahydrat ($\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) 100 mM β -Glycerophosphat

2.1.4 Verbrauchsmaterial

Tabelle 3: Übersicht des verwendeten Verbrauchsmaterial

Material	Bezeichnung	Hersteller	Ort
6-Loch-Platte	CELLSTAR® 6 Well Zellkultur Multiwell Platte	Greiner Bio-One International GmbH	Kremsmünster, Österreich
Ballonflasche mit Hahnanschluss	HDPE-Ballonflaschen mit Hahnanschluss 5 l	Kautex Textron GmbH & Co. KG	Bonn, Deutschland
Carbogenflasche	Carbogen LAB, 200 bar	Linde	Pullach, Deutschland
Faden 1	Prolene™ 7-0	Johnson & Johnson Ethicon	Norderstedt, Deutschland
Faden 2	Prolene™ 5-0	Johnson & Johnson Ethicon	Norderstedt, Deutschland
Faden 3	Seidenfaser 7-0	Resorba®	Nürnberg, Deutschland
Gewebekleber	Histoacryl®	B. Braun	Melsungen, Deutschland
Injektionskanülen	Sterican® Standardkanüle Gr. 2, ø 0,80 x 40 mm	B. Braun	Melsungen, Deutschland
Mikrochirurgische Pinzetten	Mikrochirurgische Pinzetten	Manufactures D'Outils Dumont SA	Montignez, Schweiz
Mikrochirurgische Scheren	Mikrochirurgische Scheren	A. Hartenstein	Würzburg, Deutschland
Minutiennadeln	Austerlitz Insect Pins® Minutiens ø 0,2 mm	ENTOMORAVIA	Slavkov u Brna, Tschechien
Objektmikrometer	Objektmikrometer	Leitz	Wetzlar, Deutschland
Pinzetten	Pinzetten	Manufactures D'Outils Dumont SA	Montignez, Schweiz

Skalpell	<i>Disposable Scalpel</i> No. 15	Feather®	Osaka, Japan
----------	----------------------------------	----------	--------------

2.1.5 Laborgeräte

Tabelle 4: Übersicht der verwendeten Laborgeräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller	Ort
Anästhesiegas-Fortleitungssystem	Fluovac	Hugo Sachs Elektronik-Harvard Apparatus GmbH	March-Hugstetten, Deutschland
Beatmungsgerät	Minivent Microventilator	Hugo Sachs Elektronik-Harvard Apparatus GmbH	March-Hugstetten, Deutschland
Blutzuckermessgerät	Accu Chek Compact Plus	Roche Diabetes Care GmbH	Basel, Schweiz
Brückenverstärker	Bridge Amp FE221	ADInstruments	Dunedin, Neuseeland
Datenerfassungssystem	Power Lab 4/35	ADInstruments	Dunedin, Neuseeland
Doppelringelektrode	Doppelringelektrode	ADInstruments	Dunedin, Neuseeland
Elektrokardiograph	Elektrokardiograph	Hugo Sachs Elektronik-Harvard Apparatus GmbH	March-Hugstetten, Deutschland
Fasermessapparatur	McMyoSkin	MyoTronic UG	Heidelberg, Deutschland
Feinwaage 1	2001 MP2	Sartorius AG	Göttingen, Deutschland
Feinwaage 2	AE 163	Mettler-Toledo	Greifensee, Schweiz
Heizblock	Thermomixer compact 5350	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Kraftaufnehmer	Force Transducer MLT0420	ADInstruments	Dunedin, Neuseeland
Magnetrührer	RCT classic	IKA®	Staufen, Deutschland
Mikroskop 1	Leica MZ9.5	Meyer Instruments	Houston, Texas, USA
Mikroskop 2	Leica M50	Leica Microsystems	Wetzlar, Deutschland
pH-Meter 1	pH 211	Hanna Instruments	Woonsocket, Rhode Island, USA
pH-Meter 2	MP 220	Mettler-Toledo	Greifensee, Schweiz
Reinstwasseranlage	Milli-Q Biocel	Millipore	Billerica, Massachusetts, USA

Schüttler 1	Shaker DOS-20L	neoLab Migge GmbH	Heidelberg, Deutschland
Schüttler 2	Schüttler Kombischüttler KL 2	Edmund Bühler GmbH	Bodelshausen, Deutschland
Stereolupe	Leica S8 APO	Leica Microsystems	Wetzlar, Deutschland
Stimulator	Stimulator LE 12406	Panlab	Barcelona, Spanien
Temperaturregler	Thermostat LE 13206	Panlab	Barcelona, Spanien
Vortex-Mischer	444-1372	VWR®	Radnor, Pennsylvania, USA
Zwei-Kammer-Organbad	Two Chamber Organ Bath ML0126/10	Panlab	Barcelona, Spanien

2.1.6 Software

Tabelle 5: Übersicht der verwendeten Software

Software	Hersteller	Ort
Basic Data Acquisition Software	Harvard Apparatus	Holliston, Massachusetts, USA
EndNote	Clarivate Analytics	London, Vereinigtes Königreich
GraphPad Prism 9.5.1	GraphPad Software	San Diego, Kalifornien, USA
LabChart	ADInstruments	Dunedin, Neuseeland
Microsoft Excel	Microsoft Corporation	Redmond, Washington, USA
Microsoft Word	Microsoft Corporation	Redmond, Washington, USA
MyoDat	MyoTronic UG	Heidelberg, Deutschland

2.2 Methoden

2.2.1 Induktion eines Myokardinfarktes

Um bei den Wildtyp-Tieren einen Myokardinfarkt zu erzeugen, wurde die linken vordere Herzkranzarterie (*left anterior descending artery* [LAD]) durch Ligatur verschlossen. Dies erfolgte nach einem im Rahmen des Sonderforschungsbereichs 1116 etablierten Verfahren. Dafür wurden die Mäuse von Prof. Dr. Schmitt voroperiert und nach einigen Tagen der Infarkt durch 60-minütige Ligatur der LAD ohne erneute Thoraxeröffnung (sogenanntes

Closed-chest Verfahren) von Dr. Simone Gorreßen induziert. Es folgte eine 9-12-tägige Phase der Reperfusion. Der chronologische Ablauf ist in Abb. 4 dargestellt. Die einzelnen Eingriffe werden im Folgenden beschrieben.

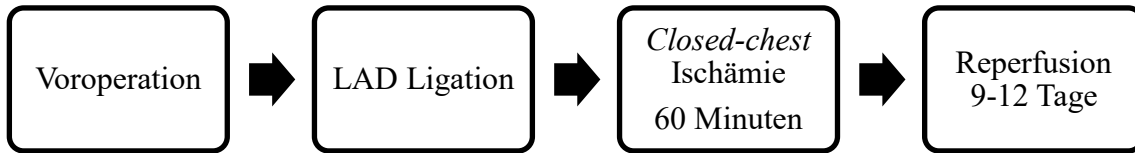


Abb. 4: Schematische Darstellung der Abfolge zur Erzeugung einer Ischämie bei Wildtyp-Mäusen. Die Wildtyp-Mäuse wurden einer Voroperation unterzogen, bei der die Ligaturfäden für die folgende LAD Ligation angebracht wurden. Drei bis vier Tage später erfolgte die *Closed-chest* Ischämie bzw. *sham*-Ischämie, die 60 Minuten aufrecht erhalten wurde. 9-12 Tage nach Beginn der Reperfusion erfolgte die Tötung der Tiere.

Voroperation

Die Voroperation diente der Umschlingung der LAD mit einem dünnen chirurgischen Faden, die zum späteren transienten Verschluss der Arterie genutzt wurden. Dafür wurden die Mäuse drei bis vier Tage vor der Ischämie-Induktion operiert. Bei der Voroperation wurde durch eine intraperitoneale Injektion mit Ketamin (90 Milligramm pro Kilogramm [mg/kg] Körpergewicht) und Xylazin (15 mg/kg Körpergewicht) die Anästhesie der Tiere eingeleitet und eine ausreichende Anästhesietiefe abgewartet. Um perioperativ die Körpertemperatur zu erhalten wurden die Tiere mit dem Rücken auf einer beheizten Wärmeplatte (37 Grad Celsius [°C]) platziert. Es folgte eine Intubation und der Anschluss an ein Beatmungsgerät. Die Beatmung wurde mit einem Hubvolumen von 250 Mikroliter (µl) und einer Beatmungsfrequenz von 140/Minute (min) realisiert. Das Atemgas setzte sich aus 2/3 Raumluft und 1/3 Sauerstoff zusammen. Nach erfolgreicher Anästhesieeinleitung konnte die Operation erfolgen.

Für die Voroperation wurde ein Mikroskop 1 zu Hilfe genommen. Im ersten Schritt wurde der Thorax zwischen der dritten und vierten Rippe eröffnet und nachfolgend das Perikardium durchschnitten. Nach Auffinden der LAD konnte dann ein Faden 1 der Stärke 7-0 unter den proximalen Bereich der Arterie unmittelbar unterhalb des rechten Herzohres gebracht werden. Die Nadel wurde vom Faden entfernt und beide Fadenenden durch einen 1 Millimeter (mm) dicken Ring aus Polyethylen bestehend geführt. So entstand um die LAD eine lockere Schlaufe (Abb 5). Die beiden Fadenenden wurden aus dem Thorax geführt, verknotet und bis zur Ischämie-Induktion in einer subkutanen Tasche rechts am Thorax

platziert. Anschließend wurden der knöcherne Thorax, die Muskulatur und die Haut schichtweise verschlossen. Nach Rückkehr zur Spontanatmung wurde die Beatmung abgestellt und das Tier extubiert. Zur perioperativen Analgesie diente Buprenorphin (0,05-1 mg/kg, subkutan), das erstmals 30 Minuten vor Beginn der Operation und dann bis zum 2. postoperativen Tag alle 8 Stunden appliziert wurde.¹

***Closed-chest* Ischämie-Induktion**

Die Ischämie-Induktion bzw. Schein-Ischämie (*sham*) fand drei bis vier Tage nach der Voroperation statt und diente der Erzeugung einer Ischämie im Versorgungsgebiet der LAD. Da der Thorax bei dieser Art der Ischämie-Induktion nicht nochmals eröffnet werden musste, spricht man von einer *Closed-chest* Ischämie.

Dafür wurden die Tiere initial mittels Isofluran 5 Volumenprozent (Vol.-%) über eine Maske narkotisiert. Aufrechterhalten wurde die Narkose mit 2 Vol.-% Isofluran. Dabei wurde ein Anästhesiegas-Fortleitungssystem verwendet, das gleichzeitig überschüssiges Anästhesiegas absorbierte. Zusätzlich wurden die Tiere mit einer Mischung aus 2/3 Raumluft und 1/3 Sauerstoff über die Maske beatmet.

Zuerst wurden die Tiere in Rückenlage auf einer beheizten Wärmeplatte fixiert. Während des Eingriffs wurde eine Körpertemperatur von 37-37,5 °C angestrebt und mittels einer rektal eingeführten Temperatursonde überwacht. Die Tiere wurden an einen Elektrokardiographen angeschlossen und ein Elektrokardiogramm (EKG) abgeleitet, das zur Kontrolle des Verschlusses der LAD diente. Das EKG wurde während des gesamten Vorgangs mit Hilfe der Basic Data Acquisition Software aufgezeichnet.

Dann konnte die Hautnaht der Voroperation eröffnet, die Ligaturfäden aus der subkutanen Tasche vorsichtig mobilisiert und an jeweils zwei Magnethaltern befestigt werden, ohne Zug auszuüben. Die Fäden wurden dann behutsam straffgezogen, bis sich im EKG eine ST-Streckenhebung zeigte. Dies signalisierte einen Verschluss der LAD und eine folgende Ischämie des von ihr versorgten Gebietes (Abb. 5). Die Ischämie wurde für 60 Minuten aufrechterhalten. Die Reperfusion des Gewebes wurde nach Ablauf der 60 Minuten eingeleitet, indem die Fäden durchgeschnitten und die LAD wiedereröffnet wurde. Mittels Nahtmaterial der Stärke 5-0 (Faden 2) wurde die Haut verschlossen. Die Zufuhr des Narkotikums wurde schließlich gestoppt. Bei den Wildtyp-Tieren mit *sham*-Ischämie wurde

¹ Die Voroperationen wurden von Prof. Dr. Joachim Schmitt durchgeführt

während der Narkose keine ST-Streckenhebung und somit keine Ischämie erzeugt. Ansonsten wurde gleichermaßen vorgegangen.²

Vorderer und hinterer Papillarmuskel des linken Ventrikels sind nach Ligatur der LAD nicht von der Ischämie betroffen und können somit dem *remote* Myokard zugerechnet werden. Die Papillarmuskeln wurden daher für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Messungen verwendet.

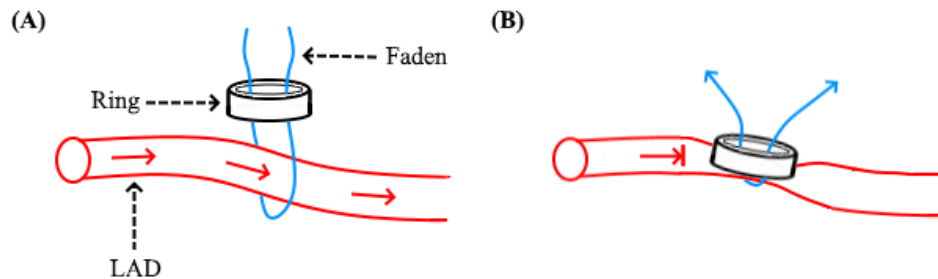


Abb. 5: Schematische Darstellung der Ischämie-Induktion durch LAD Ligatur. (A) Bei der Voroperation: Ein Faden wird um die LAD geschlungen. Ligaturfaden und Ring bilden um die LAD eine lockere Schleife. Die Perfusion ist intakt. (B) Bei der Ischämie-Induktion: Durch Straffen der Fadenenden gelangt der Ring näher zur LAD und verschließt das Gefäß. Die Perfusion ist gestört und es kommt zur Ischämie. LAD = linke vorde Herzkranzarterie

2.2.2 Kraftmessungen am Organbad

2.2.2.1 Versuchsaufbau Organbad

Ein Organbad ermöglicht es, isoliertes Gewebe *in vitro* über mehrere Stunden zu untersuchen, indem ein konstantes physiologisches Milieu für die jeweilige Probe erzeugt wird. In der vorliegenden Arbeit wurde durch elektrische Reizung die Probe stimuliert und gleichzeitig das Kontraktionsverhalten gemessen. Auch der Einfluss von speziellen Stoffen auf die Kontraktion, wie zum Beispiel von Medikamenten, kann geprüft werden

Für die Versuche wurde ein Zwei-Kammer-Organbad der Firma PanLab verwendet (Abb. 6). Dieses umfasste zwei Organbadkammern mit einem Fassungsvermögen von 10 Milliliter (ml) innerhalb eines aus Plexiglas bestehenden Wasserbads. Dieses war mit destilliertem Wasser (*Aqua destillata* [*Aqua dest.*]) gefüllt, welches auf 37 °C mittels Heizstab erwärmt wurde. Durch eine Wasserpumpe wurde eine Zirkulation des erhitzten Wassers erzeugt und damit eine gleichmäßige Verteilung der Wärme im gesamten Wasserbad gewährleistet. Über

² Die *Closed-chest* Ischämie-Induktionen wurde von Dr. Simone Gorreßen durchgeführt.

einen externen Temperaturregler konnte die gewünschte Temperatur ausgewählt und über einen Temperaturfühler überprüft werden, ob diese erreicht wurde. Eine 5 Liter (l) Ballonflasche mit Hahnanschluss, die die Nährlösung enthielt, war an ein Schlauchsystem mit anschließenden Reservoirspulen angeschlossen. Die Nährlösung gelangte von dort zu den Organbadkammern und wurde über ein weiteres Schlauchsystem abgeleitet. Bei den Versuchen wurde Tyrode-Lösung als Nährlösung verwendet (siehe Kapitel 2.2.2.2). Über Druckknöpfe konnte das Füllen und Leeren der Kammer mittels Elektroventilen gesteuert werden. Die Reservoirspulen, die sich innerhalb des Wasserbads befanden, stellten sicher, dass die Temperatur der Nährlösung in der Gewebekammer nach dem Nachfüllen nicht schwankte. Über ein weiteres Schlauchsystem, das an eine Carbogenflasche angeschlossen war und an einer Fritte am Boden der Organbadkammer endete, konnte die Kammer mit Carbogen (5 % Kohlenstoffdioxid [CO₂], 95 % Sauerstoff [O₂]) begast werden. Mittels eines Durchflussreglers konnte die Gaszufuhr so reguliert werden, dass feine Bläschen in der Kammer aufstiegen. Wenn der Gasfluss zu stark war, wurde das Muskelbündel angestoßen und die Messung gestört. In der Organbadkammer wurde so ein physiologisches Milieu für ein Muskelbündel mittels Tyrode-Lösung und Oxygenierung erzeugt. Für die Versuche war immer nur eine der beiden Organbadkammern in Gebrauch.

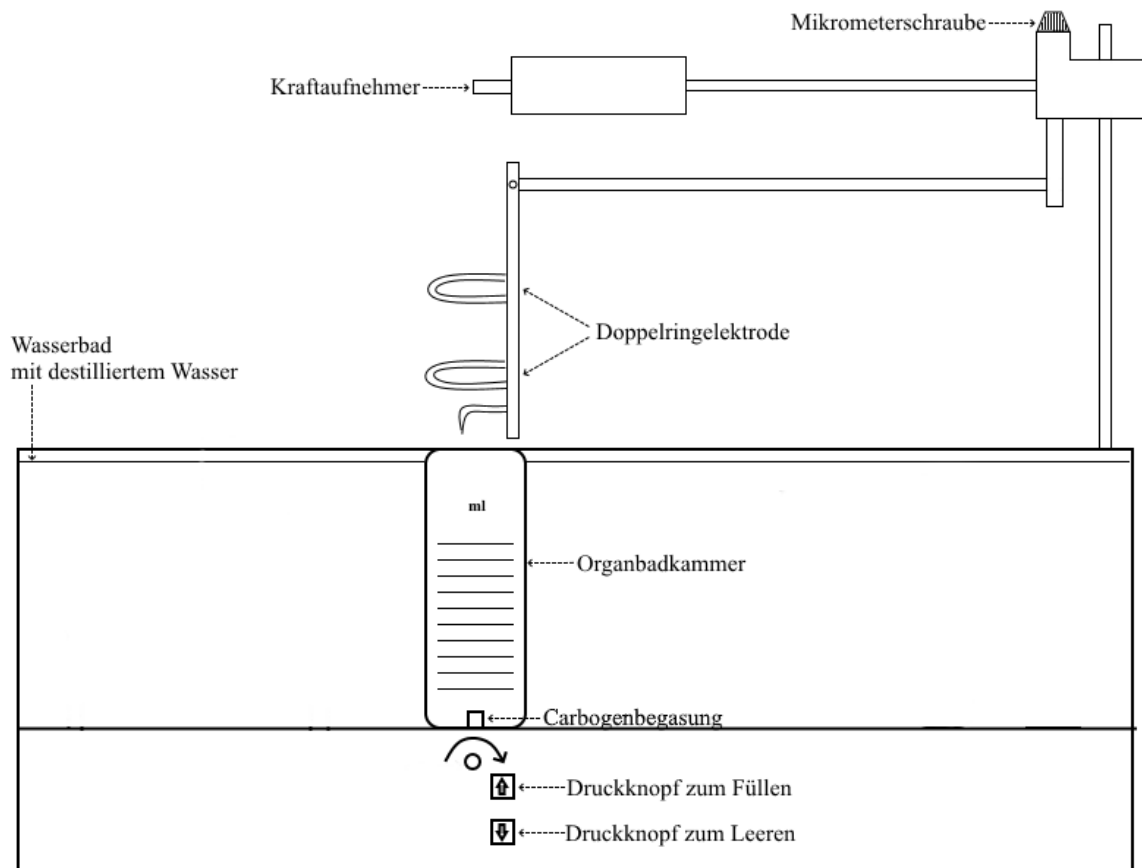


Abb. 6: Schematischer Aufbau des Organbad-Systems. Die Organbadkammer befindet sich inmitten eines Wasserbads mit destilliertem Wasser, das auf 37 °C erhitzt wird. Über eine Fritte am Boden der Organbadkammer wird die Kammer mit Carbogen begast. Eine Halterung dient zur Anbringung einer Doppelringelettrode, die in die Kammer eingelassen werden kann. Der Kraftaufnehmer kommt oberhalb der Kammer zum Liegen und wird über eine Mikrometerschraube ausgerichtet.

Über eine Halterung konnte eine Doppelringelettrode in die Organbadkammer eingebracht werden. Der isolierte Papillarmuskel (zur Präparation siehe Kapitel 2.2.2.3) wurde für die Messungen zwischen den beiden Elektrodenringen platziert (Abb. 7). Die Halterung mit der Doppelringelettrode besaß zur unteren Fixierung des Muskelbündels einen Haken. Das Muskelbündel wurde hier mittels einer Schlaufe fixiert. Über Mikropositionierer wurde der Kraftaufnehmer über der Kammer positioniert. Ein Draht, der mit dem oberen Teil des Muskelbündels über einen Faden verbunden war, wurde am Kraftaufnehmer eingehängt. Das Muskelbündel spannte sich schließlich zwischen den beiden Ringen der Elektrode auf und konnte so optimal stimuliert werden. Die Position des Kraftaufnehmers konnte über eine Mikrometerschraube verändert werden. Durch Drehen an der Mikrometerschraube wurde die Höhe des Kraftaufnehmers variiert, was mehr oder weniger Spannung auf Draht und Faden und somit das Muskelbündel erzeugte. So konnten unterschiedliche Vorspannungen auf das Gewebe eingestellt werden und wirken. Dabei erzeugte ein Stimulator elektrische

Impulse von 50 Volt pro Milliampere (V/mA) und einer Dauer von 10 Millisekunden (ms) bei einer Stimulationsfrequenz von 1 Hertz (Hz), die auf die Elektrode übertragen wurden. Somit entstand ein elektrisches Feld, in dem sich der Muskel befand. Diese elektrische Stimulation führte zur Kontraktion und Relaxation des Muskels. Die entwickelte Kraft wurde über Faden und Draht auf den Kraftaufnehmer übertragen. Die gemessenen Signale wurden an einen Brückenverstärker weitergeleitet und verstärkt. Die generierten Daten wurden an ein Datenerfassungssystem übermittelt und konnten mit Hilfe der Software LabChart auf einem verknüpften PC dargestellt werden. Dabei wurden die Kontraktionsfrequenz (Hz), die Vorspannung (Millinewton [mN]), die Kraftamplitude (mN) und die Geschwindigkeit des Kraftanstiegs und -abfalls (Millinewton pro Sekunde [mN/s]) aufgezeichnet. Die Vorspannung, die auf den Muskel wirkte, konnte so abgelesen und dementsprechend eingestellt werden.

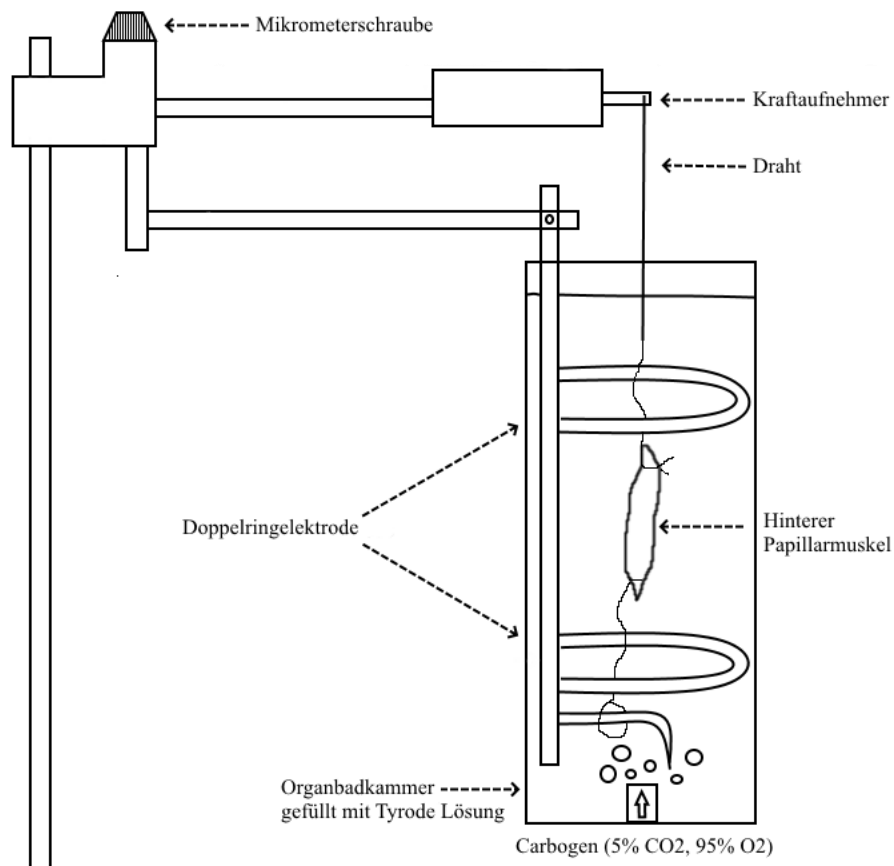


Abb. 7: Schematischer Aufbau und Fixierung des Papillarmuskels in der Organbadkammer. An einem Haken wurde das untere Ende des Papillarmuskels mittels einer Schlaufe befestigt. Das andere Ende wurde über einen Faden an einem Draht fixiert, welcher mit dem Kraftaufnehmer verbunden war. Der Papillarmuskel spannte sich so zwischen den Ringen der Doppelringe Elektrode auf. Die Organbadkammer war mit Tyrode-Lösung gefüllt und es erfolgte eine kontinuierliche Begasung mit Carbogen. CO₂ = Kohlenstoffdioxid; O₂ = Sauerstoff

Das Organbad wurde am Ende jedes Arbeitstages mit *Aqua dest.* durchgespült, um eine Ablagerung von Salzen und dadurch entstehende Verunreinigungen zu verhindern. So konnte gewährleistet werden, dass reproduzierbare Ergebnisse generiert werden.

2.2.2.2 Physiologische Nährlösung

Für die Versuche am Organbad wurde Tyrode-Lösung als Nährlösung verwendet. In Tabelle 6 ist die Zusammensetzung dieser dargestellt. Die Lösung wurde an jedem Messtag frisch angesetzt. Die Chemikalien wurden mit einer Feinwaage 1 abgewogen und mit 2 l Reinstwasser der Reinstwasseranlage versetzt. Nach 10 Minuten Rühren mittels Magnetrührer und Rührfisch wurde der pH-Wert mithilfe eines pH-Meters 1 gemessen und dokumentiert. Dann wurde die Lösung für 20 Minuten mit Carbogen (95 % O₂, 5 % CO₂) begast, um einen pH-Wert von 7,35-7,45 einzustellen und die Lösung mit Sauerstoff zu sättigen. Der Gasfluss musste dabei der Erfahrung nach so eingestellt werden, dass große Blasen erzeugt wurden. Anschließend wurde der pH-Wert mittels pH-Meter 1 gemessen und dokumentiert. Zuletzt wurde Calciumchlorid-Dihydrat (CaCl₂ * 2H₂O) hinzugefügt und der pH-Wert erneut gemessen und dokumentiert. Ein pH-Wert von 7,35-7,45 wurde angestrebt und erreicht.

Tabelle 6: Zusammensetzung der Tyrode-Lösung

Konzentration	Chemikalie
118 mM	NaCl
4,7 mM	KCl
0,8 mM	MgSO ₄ * 7 H ₂ O
25 mM	NaHCO ₃
1,2 mM	KH ₂ PO ₄
10 mM	D(+)-Glucose
2,5 mM	CaCl ₂ * 2H ₂ O

2.2.2.3 Organentnahme und Präparation

Die Tötung der Tiere erfolgte durch zervikale Dislokation. Für die Wildtyp-Tiere fand dies 9-12 Tage nach Beginn der Reperfusion statt. Die Tiere wurden anschließend auf den Rücken gedreht und die Vorderbeine mit Nadeln auf einer Styroporunterlage fixiert. Mit

einer Schere wurde im Bereich des Thorax auf Höhe der Rippenbögen ein Querschnitt durch die Haut gesetzt und die Haut manuell abgezogen, sodass der knöcherne Thorax frei lag. Anschließend wurde unmittelbar unterhalb des Xiphoids ein Querschnitt durch das Diaphragma gesetzt. Es folgten zwei weitere Schnitte kaudal im Bereich der linken und rechten vorderen Axillarlinie durch die Rippen und das Diaphragma. Danach konnte der ventrale Teil des Thorax hochgeklappt und so Herz und Lunge gut exponiert werden. Das Herz wurde von Perikard und umgebendem Lungengewebe freipräpariert und auf Höhe der Vorhöfe abgesetzt und entnommen. Dabei wurden Teile der Vorhöfe im Thorax belassen. Das schlagende Herz wurde in eine Petrischale mit eisgekühlter Tyrode-Lösung überführt. Nach Ausblutung erfolgte die weitere Präparation mit Hilfe einer Schere und Pinzette. Dafür wurden gegebenenfalls die Vorhöfe weiter entfernt, sodass die Ventilebene sichtbar wurde. Anschließend erfolgte ein Schnitt durch die freie Wand des rechten Ventrikels bis zum Apex. Nachfolgend wurde das Septum längs bis zum Apex durchtrennt, sodass der linke Ventrikel eröffnet wurde. Die weitere Präparation erfolgte unter dem Mikroskop 2 mit integrierter Beleuchtung. Das Herz wurde nun in eine Petrischale mit dünnem Boden aus Silikon-Kautschuk, die ebenfalls eisgekühlte Tyrode-Lösung enthielt, überführt und mit zwei feinen Injektionskanülen fixiert (Abb. 8). Mit mikrochirurgischen Scheren und Pinzetten wurden links und rechts vom hinteren Papillarmuskel Schnitte gesetzt und der hintere Papillarmuskel zusammen mit bestehendem Myokard der linken Ventrikelwand isoliert. Mit einem feinen Faden 3 aus Seide der Stärke 7-0 wurde das basale und apikale Ende des hinteren Papillarmuskels angeschlungen. Die Präparation und anschließende Fixierung galt es ohne Dehnung und Berührung der Muskeln innerhalb von 15 Minuten durchzuführen, um die Kontraktilität zu erhalten. Eine Vorbereitung aller benötigten Materialien war daher wichtig. Zudem wurde jedem Tier ein Stück der Schwanzspitze für eine eventuell erneute Genotypisierung entnommen. Bei den Wildtyp-Mäusen wurde ein Stück des Apex und ein Stück der Basis des Herzens isoliert. Nach LAD-Ligation gehörte der Apex zum infarzierten Areal, während die Basis von der Ischämie ausgespart blieb. Bei *sham*-operierten Mäusen durfte entsprechend kein infarziertes Gewebe zu finden sein. Obgleich das Vorliegen eines Infarktes mikroskopisch gut beurteilt werden konnte, wurden die Proben für eine eventuell spätere histologische Beurteilung entnommen. Von den db/db und db/+ -Tieren wurde das komplette Herz isoliert. Die isolierten Proben wurden kurzfristig in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80 °C gelagert.

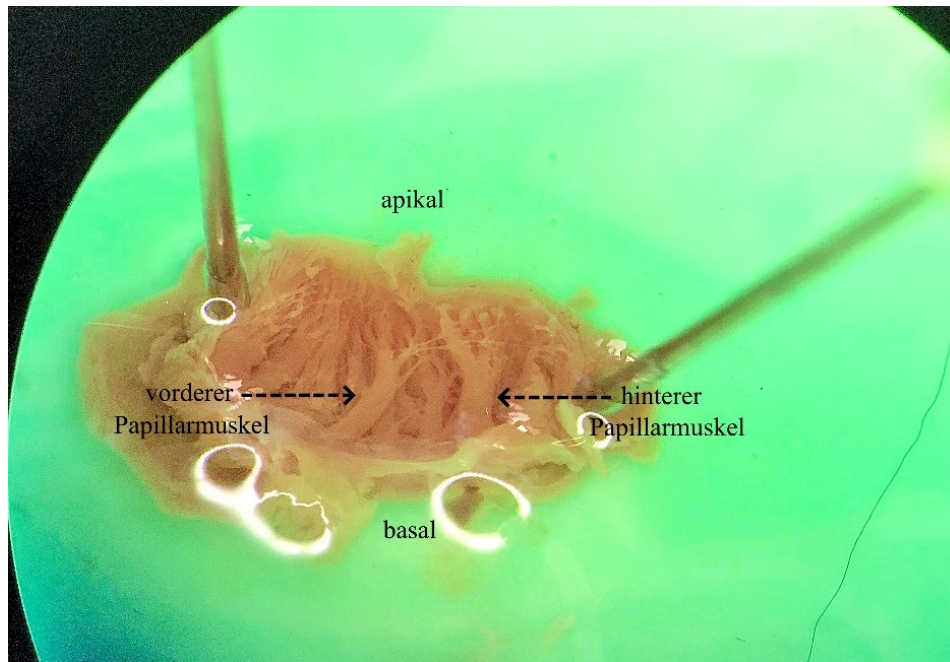


Abb. 8: Sicht auf den aufgeklappten linken Ventrikel während der Präparation. Das Herz ist zur Erleichterung der Präparation mit zwei Injektionskanülen fixiert. Vorderer und hinterer Papillarmuskel können so sicher identifiziert werden.

2.2.2.4 Versuchsprotokoll

- Fixierung des hinteren Papillarmuskels
- Vorspannung auf 1 mN
- Äquilibration für 10 Minuten
- Zweimaliges Spülen
- Vorspannung auf 1 mN
- Äquilibration für 10 Minuten
- β -adrenerge Stimulation durch Isoprenalin
- Viermaliges Spülen
- Äquilibration für 10 Minuten
- Erhöhung der Vorspannung

Die Fixierung des hinteren Papillarmuskels im Organbad erfolgt am unteren Ende mit einer Schlaufe, die an dem Haken der Doppelringelektrode befestigt wurde. Das obere Ende des Muskels wurde fixiert, indem das Fadenende mittels Gewebekleber an einen Draht geklebt wurde. Für eine gute Vergleichbarkeit wurden die Muskeln immerzu gleich ausgerichtet, wodurch das apikale Ende unten und das basale Ende des Muskels oben zu liegen kam. Um

den Muskel nicht zu schädigen und keine Spannung auf das Gewebe auszuwirken, wurde der Muskel locker eingespannt. Die Gewebekammer war bis 10 ml mit Tyrode-Lösung gefüllt und wurde während der gesamten Messung mit Carbogen versetzt und bei einer Temperatur von 37 °C gehalten. Nachdem der Muskel eingehängt und samt der Doppelringelektrode in die Organbadkammer abgesenkt worden war, wurde durch Drehen an der Mikrometerschraube der Muskel auf 1 mN vorgespannt. Anschließend begann die elektrische Stimulation, wodurch der Papillarmuskel zur Kontraktion angeregt wurde. Es folgten eine Äquilibrierungsphase von ca. 10 Minuten und schließlich ein Wechsel der Tyrode-Lösung durch zweimaliges Spülen. Da ein erheblicher Abfall der Vorspannung zu beobachten war, wurde der Muskel erneut auf 1 mN vorgespannt. Es schloss sich eine weitere Äquilibrierungsphase von 10 Minuten an. In diesen Äquilibrierungsphasen veränderte sich erfahrungsgemäß das Signal des Muskels, wurde stärker und pendelte sich auf ein konstantes Niveau ein. Ziel war es, konstante Signale der Kraftamplitude sowie der Geschwindigkeit des Kraftanstiegs und -abfalls zu erhalten. Erst dann wurde mit der Stimulation durch Isoprenalin begonnen. In den meisten Fällen waren 20 Minuten ausreichend. Die Phase der Äquilibration wurde aber dementsprechend verlängert, wenn noch kein konstantes Signal wahrnehmbar war. Bei der Auswertung der Daten wurde die Kraftamplitude sowie die Geschwindigkeit des Kraftanstiegs und -abfalls des Papillarmuskels berücksichtigt. Dabei zeigen Abb. 9 und 10, wie diese erhoben wurden.

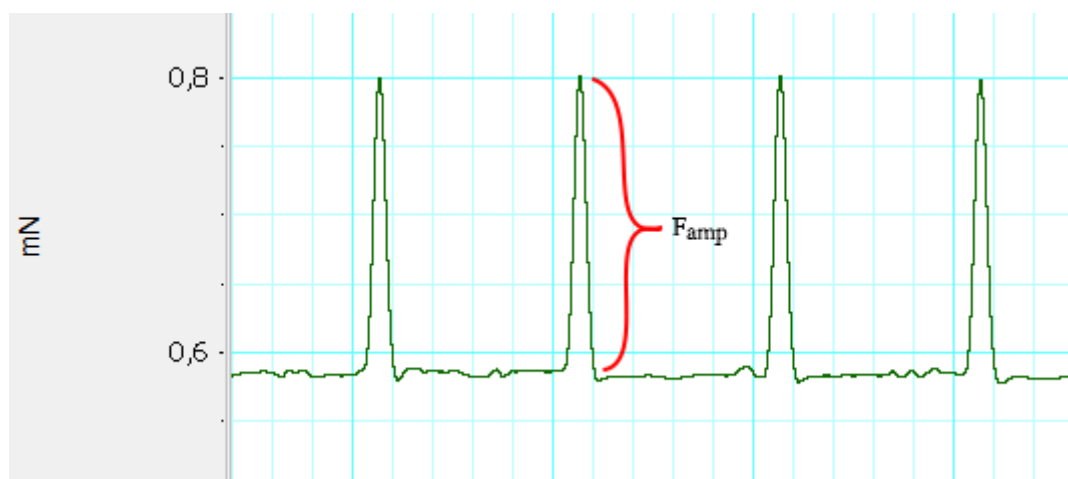


Abb. 9: Ausschnitt einer Originalmessung der Kraftamplitude. Abgebildet ist die vom Papillarmuskel entwickelte Kraft gemessen in Millinewton (mN) bei einer Stimulationsfrequenz von 1 Hertz (Hz). Die Kraftamplitude (F_{amp}) ergibt sich durch Messung der maximal entwickelten Kraft. Die Signale wurden mit Hilfe des Programms LabChart aufgezeichnet.



Abb. 10: Ausschnitt einer Originalmessung der Geschwindigkeit des Kraftanstiegs und -abfalls. Die Geschwindigkeit des Kraftanstiegs ($+dF/dt$) und die Geschwindigkeit des Kraftabfalls ($-dF/dt$) werden in Millinewton pro Sekunde (mN/s) gemessen. Die $+dF/dt$ wird am maximalen Punkt der Kurve und die $-dF/dt$ am minimalen Punkt der Kurve abgelesen. Die Signale wurden mit Hilfe des Programms LabChart aufgezeichnet.

β -adrenerge Stimulation durch Isoprenalin

Adrenalin und Noradrenalin sind Katecholamine, die bei physiologischen oder pathologischen Stressbedingungen vom Körper ausgeschüttet werden. Sie können auf die β -adrenergen Rezeptoren des Herzens wirken und die kardiale Kontraktilität modulieren. Isoprenalin ist ein synthetisch hergestelltes Katecholamin und wirkt als Agonist auf β -adrenerge Rezeptoren des Herzens. In den Versuchen wurde die Wirkung des Isoprenalins bei konstanter Kontraktionsfrequenz untersucht. Chronotrope Effekte des Isoprenalins wurden daher nicht betrachtet.

Das Molekulargewicht von Isoprenalin beträgt 247,72 Gramm pro Mol (g/mol). Um eine 10 Millimolar (mM) Isoprenalin-Lösung zu erhalten, wurden 2,48 mg (–)-Isoproterenol hydrochloride in 1 ml *Aqua dest.* gelöst. Von dieser Lösung wurden jeweils 10 μ l in 0,2 Aliquots abgefüllt und bei -20 °C bis zur Verwendung eingefroren. Am Tag der Messung wurde 1 Aliquot mit 10 μ l Isoprenalin-Lösung aufgetaut und verwendet. Um verschiedene Konzentrationen in der Gewebekammer zu erreichen, wurde die 10 mM Isoprenalin-Lösung mit Tyrode-Lösung nach dem folgenden Schema verdünnt (Tabelle 7).

Tabelle 7: Verdünnungsreihe der 10 mM Isoprenalin-Lösung

Epi-Nr.	Isoprenalin 10 mM	Tyrodelösung [μ l]	Konzentration [μ M]
1	10 μ l Original 1:100	990	100
2	10 μ l aus Epi-Nr. 1 1:1000	90	10
3	10 μ l aus Epi-Nr. 1 1:10000	990	1

In die bis 10 ml gefüllte Organbadkammer wurden alle zwei Minuten schrittweise bestimmte Mengen Isoprenalin hinzugefügt, ohne dabei den Kraftaufnehmer oder den Draht zu berühren. So wurden Konzentrationen von 1 Nanomol pro Liter (nmol/l), 3 nmol/l, 10 nmol/l, 30 nmol/l, 100 nmol/l, 300 nmol/l und 1000 nmol/l in der Organbadkammer erreicht (Tabelle 8).

Tabelle 8: Pipettierschema für verschiedene Kammerkonzentrationen von Isoprenalin

Pipettierte Menge pro 10 ml Kammerlösung	Erzielte Kammerkonzentration [nM]
10 μ l aus Epi-Nr. 3	1
20 μ l aus Epi-Nr. 3	3
70 μ l aus Epi-Nr. 3	10
20 μ l aus Epi-Nr. 2	30
70 μ l aus Epi-Nr. 2	100
20 μ l aus Epi-Nr. 1	300
70 μ l aus Epi-Nr. 1	1000

Innerhalb der zwei Minuten stellte sich für jede Konzentration der vollständige Effekt ein. Die genauen Zeitpunkte der Isoprenalinzugabe wurden in dem Programm LabChart festgehalten, um später die Signale entsprechend zuordnen zu können. Nachfolgend wurde

Isoprenalin ausgewaschen, indem viermal manuell gespült wurde. Es folgte eine Äquilibrationsphase von ca. 10 Minuten.

Erhöhung der Vorspannung

Die Vorspannung wurde manuell durch Drehen an der Mikrometerschraube schrittweise auf 1 mN, 2 mN, 3 mN, 5 mN und 7 mN erhöht. Dabei konnte die Vorspannung, die auf den Muskel wirkte anhand des Programms LabChart abgelesen werden. Die Vorspannung wurde zweimal in Folge auf die jeweilige Stufe eingestellt.

Der hintere Papillarmuskel wurde aus der Apparatur entnommen und unter dem Mikroskop 2 mit Hilfe mikrochirurgischer Scheren und Pinzetten von Fäden und Myokard der linken Ventrikelwand befreit. Anschließend wurde mittels eines Objektmikrometers der Durchmesser d an der dünnsten Stelle des Muskels bestimmt und der Muskel getrocknet. Unter Annahme einer annähernd runden Querschnittsfläche des Muskels konnte aus dem Durchmesser die Querschnittsfläche A mittels folgender Formeln berechnet werden:

$$\text{Radius } r = d : 2$$

$$\text{Querschnittsfläche } A = r^2 \cdot \pi$$

Die gemessenen Parameter wurden mit der Querschnittsfläche ins Verhältnis gesetzt. Zur möglichen späteren histologischen Beurteilung wurde der Muskel in 4 % Formalin fixiert.

2.2.3 Kraftmessungen gehäuteter Muskelfasern

2.2.3.1 Gewinnung und Lagerung des vorderen Papillarmuskels

Der vordere Papillarmuskel wurde während der Messung am Organbad präpariert und für die Messung der aktiven und passiven Kräfte vorbereitet. Dafür wurden links und rechts vom vorderen Papillarmuskel Schnitte gesetzt und der Muskel samt Myokard der linken Ventrikelwand isoliert. Anschließend wurde der Muskel vom bestehenden Myokard gänzlich befreit. Der vordere Papillarmuskel wurde in einer Vertiefung einer mit Agarose ausgegossenen 6-Loch-Platte gelagert. Dafür wurde dieser an beiden Enden mittels 0,2 mm dicken Minutiennadeln unter leichtem Zug angepinnt. Die Vertiefung wurde anschließend mit 5 ml einer Lösung aus Puffer, Glycerol und zugefügtem Protease-Inhibitor-Cocktail aufgefüllt und bei -20 °C bis zur Messung gelagert (Tabelle 9). Der Muskel war so vor Proteasen geschützt. Glycerol verhinderte die Bildung von Eiskristallen beim Einfrieren, die die Zellen zerstören.

Tabelle 9: Puffer

Konzentration	Chemikalie
75 mM	KCl
10 mM	Tris-HCl
2 mM	MgCl ₂
2 mM	EGTA

Der pH-Wert wurde mittels pH-Meter 2 auf 7,1 bei Raumtemperatur mit Salzsäure (HCl) eingestellt. 24 ml des Puffers wurden mit 25 ml Glycerol vermischt. Eine Protease-Inhibitor-Cocktail Tablette wurde mit 2 ml *Aqua dest.* versetzt und 1 ml für jeweils 49 ml des Gemischs aus Puffer und Glycerol eingesetzt. Die Lösung ist dann bei -20 °C für bis zu 12 Wochen stabil. Der Puffer wurde in größeren Mengen angesetzt und bei -20 °C aufbewahrt.

2.2.3.2 Häutungsvorgang und Präparation der Muskelfasern

Zum Häuten des Papillarmuskels wurde Triton verwendet. Triton wurde zusammen mit der Relaxationslösung, der zuvor Protease- und Phosphatase-Inhibitor sowie Dithiothreitol (DTT) hinzugefügt wurde, angesetzt (Kapitel 2.2.3.4). Zunächst wurden 2 ml einer Relaxationslösung mit 10 % Triton angesetzt. Damit Triton sich lösen konnte, wurde die Suspension mittels Heizblock bei 60 °C unter regelmäßigem Schwenken für ein bis zwei Minuten schonend erhitzt. Aus der 10 %igen Tritonlösung und Relaxationslösung wurde eine 0,5 %ige tritonhaltige Lösung hergestellt. Mehrere vordere Papillarmuskeln konnten in einer rechteckigen Plexiglaskammer mit Abdeckung und Agaroseboden mittels 0,2 mm dicken Minutiennadeln angepinnt werden. Der Kammer wurden 4 ml einer 0,5 %ige tritonhaltige Lösung zugefügt und die Kammer abgedeckt. Die Kammer wurde auf Eis im Kühlraum bei ungefähr 0 °C gelagert und die Muskeln für 16-17 Stunden bei einer Konzentration von 0,5 % Triton gehäutet. Die Kammer befand sich dabei auf einem Schüttler 1, der garantierte, dass beim Häutungsprozess das Kalzium wegtransportiert wurde und die Muskeln mit frischem Triton in Relaxationslösung umspült wurden. Nachdem der Häutungsprozess abgeschlossen war, wurden die Muskeln von Triton befreit. Dafür wurde die Lösung abgenommen, frische Relaxationslösung (Tabelle 10) hinzugegeben und für 15 Minuten auf einem Schüttler 2 geschwenkt. Dies wurde dreimal wiederholt. Die Muskeln wurden auf Eis gelagert.

Die Präparation des vorderen Papillarmuskels erfolgte unter einer Stereolupe mit externer Beleuchtung (Schwanenhals) mittels feiner Pinzetten und einem Skalpell. Der gehäutete Muskel wurde auf einem schwarzen Objektträger in einem Tropfen Relaxationslösung (Tabelle 10) entlang des Faserverlaufs in Streifen geschnitten. Dabei wurde ein Durchmesser von 200-300 Mikrometer (μm) und eine Länge von 1-2 mm angestrebt. Die so entstandenen Fasern wurden in einem mit Relaxationslösung gefüllten Behälter auf Eis gelagert.

2.2.3.3 Versuchsaufbau der Fasermessapparatur

Die aktive und passive Kraftmessung eines Muskels wurde an gehäuteten Muskelfasern sogenannten, *skinned fibers*, durchgeführt. Dabei wird die Membran der Muskelzelle mechanisch oder chemisch zerstört (66) (siehe Kapitel 2.2.3.2). Die Myofilamente bleiben erhalten und kontrahieren, wenn sie mit einer Lösung aus Kalziumionen und ATP in Kontakt kommen (122). Für die Versuche wurde eine Apparatur der Firma MyoTronic UG für Messungen am gehäuteten Muskel verwendet. Das Messinstrument bestand aus einem Galvanometer-Motor und einem Kraftaufnehmer, die in einer Halterung positioniert wurden (Abb. 12). Die Halterung ermöglichte eine genaue Positionierung der genannten Aggregate. Der Galvanometer-Motor, der als Längengeber fungierte, wurde linksseitig befestigt und konnte durch Drehen an Mikrometerschrauben in seiner waagerechten und senkrechten Ausrichtung angepasst werden. Gegenüberliegend war der Kraftaufnehmer angebracht, der ebenfalls in der waagerechten, senkrechten und zusätzlich diagonalen Ebene mittels Mikrometerschrauben ausgerichtet werden konnte. Durch Mikromanipulatoren konnten sehr präzise Bewegungen der Aggregate erzielt werden. Der Galvanometer-Motor und der Kraftaufnehmer verfügten jeweils über feine Pinzetten zur Fixierung der Muskelfaser (Abb. 11). Die Enden einer Muskelfaser wurden hier zwischen den beiden Spitzen der jeweiligen Pinzette positioniert. Durch einen Ring, der die Pinzetten umschloss, wurden die beiden Spitzen zusammengedrückt und so das Faserende stabil befestigt. Die Faser wurde so locker zwischen den beiden Aggregaten aufgespannt. Dies musste zügig geschehen, da die Faser sonst austrocknete und Schaden nahm. Die Fixierung der Faser in der Apparatur wurde mittels eines über den Aggregaten angebrachten Binokulars und einer externen Lichtquelle realisiert. Die Faser wurde bei der Präparation mit Hilfe feiner Pinzetten gefasst.

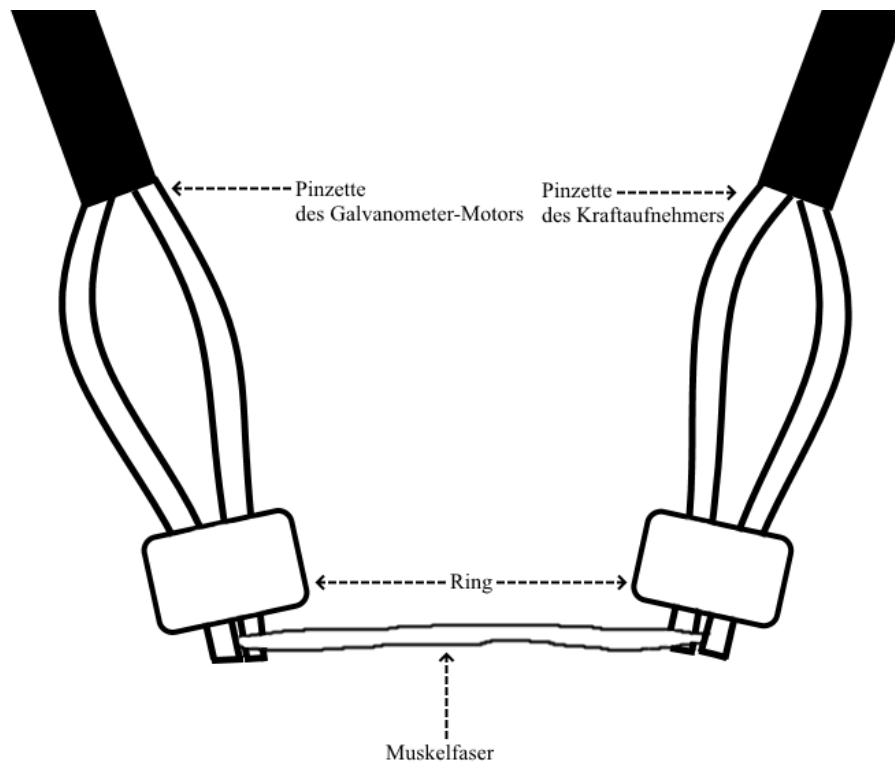


Abb. 11: Fixierung der gehäuteten Muskelfaser in der Messapparatur. Die gehäuteten Muskelfasern wurden mittels Pinzetten in der Messapparatur fixiert. Dabei wurden mittels eines Ringes die Pinzettenspitzen zusammengedrückt und das jeweilige Faserende dazwischen befestigt. Die Muskelfaser spannte sich so zwischen Galvanometer-Motor und Kraftaufnehmer auf.

Unterhalb der Aggregate befand sich ein Küvettensystem aus einem runden Drehtisch mit insgesamt 10 Vertiefungen (Abb. 12). In diese konnten ca. 1 ml fassende runde Gefäße eingebracht werden, die mit Lösung befüllt wurden. Die Halterung samt Aggregaten befand sich oberhalb des Drehtisches und konnte durch einen Hebel abgesenkt werden. Die zwischen den Pinzetten fixierte Faser tauchte dabei in ein Gefäß mit Lösung ein. Ein schneller Wechsel der Lösung wurde durch den speziellen Aufbau des Küvettensystems ermöglicht. Indem die Halterung über den Hebel angehoben wurde, konnte der Drehtisch rotiert werden bis das Gefäß mit der gewünschten Lösung unterhalb der Faser zum Liegen kam. Durch Absenken der Aggregate über den Hebel wurde die Faser in die neue Lösung eingetaucht. Die Faser konnte so nacheinander verschiedenen Lösungen, zum Beispiel Lösungen mit ansteigender Ca^{2+} -Konzentration, ausgesetzt werden. Der Versuch wurde bei Raumtemperatur durchgeführt.

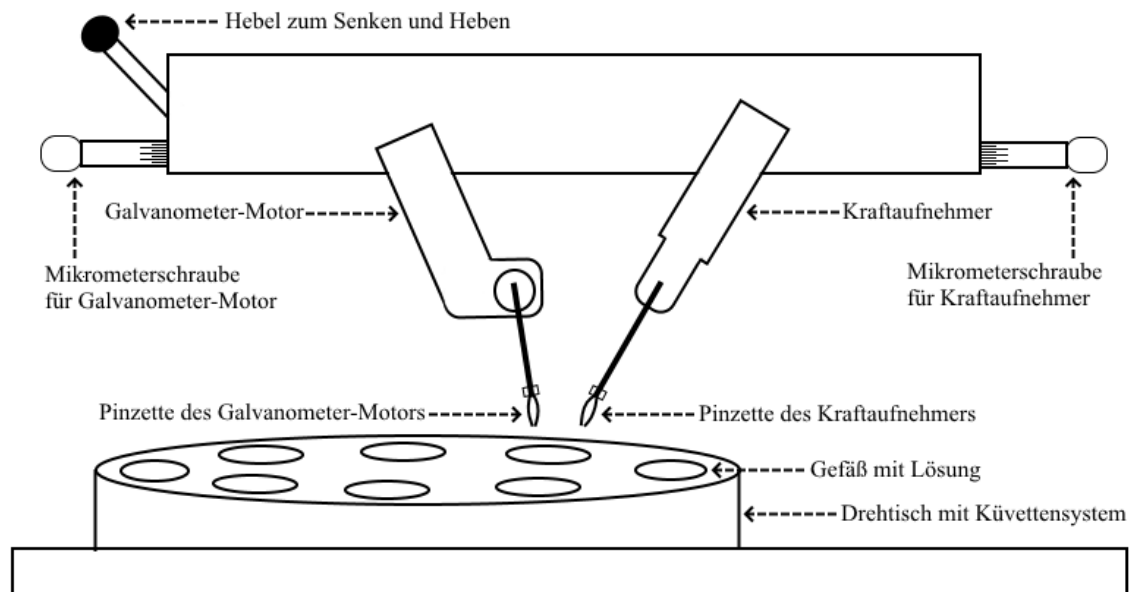


Abb. 12: Schematischer Aufbau der Messapparatur für Fasermessungen. Die Messapparatur verfügt über ein Küvettensystem, in das Gefäße mit Lösungen eingelassen werden können. Durch Absenken der Aggregate konnte die Muskelfaser in eine Lösung eingetaucht werden. Ein Drehtisch ermöglichte das schnelle Wechseln von Lösung zu Lösung. Durch Mikrometerschrauben konnten der Kraftaufnehmer und der Galvanometer-Motor positioniert werden.

Der Kraftaufnehmer, welcher die entwickelte Kraft der Faser maß, war mit einem Verstärker verbunden, bei dem die Verstärkung der Messsignale angepasst werden konnte. Der Verstärker vermittelte die Signale an die Software MyoDat, die die entstandene Kraft darstellte. Der Galvanometer-Motor konnte über die Software MyoDat angesteuert und die Position des Motors sehr präzise verändert werden. Der Motor konnte in der horizontalen Ebene bewegt werden, wodurch die Faser gedehnt wurde. So konnte die Länge der Muskelfaser kontrolliert und die Faser um ein bestimmtes Maß gedehnt werden.

Jede Muskelfaser wurde zunächst locker in der Apparatur fixiert. Durch Drehen an den Mikrometerschrauben wurde der Abstand der Pinzetten vergrößert, bis die gemessene Kraft gerade anzusteigen begann. Die Faser war dann weder gestaucht noch gedehnt, was als Ruhesarkomerlänge bezeichnet wird und bei der die Kraftentwicklung Null ist. Dies wurde daher als Nullpunkt für die Kraftmessung festgelegt. Mittels eines Okularmikrometers wurde die Faserlänge bestimmt, die mit der jeweiligen Vergrößerung des Binokulars multipliziert wurde. Anhand der errechneten Faserlänge konnte ermittelt werden, wie weit der Galvanometer-Motor bewegt werden musste, um eine bestimmte prozentuale Dehnung der Faser zu erreichen. Dies konnte in der Software MyoDat eingestellt werden.

2.2.3.4 Versuchslösungen

Für die Messungen an gehäuteten Muskelfasern wurde eine Relaxationslösung (Tabelle 10) und eine Aktivierungslösung angesetzt (Tabelle 11). Dafür wurden die in Tabelle 2 vorab angesetzten Lösungen verwendet.

Tabelle 10: Zusammensetzung der Relaxationslösung

Konzentration	Chemikalie	100 ml
10 mM	Imidazol	1 ml der Imidazol-Lösung
3 mM	EGTA	1,2 ml der EGTA-Lösung
10 mM	Na ₂ MgATP	20 ml der Na ₂ MgATP-Lösung
3 mM	MgCl ₂	3 ml der MgCl ₂ -Lösung
47.7 mM	Na ₂ CrP	1,22 g Na ₂ CrP
2 mM	DTT	200 µl der DTT-Lösung

Tabelle 11: Zusammensetzung der Aktivierungslösung

Konzentration	Chemikalie	100 ml
10 mM	Imidazol	1 ml der Imidazol-Lösung
3 mM	Ca ²⁺ -EGTA	1,2 ml der Kalzium-EGTA-Lösung
10 mM	Na ₂ MgATP	20 ml der Na ₂ MgATP-Lösung
3 mM	MgCl ₂	3 ml der MgCl ₂ -Lösung
47.7 mM	Na ₂ CrP	1,22 g Na ₂ CrP
2 mM	DTT	200 µl der DTT-Lösung

Der pH-Wert der beiden Lösungen wurde mittels pH-Meter 2 auf 6,85 bei Raumtemperatur mit HCl oder Natronlauge (NaOH) eingestellt. Wenn eine der beiden Lösungen eine größere Menge an HCl oder NaOH zur Einstellung benötigte, wurde der anderen Lösung genau diese Menge an Kaliumchlorid (KCl) zugefügt. Dies ist wichtig, um in den beiden Lösungen gleiche ionische Kräfte zu erhalten. KCl hatte dabei keinen Einfluss auf den pH-Wert der Lösung. Die Lösungen wurden in größeren Mengen angesetzt und bei -20 °C in 10 ml Falcons gelagert. Vor jedem Experiment wurden die benötigten Mengen aufgetaut und jedem 10 ml Falcon 100 µl Protease-Inhibitor-Cocktail (1:100), 400 µl Phosphatase-

Inhibitor-Cocktail (1:25) sowie 20 µl einer 500 mM DTT-Lösung zugesetzt. Der Relaxationslösung, die für die passive Kraftmessung verwendet wurde, wurden zusätzlich noch 3 Milligramm (mg) 2,3-Butandionmonoxim (BDM) hinzugefügt, sodass eine Konzentration von 30 mM vorlag.

2.2.3.5 Aktive Kraftmessungen

Bei der Aktivierung gehäuteter Muskelfasern ist der Kalziumgehalt der Lösung entscheidend. Zur Darstellung des Kalziumgehalts einer Lösung dient der pCa-Wert, der dem negativen dekadischen Logarithmus der Ca^{2+} -Konzentration entspricht. Das bedeutet, dass zum Beispiel ein pCa-Wert von 4,5 einer Ca^{2+} -Konzentration von $10^{-4,5}$ mol/l entspricht. So können auch geringe Ca^{2+} -Konzentrationen vereinfacht dargestellt werden. Bei einem pCa-Wert von 8 und entsprechend einer Ca^{2+} -Konzentration von 10^{-8} mol/l kann keine Kraft generiert werden und man spricht von einer Relaxationslösung. Zur Messung der Ca^{2+} -Sensitivität gehäuteter Muskelfasern muss die Kraftentwicklung einer Faser in Lösungen mit unterschiedlichem Kalziumgehalt gemessen werden. Um Lösungen mit Konzentrationen von weniger als $10^{-4,5}$ mol/l herzustellen, wurden Aktivierungslösung und Relaxationslösung in bestimmten Verhältnissen gemischt. Dabei ging man bei der Aktivierungslösung von einem Kalziumgehalt von 100 % aus, die durch Mischen mit Relaxationslösung (Kalziumgehalt von 0 %) auf Lösungen mit 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % und 95 % Kalziumgehalt verdünnt wurde. Ziel war es, Lösungen mit einem pCa von 5,96 (70 %) / 5,85 (75 %) / 5,72 (80 %) / 5,57 (85 %) / 5,37 (90 %) und 5,06 (95 %) zu erzeugen.

Die Vertiefungen des Küvettensystems wurden mit 90 µl der verschiedenen Lösungen aufgefüllt, sodass die Faser nacheinander unterschiedlichen Lösungen exponiert werden konnte. Zunächst wurde die Faser ausgehend von der Ruhesarkomerlänge um 20 % bzw. auf 120 % gedehnt. Zu Beginn lag die Faser vollständig relaxiert in Relaxationslösung mit einem pCa von 8 vor und wurde dann mit Aktivierungslösung mit einem pCa von 4,5 maximal aktiviert und nachfolgend wieder relaxiert. Dann wurde die Faser schrittweise mit ansteigender Ca^{2+} -Konzentration mit einem pCa von 5,96 / 5,85 / 5,72 / 5,57 / 5,37 / 5,06 und 4,5 aktiviert. Dies wird als Aktivierungsreihe bezeichnet. Für jede Ca^{2+} -Konzentration wurde ein Plateau der Kraftentwicklung abgewartet und so die für die jeweilige Ca^{2+} -Konzentration maximale Kraftentfaltung erreicht. Erst dann wurde die Faser in die Lösung mit der nächsthöheren Ca^{2+} -Konzentration überführt. Abschließend wurde die Faser wieder in Relaxationslösung gebracht und auf ihre Ruhesarkomerlänge verkürzt. Hier wurde auf

eine mögliche Verschiebung der Nulllinie geachtet. Jede Faser durchlief den Messvorgang einmalig. Abb. 13 illustriert den Ablauf des Messvorgangs.

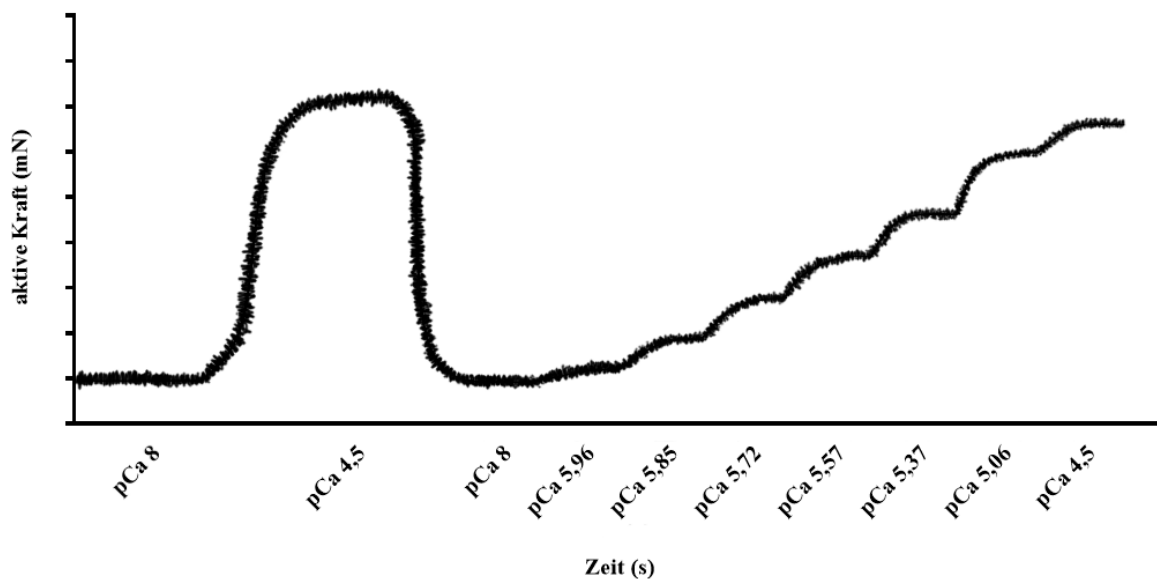


Abb. 13: Schematische Darstellung des typischen Kurvenverlaufs der aktiven Kraftmessung. Aktive Kraftentwicklung gemessen in Millinewton (mN) über die Zeit in Sekunden (s). Gezeigt wird die Aktivierung der Faser mit pCa (negativ dekadischer Logarithmus der Kalziumkonzentration) 4,5 Aktivierungslösung, anschließender Relaxation und folgender Aktivierungsreihe von pCa 8 bis pCa 4,5. Die Aufzeichnung der Daten erfolgte mit Hilfe der Software MyoDat. Bei der Abbildung handelt es sich nicht um eine Originalaufzeichnung.

Bei der Beschreibung der Kraft-Kalzium-Kurve empfiehlt sich die Darstellung relativer Kräfte im Vergleich zu Absolutwerten. Dafür wurden die gemessenen Kräfte der Aktivierungsreihe mit der maximalen Kraft ($F_{\max}$) bei einem pCa von 4,5 in Relation gesetzt. $F_{\max}$ wird entsprechend als 100 % festgelegt und die submaximalen Kräfte bei einem pCa > 4,5 von 0-100 % dargestellt. Bei der graphischen Darstellung der Kraft-Kalzium-Beziehung in einem halblogarithmischen Koordinatensystem ergibt sich so eine sigmoide Kurve. Das Minimum liegt bei einem pCa von 8 mit 0 % und das Maximum bei einem pCa von 4,5 mit 100 %. Von dieser Kraft-Kalzium-Kurve kann die mittlere effektive Konzentration, die EC_{50} , abgeleitet werden. Die EC_{50} bzw. der pCa_{50} ist diejenige Ca^{2+} -Konzentration bzw. der pCa-Wert, bei dem ein halbmaximaler Effekt, also eine halbmaximale Kraftentfaltung beobachtet werden kann. Der pCa_{50} dient dabei als Maß für eine Links- oder Rechtsverschiebung. Ein weiterer Parameter zur Beschreibung der Kraft-Kalzium-Kurven ist der Hill-Koeffizient. Der Hill-Koeffizient gibt die Steigung der Kurve bei halbmaximaler Kraftentfaltung an.

2.2.3.6 Passive Kraftmessungen

Der Relaxationslösung, die für die passive Kraftmessung verwendet wurde, wurde BDM hinzugefügt. BDM ist ein Inhibitor der Myosin-ATPase (123) und verhindert die aktive Kraftentwicklung (124). Die Faser wurde von der Relaxationslösung ohne BDM in Relaxationslösung mit BDM überführt und der Nullpunkt neu eingestellt. Die Faser wurde in 5 Schritten um insgesamt 50 %, das heißt auf 150 %, gedehnt. Dabei wurde die Faser bei jedem einzelnen Schritt um 10 % gedehnt und diese Vordehnung für 10 Sekunden gehalten. Nach dem letzten Dehnungsschritt wurde die Faser wieder auf 100 % Faserlänge bzw. Ruhesarkomerlänge verkürzt. Die passiven Kräfte wurde am Ende jedes Dehnungsschrittes abgelesen, da zu Beginn jedes Dehnungsschrittes falsch hohe Kräfte detektiert wurden. Jede Faser durchlief den Messvorgang nur einmal. In Abb. 14 ist der Messvorgang der passiven Kraftentwicklung dargestellt.

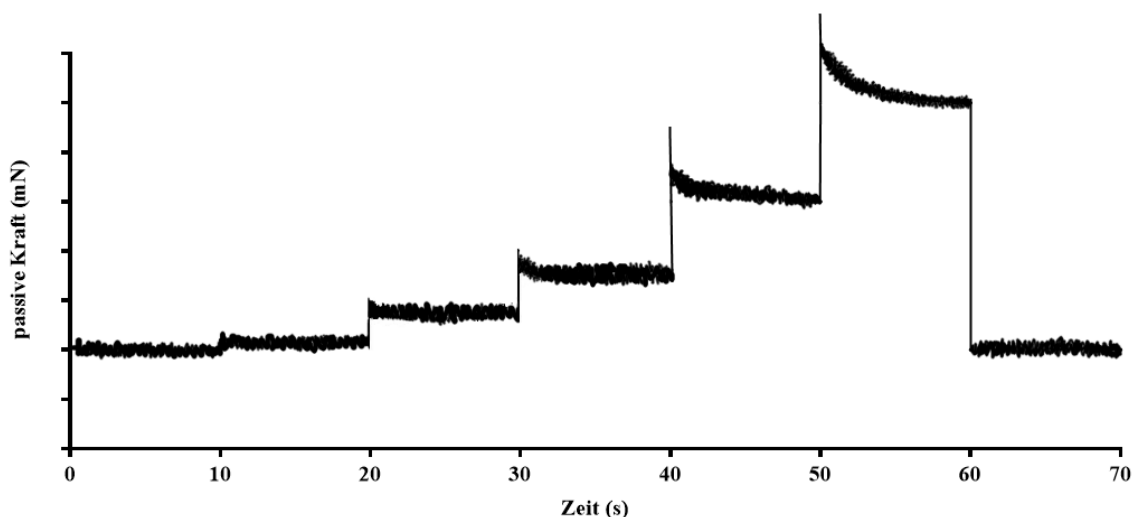


Abb. 14: Schematische Darstellung des typischen Kurvenverlaufs der passiven Kraftmessung. Passive Kraftentwicklung gemessen in Millinewton (mN) über die Zeit in Sekunden (s). Dabei wurde die Muskelfaser ausgehend von 100 % der Faserlänge stufenweise auf 110, 120, 130, 140, 150 % der Faserlänge gedehnt. Jeder Dehnungsschritt wurde dabei 10 Sekunden aufrechterhalten. Abschließend wurde die Muskelfaser wieder auf 100 % Ausgangslänge verkürzt. Die Aufzeichnung der Daten erfolgte mit Hilfe der Software MyoDat. Bei der Abbildung handelt es sich nicht um eine Originalaufzeichnung.

Abschließend wurde die Faser aus der Halterung entfernt und im noch feuchten Zustand mittels Objektmikrometer der Durchmesser d an der dünnsten Stelle der Faser bestimmt. Unter Annahme einer annähernd runden Querschnittsfläche der Faser konnte daraus die Querschnittsfläche A mittels bereits oben genannter Formel berechnet werden. Die in mN gemessenen Kräfte wurden mit der jeweiligen errechneten Querschnittsfläche in Bezug

gesetzt. Zudem mussten die Kräfte durch die eingestellte Verstärkung der Messsignale geteilt werden. Bei den Versuchen wurde eine Verstärkung von zwei eingestellt, weshalb die gemessenen Kräfte durch zwei geteilt wurden.

2.3 Statistische Auswertung

Die gemessenen Werte wurden in eine Excel-Tabelle übertragen und mit der jeweiligen Querschnittsfläche ins Verhältnis gesetzt. Die statistische Auswertung und graphische Darstellung erfolgten mit Graph Pad Prism 9.1.5.

Die Daten zeigten sich normalverteilt. Statistische Unterschiede zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe wurden mittels ungepaartem t-Test sowie durch Varianzanalyse durch *Two-way ANOVA* sowie *mixed-effects analysis* ausgewertet. Anschließend wurde der Šidák *multiple comparison Test* als Post-Hoc-Test für multiple Vergleiche durchgeführt. Die Irrtumswahrscheinlichkeit, das heißt die Wahrscheinlichkeit, eine zutreffende statistische Nullhypothese irrtümlich zu verwerfen, ist als p-Wert angegeben. Eine statistische Signifikanz wurde bei einem p-Wert < 0,05 angenommen. Alle Werte sind als Mittelwert ± Standardfehler des Mittelwerts (*standard error of the mean* [SEM]) dargestellt.

Die Kraft-Kalzium-Beziehung wurde mittels nichtlinearer Regression in sigmoiden Kurven dargestellt. Grundlage dafür war die folgende Formel:

$$F=100*\frac{[Ca^{2+}]^H}{([pCa_{50}]^H+([Ca^{2+}]^H))}$$

F = relative Kraft in % (0-100) bei jeweiliger Ca^{2+} -Konzentration $[Ca^{2+}]$

pCa_{50} = pCa-Wert bei halbmaximaler Kraftentwicklung

H = Hill-Koeffizient, der die Steigung der Kurve bei halbmaximaler Kraftentwicklung angibt

3 Ergebnisse

3.1 *remote* Myokard nach I/R

Die Fragestellungen der vorliegenden Arbeit wurden mit Hilfe von Tiermodellen untersucht. Hierzu wurden Wildtyp-Mäuse nach 60-minütiger Ischämie und Reperfusion von 9-12 Tagen (wt + I/R) mit Wildtyp-Mäusen nach *sham*-OP (wt + *sham*) verglichen. Die Mäuse waren 10-12 Wochen alt. In den Versuchen wurden der vordere und hintere Papillarmuskel des linken Ventrikels untersucht. Diese waren von der Ischämie nicht betroffen und zählten somit zum *remote* Myokard.

Im Folgenden sollen die Ergebnisse der zuvor beschriebenen Versuche dargelegt werden. Dafür werden diese graphisch mittels x-y-Koordinatensystem dargestellt. Dabei ergibt sich jeder Kurvenpunkt aus dem Mittelwert der entsprechenden Einzelwerte. Die Fehlerbalken dienen der Darstellung des Standardfehlers der Mittelwerte. Die Anzahl an gemessenen Muskeln (Organbadmessungen) und der gemessenen Fasern (Messungen der aktiven und passiven Kraftentwicklung) wird mit n angegeben.

3.1.1 Kraftmessungen isolierter Papillarmuskeln am Organbad

3.1.1.1 Basale Bedingungen

Zur Untersuchung der Kontraktilität des *remote* Myokards wurden Versuche am Organbad durchgeführt. Dafür wurde der hintere Papillarmuskel des linken Ventrikels isoliert, präpariert und in einer mit Nährlösung gefüllten Organbadkammer eingebracht. Durch elektrische Stimulation wurde der Papillarmuskel zur Kontraktion angeregt. Auf diese Weise konnte das Kontraktionsverhalten im *remote* Myokard von Wildtyp-Mäusen 9-12 Tage nach Myokardinfarkt zunächst unter basalen Bedingungen untersucht werden. Zum Vergleich dienten *sham*-operierte Wildtyp-Mäuse. Untersucht wurde die Kraftamplitude (F_{amp}), die Geschwindigkeit des Kraftanstiegs ($+dF/dt$) und die Geschwindigkeit des Kraftabfalls ($-dF/dt$) bei konstanter Kontraktionsfrequenz von 1 Hz.

Die unterschiedlichen Gruppengrößen bei den Versuchen am Organbad resultierten zum einen daraus, dass Präparation und Fixierung in der Organbadkammer bei manchen Muskeln misslangen. Zum anderen ließen sich einzelne Muskeln von Beginn an nicht stimulieren oder das Signal ging bereits nach kurzer Zeit verloren.

Beim Vergleich der Kraftamplitude der wt + I/R Gruppe mit der wt + *sham* Gruppe konnte unter basalen Bedingungen kein signifikanter Unterschied festgestellt werden ($p = 0,87$; ungepaarter t-Test). Die Kraftamplitude änderte sich im *remote* Myokard nach I/R nicht (Abb. 15).

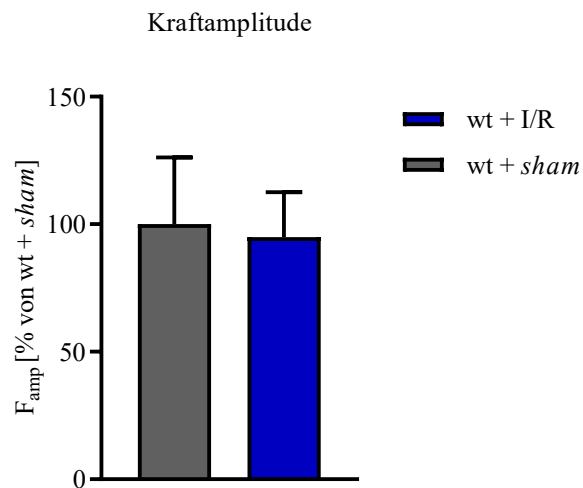


Abb. 15: Relative Kraftamplitude der Papillarmuskeln von Wildtyp-Mäusen nach I/R und *sham*-OP unter basalen Bedingungen. Das Säulendiagramm zeigt die in der jeweiligen Gruppe gemessene durchschnittliche Kraftamplitude (F_{amp}) in Prozent (%) unter basalen Bedingungen. Verglichen wurde die Kraftamplitude der Papillarmuskeln von Wildtyp-Mäusen 9-12 Tage nach Ischämie und anschließender Reperfusion (wt + I/R) mit der von *sham*-operierten Wildtyp-Mäusen ohne myokardiale Ischämie (wt + *sham*). Die Kraftamplitude ist normiert auf die durchschnittliche Kraftamplitude der wt + *sham* Gruppe unter basalen Bedingungen. Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm$ SEM. wt + I/R ($n = 12$); wt + *sham* ($n = 11$). Statistischer Vergleich der Gruppen mittels ungepaarten t-Tests.

Nach I/R änderte sich die Geschwindigkeit des Kraftanstiegs im *remote* Myokard nicht und wt + I/R und wt + *sham* Gruppe zeigten keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,94$; ungepaarter t-Test) (Abb. 16).

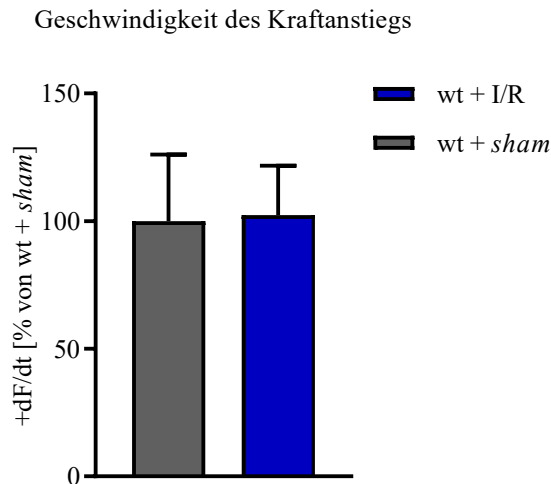


Abb. 16: Relative Geschwindigkeit des Kraftanstiegs der Papillarmuskeln von Wildtyp-Mäusen nach I/R und *sham*-OP unter basalen Bedingungen. Das Säulendiagramm zeigt die in der jeweiligen Gruppe gemessene durchschnittliche Geschwindigkeit des Kraftanstiegs (+dF/dt) in Prozent (%) unter basalen Bedingungen. Verglichen wurde die Geschwindigkeit des Kraftanstiegs der Papillarmuskeln von Wildtyp-Mäusen 9-12 Tage nach Ischämie und anschließender Reperfusion (wt + I/R) mit der von *sham*-operierten Wildtyp- Mäusen ohne myokardiale Ischämie (wt + *sham*). Die Geschwindigkeit des Kraftanstiegs ist normiert auf die durchschnittliche Geschwindigkeit des Kraftanstiegs der wt + *sham* Gruppe unter basalen Bedingungen. Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm$ SEM. wt + I/R (n = 12); wt + *sham* (n = 11). Statistischer Vergleich der Gruppen mittels ungepaarten t-Tests.

Die Geschwindigkeit des Kraftabfalls änderte sich wie auch die Geschwindigkeit des Kraftanstiegs im *remote* Myokard nach I/R nicht. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen der wt + I/R und wt + *sham* Gruppe ($p = 0,98$; ungepaarter t-Test) (Abb. 17).

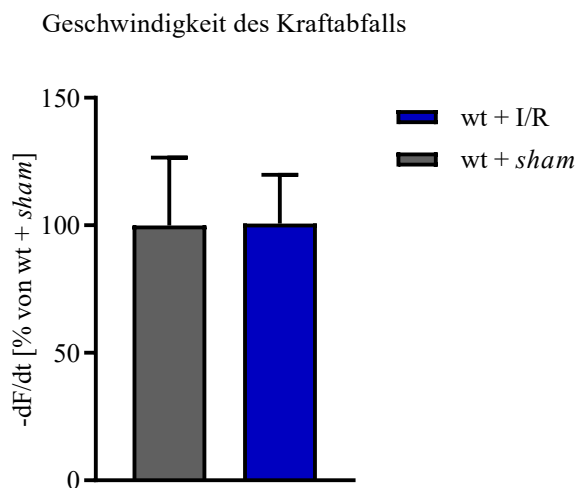


Abb. 17: Relative Geschwindigkeit des Kraftabfalls der Papillarmuskeln von Wildtyp-Mäusen nach I/R und sham-OP unter basalen Bedingungen. Das Säulendiagramm zeigt die in der jeweiligen Gruppe gemessene durchschnittliche Geschwindigkeit des Kraftabfalls ($-dF/dt$) in Prozent (%) unter basalen Bedingungen. Verglichen wurde die Geschwindigkeit des Kraftabfalls der Papillarmuskeln von Wildtyp-Mäusen 9-12 Tage nach Ischämie und anschließender Reperfusion (wt + I/R) mit der von sham-operierten Wildtyp-Mäusen ohne myokardiale Ischämie (wt + sham). Die Geschwindigkeit des Kraftabfalls ist normiert auf die durchschnittliche Geschwindigkeit des Kraftabfalls der wt + sham Gruppe unter basalen Bedingungen. Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm$ SEM. wt + I/R (n = 12); wt + sham (n = 11). Statistischer Vergleich der Gruppen mittels ungepaarten t-Tests.

Zusammenfassend stellt sich unter basalen Bedingungen kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der wt + I/R und wt + sham Gruppe bezüglich der Parameter der Kraftentwicklung dar. Im Folgenden soll daher das Kontraktionsverhalten des *remote* Myokards unter Stressbedingungen untersucht werden.

3.1.1.2 β -adrenerge Rezeptor-Stimulation mit Isoprenalin

Anschließend wurde durch Zugabe von Isoprenalin in die Organbadkammer die kontraktile Funktion unter Stressbedingungen untersucht. Isoprenalin kann als Agonist an β -adrenergen Rezeptoren des Herzens die kardiale Kontraktilität modulieren. Es wirkt dabei stimulierend auf das Herz, erhöht die Kontraktionskraft und führt zur beschleunigten Kontraktion und Relaxation. In den durchgeführten Versuchen wurde die stimulierende Wirkung des Isoprenalins bei konstanter Kontraktionsfrequenz von 1 Hz betrachtet. Zu diesem Zweck wurde die Kraftamplitude sowie die Geschwindigkeit des Kraftanstiegs und -abfalls des hinteren Papillarmuskels nach Stimulation mit Isoprenalin untersucht. Dafür wurden in die Organbadkammer nacheinander bestimmte Mengen Isoprenalin hinzu pipettiert, sodass in der Kammer Konzentrationen von 1 nmol/l, 3 nmol/l, 10 nmol/l, 30 nmol/l, 100 nmol/l,

300 nmol/l und 1000 nmol/l erreicht wurden. Damit sollte die Frage beantwortet werden, ob nach β -adrenerger Rezeptor-Stimulation die Parameter der Kraftentwicklung im *remote* Myokard 9-12 Tage nach Myokardinfarkt mit denen der Kontrollgruppe (*sham*-operierte Wildtyp-Mäuse) vergleichbar sind oder ob Unterschiede bestehen.

Die generierten Messdaten von 12 Papillarmuskeln des *remote* Myokards nach I/R und 11 der *sham*-operierten Gruppe wurden bei der Auswertung berücksichtigt. Mit zunehmender Isoprenalinkonzentration konnten bei einigen Muskeln Extraschläge und Flimmern mit Kontraktionen oberhalb der Stimulationsfrequenz von 1 Hz beobachtet werden. Dies sistierte entweder spontan oder konnte erst durch Ausspülen von Isoprenalin beendet werden. Signale mit Extraschlägen oder Flimmern konnten nicht verwertet werden, sodass für manche Muskeln lediglich Daten bis beispielsweise 100 nmol/l generiert werden konnten. In Abb. 18 ist die relative Anzahl der Papillarmuskeln mit Arrhythmien bei zunehmender Isoprenalinkonzentration dargestellt. Vor allem die wt + I/R Gruppe zeigt bei höheren Isoprenalinkonzentrationen Extraschläge und Flimmern. Ab einer Konzentration von 300 nmol/l Isoprenalin generieren 75 % der Papillarmuskeln nicht verwertbare arrhythmische Signale. In der *sham*-operierten Gruppe fallen im Vergleich weniger Papillarmuskeln mit Arrhythmien auf.

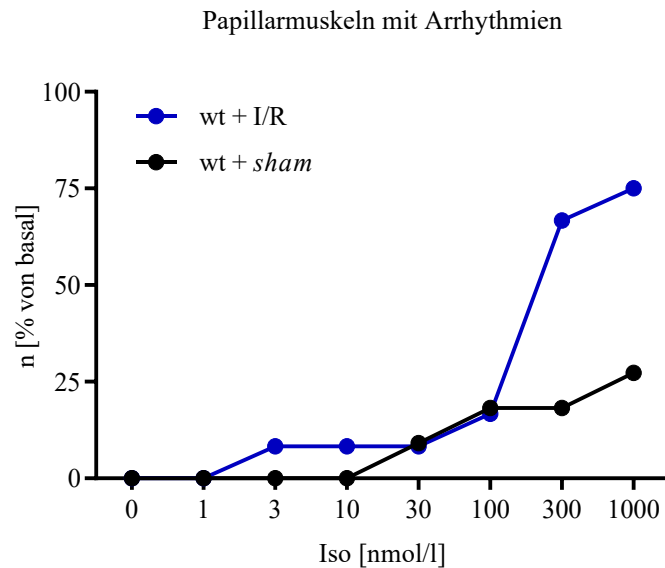


Abb. 18: Papillarmuskeln mit Arrhythmien von Wildtyp-Mäusen nach I/R und *sham*-OP bei β -adrenerger Rezeptor-Stimulation mit Isoprenalin. Dargestellt ist die relative Anzahl der Papillarmuskeln mit Arrhythmien (n) in Prozent (%) bei zunehmender Isoprenalinkonzentration (Iso) in Nanomol pro Liter (nmol/l). Dabei wurde die Anzahl der Papillarmuskeln mit arrhythmischem Signal mit der unter basalen Bedingungen gemessenen Papillarmuskeln ins Verhältnis gesetzt. Verglichen wird die Anzahl der Papillarmuskeln mit Arrhythmien von Wildtyp-Mäusen 9-12 Tage nach Ischämie und anschließender Reperfusion (wt + I/R) mit denen von *sham*-operierten Wildtyp-Mäusen ohne myokardiale Ischämie (wt + *sham*). (n = 12 bei Iso von 0 nmol/l); wt + *sham* (n = 11 bei Iso von 0 nmol/l).

Abb. 19 stellt die Änderung der Kraftamplitude bei β -adrenerger Rezeptor-Stimulation mit Isoprenalin dar. Es zeigt sich, dass mit zunehmender Isoprenalinkonzentration die Kraftamplitude ansteigt. Dabei steigt die Kraftamplitude der wt + I/R und der wt + *sham* Gruppe nahezu gleichartig an. Ab einer Konzentration von 300 nmol/l Isoprenalin konnte eine Abnahme der Kraftamplitude der wt + I/R Gruppe festgestellt werden. Am ehesten ist dies auf den Verlust von Muskel durch Flimmern und Extraschläge ab dieser Konzentration zurückzuführen. Zwischen den beiden Gruppen konnte kein signifikanter Unterschied der Kraftamplitude festgestellt werden ($p = 0,61$; *mixed-effects analysis*).

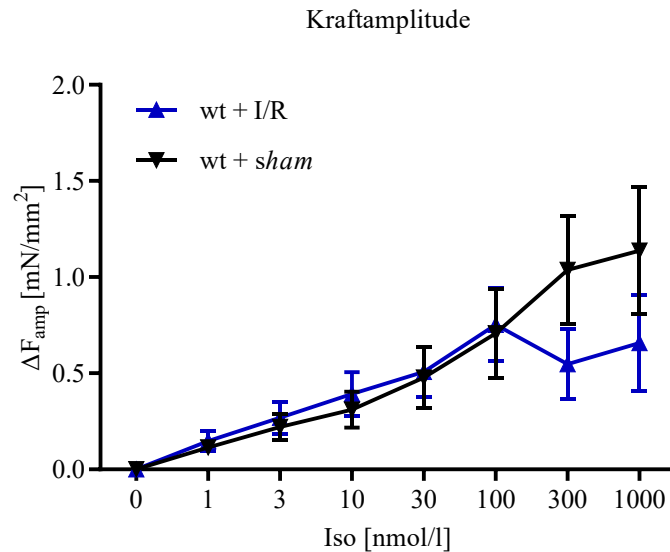


Abb. 19: Änderung der Kraftamplitude der Papillarmuskeln von Wildtyp-Mäusen nach I/R und sham-OP unter β -adrenerger Rezeptor-Stimulation mit Isoprenalin. Aufgetragen ist die in der jeweiligen Gruppe gemessene durchschnittliche Änderung der Kraftamplitude (ΔF_{amp}) in Millinewton pro Quadratmillimeter (mN/mm^2) auf der y-Achse gegen die zunehmende Isoprenalinkonzentration (Iso) in Nanomol pro Liter (nmol/l) auf der x-Achse. Verglichen wurde die Kraftamplitude der Papillarmuskeln von Wildtyp-Mäusen 9-12 Tage nach Ischämie und anschließender Reperfusion (wt + I/R) mit denen von sham-operierten Wildtyp-Mäusen ohne myokardiale Ischämie (wt + sham). Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm$ SEM. wt + I/R ($n = 12$ bei Iso von 0 nmol/l); wt + sham ($n = 11$ bei Iso von 0 nmol/l). Statistischer Vergleich der Gruppen mittels *mixed-effects analysis*.

Die Stimulation mit Isoprenalin führt auch zur Zunahme der Geschwindigkeit des Kraftanstiegs (Abb. 20). So zeigt sich in der wt + I/R Gruppe und auch in der wt + sham Gruppe ein beinahe konformer Anstieg der Geschwindigkeit. Die $+dF/dt$ der wt + I/R Gruppe nimmt ab einer Konzentration von 300 nmol/l Isoprenalin ab. Zwischen den beiden Gruppen konnte kein signifikanter Unterschied der Änderung der Geschwindigkeit des Kraftanstiegs festgestellt werden ($p = 0,64$; *mixed-effects analysis*).

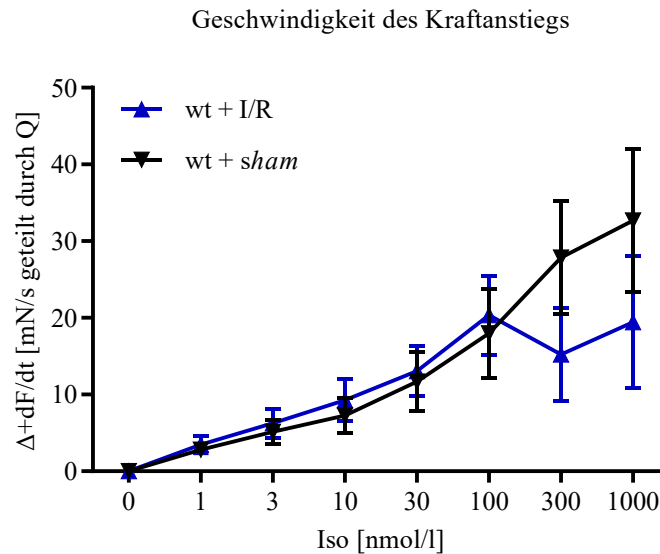


Abb. 20: Änderung der Geschwindigkeit des Kraftanstiegs der Papillarmuskeln von Wildtyp-Mäusen nach I/R und *sham*-OP unter β -adrenerger Stimulation mit Isoprenalin. Aufgetragen ist die in der jeweiligen Gruppe gemessene durchschnittliche Änderung der Geschwindigkeit des Kraftanstiegs ($\Delta+dF/dt$) in Millinewton pro Sekunde (mN/s) geteilt durch die Querschnittsfläche des Muskels (Q) in Quadratmillimeter (mm^2) auf der y-Achse gegen die zunehmende Isoprenalinkonzentration (Iso) in Nanomol pro Liter (nmol/l) auf der x-Achse. Verglichen wurde die Geschwindigkeit des Kraftanstiegs der Papillarmuskeln von Wildtyp-Mäusen 9-12 Tage nach Ischämie und anschließender Reperfusion (wt + I/R) mit denen von *sham*-operierten Wildtyp-Mäusen ohne myokardiale Ischämie (wt + *sham*). Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm$ SEM. wt + I/R (n = 12 bei Iso von 0 nmol/l); wt + *sham* (n = 11 bei Iso von 0 nmol/l). Statistischer Vergleich der Gruppen mittels *mixed-effects analysis*.

Wie die Geschwindigkeit des Kraftanstiegs nahm auch die Geschwindigkeit des Kraftabfalls nach β -adrenerger Rezeptor-Stimulation mit Isoprenalin zu (Abb. 21). Es ließ sich beobachten, dass die Geschwindigkeit des Kraftabfalls bei den beiden Gruppen bis einschließlich 100 nmol/l nahezu gleichartig ansteigt. Danach fällt die $-dF/dt$ der wt + I/R Gruppe ab. Ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen bestand nicht ($p = 0,62$; *mixed-effects analysis*).

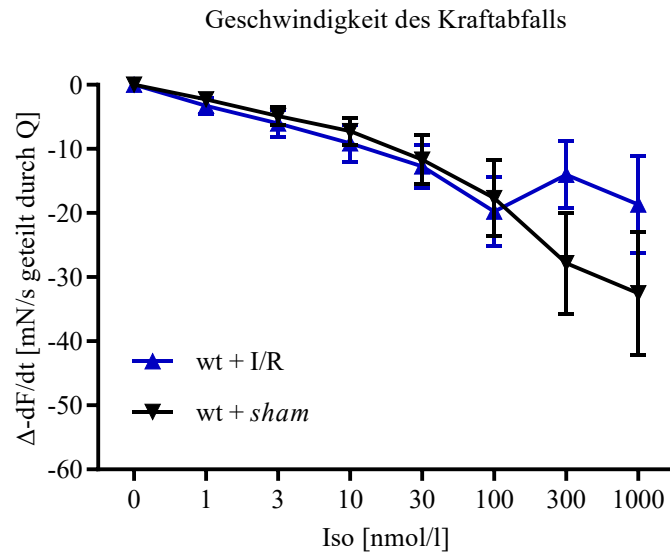


Abb. 21: Änderung der Geschwindigkeit des Kraftabfalls der Papillarmuskeln von Wildtyp-Mäusen nach I/R und *sham*-OP unter β -adrenerger Stimulation mit Isoprenalin. Aufgetragen ist die in der jeweiligen Gruppe gemessene durchschnittliche Änderung der Geschwindigkeit des Kraftabfalls (Δ -dF/dt) in Millinewton pro Sekunde (mN/s) geteilt durch die Querschnittsfläche des Muskels (Q) in Quadratmillimeter (mm^2) auf der y-Achse gegen die zunehmende Isoprenalinkonzentration (Iso) in Nanomol pro Liter (nmol/l) auf der x-Achse. Verglichen wurde die Geschwindigkeit des Kraftabfalls der Papillarmuskeln von Wildtyp-Mäusen 9-12 Tage nach Ischämie und anschließender Reperfusion (wt + I/R) mit denen von *sham*-operierten Wildtyp-Mäusen ohne myokardiale Ischämie (wt + *sham*). Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm$ SEM. wt + I/R (n = 12 bei Iso von 0 nmol/l); wt + *sham* (n = 11 bei Iso von 0 nmol/l). Statistischer Vergleich der Gruppen mittels *mixed-effects analysis*.

Zusammenfassend lässt sich schließen, dass sich die untersuchten Parameter der Kraftentwicklung im *remote* Myokard 9-12 Tage nach I/R unter β -adrenerger Rezeptor-Stimulation unverändert zeigen.

3.1.1.3 Erhöhung der Vorspannung

Im Folgenden wurde die Kraftentwicklung des *remote* Myokards bei zunehmender Vorspannung untersucht. Ziel war es, durch Steigerung der Vorspannung Stress auf das Muskelgewebe auszuüben und den Einfluss auf die kontraktile Funktion zu beurteilen. Hierzu wurde die Vorspannung des Papillarmuskels schrittweise auf 1 mN, 2 mN, 3 mN, 5 mN und 7 mN erhöht. Untersucht wurden die Parameter der Kraftentwicklung wie die Kraftamplitude sowie die Geschwindigkeit des Kraftanstiegs und -abfalls des Papillarmuskels 9-12 Tage nach Myokardinfarkt und nach *sham*-OP.

Es wurden die Messdaten von jeweils 11 Papillarmuskeln in beiden Gruppen ausgewertet. Nicht alle Muskeln konnten jede Vorspannungsstufe erreichen. Denn die weitere Steigerung der Vorspannung führte zu nicht auswertbaren Signalen. Teilweise zeigten sich arrhythmische Signale, aber auch ein kompletter Signalverlust und die Muskeln waren nicht mehr stimulierbar. In manchen Fällen riss der Muskel bei Erhöhung der Vorspannung. In Abb. 22 ist die relative Anzahl an Papillarmuskeln mit Arrhythmien und Signalverlust bei zunehmender Isoprenalinkonzentration dargestellt. So zeigt sich sowohl in der wt + I/R Gruppe als auch in der wt + *sham* Gruppe, dass ein Großteil der Muskeln ab einer Vorspannung von 7 mN arrhythmische Signale aufwies oder sich nicht mehr stimulieren ließ.

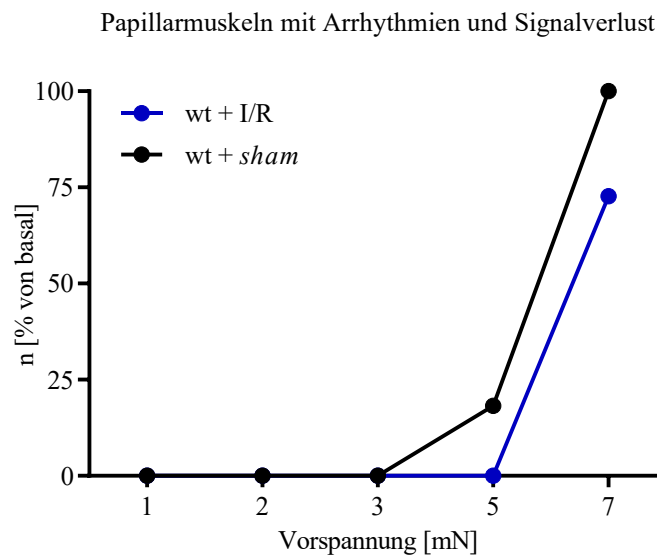


Abb. 22: Papillarmuskeln mit Arrhythmien und Signalverlust von Wildtyp-Mäusen nach I/R und *sham*-OP bei zunehmender Vorspannung. Dargestellt ist die in der jeweiligen Gruppe gemessene relative Anzahl an Papillarmuskeln mit Arrhythmien und Signalverlust (n) in Prozent (%) bei zunehmender Vorspannung in Millinewton (mN). Dabei wurde die Anzahl an Papillarmuskeln mit arrhythmischen Signalen und Signalverlust mit der Anzahl bei einer Vorspannung von 1 mN ins Verhältnis gesetzt. Verglichen wird die Anzahl an Papillarmuskeln mit Arrhythmien und Signalverlust von Wildtyp-Mäusen 9-12 Tage nach Ischämie und anschließender Reperfusion (wt + I/R) mit denen von *sham*-operierten Wildtyp-Mäusen ohne myokardiale Ischämie (wt + *sham*). wt + I/R (n = 11 bei 1 mN); wt + *sham* (n = 11 bei 1 mN).

Die Kraftamplitude der Papillarmuskeln des *remote* Myokards 9-12 Tage nach I/R stieg zunächst mit zunehmender Vorspannung an (Abb. 23). Im Vergleich zur wt + *sham* Gruppe stieg die F_{amp} der wt + I/R Gruppe tendenziell nicht so stark an. Bei einer Vorspannung von 5 mN kam es zum Abfall der Kraftamplitude in beiden Gruppen. Es ließen sich keine

statistisch signifikanten Unterschiede zwischen wt + I/R und wt + *sham* feststellen ($p = 0,8347$; *mixed-effects analysis*).

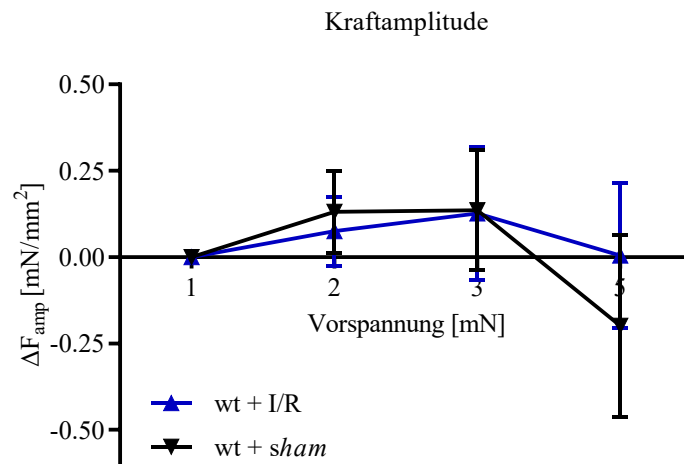


Abb. 23: Änderung der Kraftamplitude der Papillarmuskeln von Wildtyp-Mäusen nach I/R und *sham*-OP bei zunehmender Vorspannung. Aufgetragen ist die in der jeweiligen Gruppe gemessene durchschnittliche Änderung der Kraftamplitude (ΔF_{amp}) in Millinewton pro Quadratmillimeter (mN/mm^2) auf der y-Achse gegen die zunehmende Vorspannung des Papillarmuskels in Millinewton (mN) auf der x-Achse. Verglichen wurde die Kraftamplitude der Papillarmuskeln von Wildtyp-Mäusen 9-12 Tage nach Ischämie und anschließender Reperfusion (wt + I/R) mit denen von *sham*-operierten Wildtyp-Mäusen ohne myokardiale Ischämie (wt + *sham*). Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm$ SEM. wt + I/R ($n = 11$ bei 1 mN); wt + *sham* ($n = 11$ bei 1 mN). Statistischer Vergleich der Gruppen mittels *mixed-effects analysis*.

Es zeigt sich, dass die Geschwindigkeit des Kraftanstiegs mit zunehmender Vorspannung in beiden Gruppen abfällt (Abb. 24). Dabei fällt die $+dF/dt$ des Papillarmuskels nach I/R verglichen mit der $+dF/dt$ nach *sham*-OP beinahe kongruent ab. Erst ab einer Vorspannung von 5 mN zeigt sich ein deutlich geringerer Abfall der Geschwindigkeit des Kraftanstiegs im *remote* Myokard. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen der wt + I/R und wt + *sham* Gruppe ließen sich nicht ermitteln ($p = 0,55$; *mixed-effects analysis*).

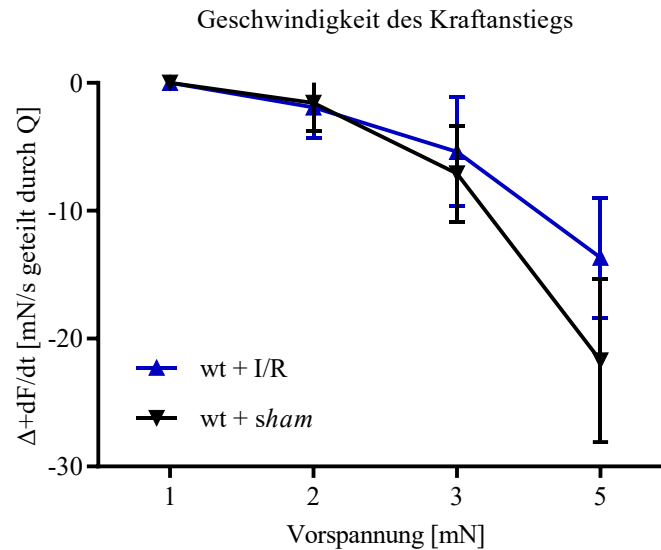


Abb. 24: Änderung der Geschwindigkeit des Kraftanstiegs der Papillarmuskeln von Wildtyp-Mäusen nach I/R und *sham*-OP bei zunehmender Vorspannung. Aufgetragen ist die in der jeweiligen Gruppe gemessene durchschnittliche Änderung der Geschwindigkeit des Kraftanstiegs ($\Delta+dF/dt$) in Millinewton pro Sekunde (mN/s) geteilt durch die Querschnittsfläche des Muskels (Q) in Quadratmillimeter (mm²) auf der y-Achse gegen die zunehmende Vorspannung des Papillarmuskels in Millinewton (mN) auf der x-Achse. Verglichen wurde die Geschwindigkeit des Kraftanstiegs der Papillarmuskeln von Wildtyp-Mäusen 9-12 Tage nach Ischämie und anschließender Reperfusion (wt + I/R) mit denen von *sham*-operierten Wildtyp-Mäusen ohne myokardiale Ischämie (wt + *sham*). Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm$ SEM. wt + I/R (n = 11 bei 1 mN); wt + *sham* (n = 11 bei 1 mN). Statistischer Vergleich der Gruppen mittels *mixed-effects analysis*.

Die Geschwindigkeit des Kraftabfalls nahm mit zunehmender Vorspannung in beiden Gruppen ab (Abb. 25). Dabei zeigt sich im Vergleich zur wt + *sham* Gruppe ein tendenziell geringerer Abfall der $-dF/dt$ in der wt + I/R Gruppe. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen konnten nicht festgestellt werden ($p = 0,60$; *mixed-effects analysis*).

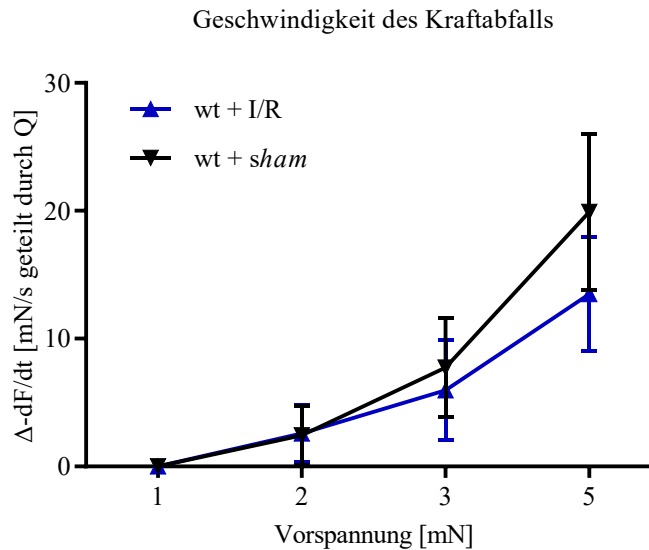


Abb. 25: Änderung der Geschwindigkeit des Kraftabfalls der Papillarmuskeln von Wildtyp-Mäusen nach I/R und *sham*-OP bei zunehmender Vorspannung. Aufgetragen ist die in der jeweiligen Gruppe gemessene durchschnittliche Änderung der Geschwindigkeit des Kraftabfalls ($\Delta\text{-dF/dt}$) in Millinewton pro Sekunde (mN/s) geteilt durch die Querschnittsfläche des Muskels (Q) in Quadratmillimeter (mm^2) auf der y-Achse gegen die zunehmende Vorspannung des Papillarmuskels in Millinewton (mN) auf der x-Achse. Verglichen wurde die Geschwindigkeit des Kraftabfalls der Papillarmuskeln von Wildtyp-Mäusen 9-12 Tage nach Ischämie und anschließender Reperfusion (wt + I/R) mit denen von *sham*-operierten Wildtyp-Mäusen ohne myokardiale Ischämie (wt + *sham*). Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm$ SEM. wt + I/R (n = 11 bei 1 mN); wt + *sham* (n = 11 bei 1 mN). Statistischer Vergleich der Gruppen mittels *mixed-effects analysis*.

3.1.2 Aktive Kraftmessungen an gehäuteten Muskelfasern

Die Messungen der aktiven Kraftentwicklung wurde an gehäuteten Muskelfasern des vorderen Papillarmuskels des linken Ventrikels durchgeführt. Hierzu wurden die Papillarmuskeln einem Häutungsprozess unterzogen und aus ihnen Muskelfasern isoliert. Die vorgespannte gehäutete Muskelfaser wurde anschließend Lösungen mit unterschiedlichem Kalziumgehalt bzw. unterschiedlichem pCa-Wert ausgesetzt und die aktiven Kräfte gemessen. Zunächst lag die Faser in Relaxationslösung (pCa 8) vor, wurde anschließend mittels Aktivierungslösung mit einem pCa von 4,5 maximal aktiviert und wieder relaxiert (pCa 8). Es folgte eine Aktivierungsreihe mit Lösungen ansteigender Ca^{2+} -Konzentrationen (pCa 5,96 / 5,85 / 5,72 / 5,57 / 5,37 / 5,06) bis zu einem pCa von 4,5.

Aufgrund von Problemen bei der Präparation und Fixierung in der Messapparatur konnte nicht bei allen Muskelfasern die aktive Kraftentwicklung untersucht werden. Dies erklärt die unterschiedlichen Gruppengrößen.

3.1.2.1 Ca^{2+} -Sensitivität

Die Messung der aktiven Kräfte in Lösungen ansteigender Ca^{2+} -Konzentrationen erlaubt es, die Ca^{2+} -Sensitivität der Muskelfasern zu ermitteln. Auf diese Weise wurde untersucht, ob das *remote* Myokard 9-12 Tage nach I/R eine veränderte Ca^{2+} -Sensitivität aufweist.

Zur Ermittlung der Ca^{2+} -Sensitivität wurden die Muskelfasern nacheinander Lösungen mit ansteigender Ca^{2+} -Konzentrationen ausgesetzt, sodass eine Aktivierungsreihe entstand. Die aktiv generierten Kräfte der Muskelfasern wurden dabei in Millinewton pro Quadratmillimeter (mN/mm^2) gemessen. Im Folgenden wurden die Kräfte der Aktivierungsreihe mit $F_{\max}$ bei einem pCa von 4,5 in Bezug gesetzt. Dabei wurde $F_{\max}$ als 100 % festgelegt und die Kräfte der Aktivierungsreihe (bei pCa 8 / 5,96 / 5,85 / 5,72 / 5,57 / 5,37 / 5,06) als relative Kräfte (F [%]) von 0-100 % dargestellt (Abb. 26). Als $F_{\max}$ wurde dabei immer die zweite maximale Aktivierung bei pCa 4,5 nach der Aktivierungsreihe definiert. Dabei wurden gehäutete Muskelfasern des vorderen Papillarmuskels 9-12 Tage nach Myokardinfarkt und nach *sham*-Op verwendet.

Der pCa_{50} -Wert ist diejenige Ca^{2+} -Konzentration, bei der eine halbmaximale Kraftentfaltung beobachtet werden kann und dient als Maß für eine Links- oder Rechtsverschiebung der Kraft-Kalzium-Kurve. Beim Vergleich der pCa_{50} -Werte der wt + I/R Gruppe mit der wt + *sham* Gruppe zeigte sich ein tendenziell höherer pCa_{50} -Wert für die Gruppe mit I/R, allerdings ohne statistische Signifikanz (wt + I/R: $5,591 \pm 0,04$ vs. wt + *sham*: $5,510 \pm 0,04$; $p = 0,18$; ungepaarter t-Test). Abb. 26 zeigt eine leichte Linksverschiebung der Kraft-Kalzium-Kurve, was für eine tendenziell gesteigerte Ca^{2+} -Sensitivität der Muskelfasern der wt + I/R Mäuse spricht. Die Calciumsensitivität ist um 0,081 pCa_{50} -Einheiten gesteigert. Auch der Hill-Koeffizient, der die Steigung der Kurve bei halbmaximaler Kraftentfaltung angibt, zeigte sich bei der wt + I/R Gruppe verglichen mit der wt + *sham* Gruppe erhöht (wt + *sham*: $4,12 \pm 0,35$ vs. wt + I/R: $4,86 \pm 1,19$; $p = 0,51$; ungepaarter t-Test). Statistisch signifikant war dieser Unterschied nicht.

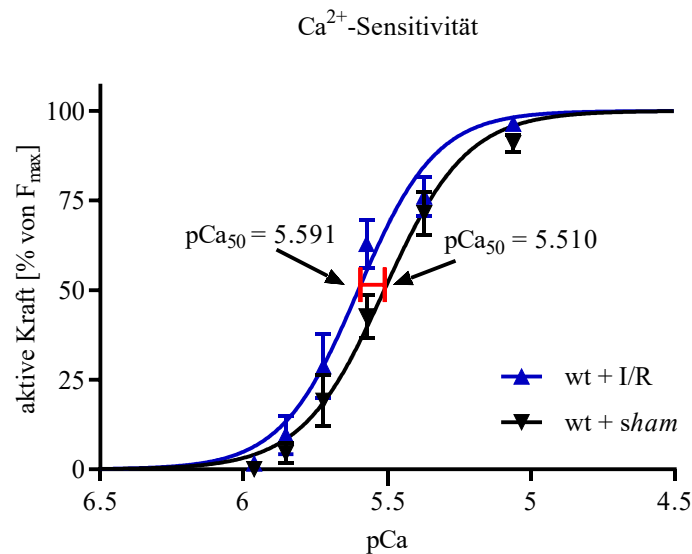


Abb. 26: Ca²⁺-Sensitivität gehäuteter Muskelfasern von Wildtyp-Mäusen nach I/R und *sham*-OP. Aufgetragen ist die normierte relative Kraft in Prozent im Bezug zur Maximalkraft (F_{max}) von 100 % auf der y-Achse gegen den negativ dekadischen Logarithmus der Kalziumkonzentration in der vorliegenden Lösung (pCa) auf der x-Achse. Eine sigmoidale Kraft-Kalzium-Kurve entsteht. Verglichen wurden die aktiven Kräfte gehäuteter Muskelfasern des Myokards von Wildtyp-Mäusen 9-12 Tage nach Ischämie und anschließender Reperfusion (wt + I/R) mit denen von *sham*-operierten Wildtyp-Mäusen ohne myokardiale Ischämie (wt + *sham*). Es zeigt sich eine leichte Linksverschiebung der Kraft-Kalzium-Kurve der wt + I/R Gruppe mit nicht signifikant erhöhtem pCa₅₀-Wert von 5,591 ± 0,04 der wt + I/R Gruppe im Vergleich zur wt + *sham* Gruppe mit einem pCa₅₀-Wert von 5,510 ± 0,04 (p = 0,18; ungepaarter t-Test). pCa₅₀-Differenz von 0,081. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM. wt + I/R (n = 10); wt + *sham* (n = 12).

3.1.2.2 Maximale aktive Kraftentwicklung

Die maximal entwickelte aktive Kraft (F_{max}) in mN/mm² der Muskelfasern wurde bei einem pCa von 4,5 erreicht. Berücksichtigt wurde hier lediglich die zweite maximale Aktivierung der Fasern am Ende einer Aktivierungsreihe. Die Ergebnisse werden als Mittelwerte ± SEM angegeben und sind in Abb. 27 dargestellt.

Die F_{max} der wt + I/R Gruppe zeigte sich im Vergleich zur wt + *sham* Gruppe tendenziell leicht erhöht. So erreichten die wt + I/R Gruppe im Mittel eine F_{max} von 30 ± 6 mN/mm². In der wt + *sham* Gruppe ergab sich eine niedrigere F_{max} von 26 ± 6 mN/mm². Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant (p = 0,68; ungepaarter t-Test).

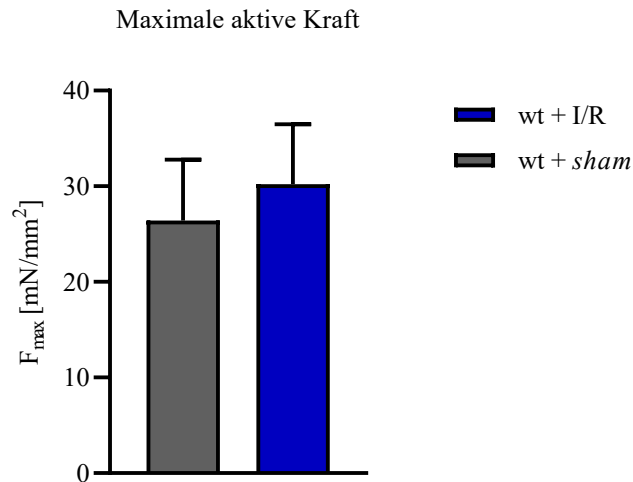


Abb. 27: Maximale aktive Kraftentwicklung gehäuteter Muskelfasern von Wildtyp-Mäusen nach I/R und sham-OP. Das Säulendiagramm zeigt die in der jeweiligen Gruppe gemessene maximal entwickelte aktive Kraft ($F_{\max}$) in Millinewton pro Quadratmillimeter (mN/mm²) von gehäuteten Muskelfasern, die bei einem pCa von 4,5 gemessen wurde. Verglichen wurde die $F_{\max}$ gehäuteter Muskelfasern des Myokards von Wildtyp-Mäusen 9-12 Tage nach Ischämie und anschließender Reperfusion (wt + I/R) mit der von sham-operierten Wildtyp-Mäusen ohne myokardiale Ischämie (wt + sham). Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm$ SEM. wt + I/R (n = 10); wt + sham (n = 12). Statistischer Vergleich der Gruppen mittels ungepaarten t-Tests.

3.1.3 Passive Kraftmessungen an gehäuteten Muskelfasern

Um herauszufinden, ob ein Myokardinfarkt Einfluss auf die passive Steifigkeit des *remote* Myokards hat, wurden Messungen der passiven Kraft an gehäuteten Muskelfasern durchgeführt. Dafür wurden Muskelfasern des vorderen Papillarmuskels von Mäusen 9-12 Tage nach I/R und von sham-operierten Mäusen ohne I/R untersucht. Die Messungen wurden unter Relaxationsbedingungen durchgeführt. Die Muskelfaser lag dabei in Relaxationslösung mit BDM vor und wurde in fünf Dehnungsschritten auf 150 % der Ausgangslänge gedehnt. Die Ruhesarkomerlänge wurde als Ausgangslänge festgelegt. Jede Faserlänge wurde dabei für 10 Sekunden aufrechterhalten. Die generierten Kräfte wurden am Ende jedes Dehnungsschrittes abgelesen.

Wie auch bei der Messung der aktiven Kraftentwicklung resultieren die unterschiedlichen Gruppengrößen daraus, dass Präparation und Fixierung in der Messapparatur misslingen und Daten für die passive Kraftentwicklung nicht generiert werden konnten.

Die passive Kraft der wt + I/R Gruppe zeigte sich im Vergleich zur wt + sham Gruppe tendenziell erhöht (Abb. 28). Dabei zeigte sich die passive Kraft der wt + I/R Gruppe nicht über den gesamten Kurvenverlauf erhöht, sondern stieg erst mit zunehmender Faserdehnung

an. Es konnte kein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt werden ($p = 0,13$; *two-way* ANOVA). Zusammenfassend zeigte sich eine nicht signifikant erhöhte passive Steifigkeit des *remote* Myokards.

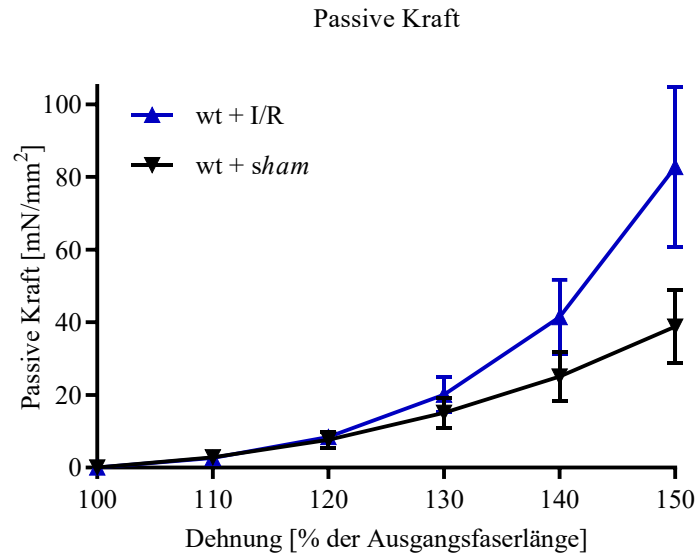


Abb. 28: Passive Kraftentwicklung gehäuteter Muskelfasern von Wildtyp-Mäusen nach I/R und *sham-OP*. Aufgetragen ist die in der jeweiligen Gruppe gemessene durchschnittliche passive Kraft in Millinewton pro Quadratmillimeter (mN/mm^2) auf der y-Achse gegen die Dehnung der Muskelfaser in Prozent (%) auf der x-Achse. Verglichen wurden die passiven Kräfte gehäuteter Muskelfasern des Myokards von Wildtyp-Mäusen 9-12 Tage nach Ischämie und anschließender Reperfusion (wt + I/R) mit denen von *sham*-operierten Wildtyp-Mäusen ohne myokardiale Ischämie (wt + *sham*). Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm$ SEM. wt + I/R ($n = 11$); wt + *sham* ($n = 14$). Statistischer Vergleich der Gruppen mittels *two-way* ANOVA.

3.2 Diabetisches Myokard

Die Fragestellungen der vorliegenden Arbeit wurden mit Hilfe von Tiermodellen untersucht. Hierzu wurden homozygote Leptinrezeptor-defiziente db/db-Mäuse mit heterozygoten db/+ Mäusen im Alter von 10-12 Wochen verglichen. Die db/db-Mäuse sind ein etablierteres Tiermodell für den Diabetes mellitus Typ 2 (siehe Kapitel 1.5.3). Die db/+ Mäuse dienten als Kontrollgruppe.

Im Folgenden sollen die Ergebnisse der zuvor beschriebenen Versuche dargelegt werden. Dafür werden diese graphisch mittels x-y-Koordinatensystem dargestellt. Dabei ergibt sich jeder Kurvenpunkt aus dem Mittelwert der entsprechenden Einzelwerte. Die Fehlerbalken dienen der Darstellung des Standardfehlers der Mittelwerte. Die Anzahl an gemessenen

Muskeln (Organbadmessungen) und der gemessenen Fasern (Messungen der aktiven und passiven Kraftentwicklung) wird mit n angegeben.

3.2.1 Kraftmessungen isolierter Papillarmuskeln am Organbad

3.2.1.1 Basale Bedingungen

Zur Untersuchung der Kontraktilität des diabetischen Myokards wurden Versuche am Organbad durchgeführt. Dafür wurde der hintere Papillarmuskel des linken Ventrikels isoliert, präpariert und in einer mit Nährlösung gefüllten Organbadkammer eingebracht. Durch elektrische Stimulation wurde der Papillarmuskel zur Kontraktion angeregt. Auf diese Weise konnte das Kontraktionsverhalten im diabetischen Myokard von Mäusen zunächst unter basalen Bedingungen untersucht werden. Zum Vergleich dienten Mäuse ohne diabetische Stoffwechsellage. Untersucht wurde die Kraftamplitude, die Geschwindigkeit des Kraftanstiegs und -abfalls bei konstanter Kontraktionsfrequenz von 1 Hz.

Auch bei der db/db und der db/+ -Gruppe konnten nicht alle im Organbad untersuchten Papillarmuskeln bei der Analyse berücksichtigt werden, sodass unterschiedliche Gruppengrößen entstanden. Grund waren auch hier Probleme bei der Präparation und Fixierung in der Organbadkammer. Zudem ließen sich manche Muskeln nicht stimulieren.

Die Kraftamplitude der db/db-Gruppe zeigte sich im Vergleich mit der db/+ -Gruppe signifikant erhöht ($p = 0,0193^*$; ungepaarter t-Test). Dabei ist die relative Kraftamplitude des hinteren Papillarmuskels diabetischer Mäuse um $186 \pm 73 \%$ erhöht (Abb. 29).

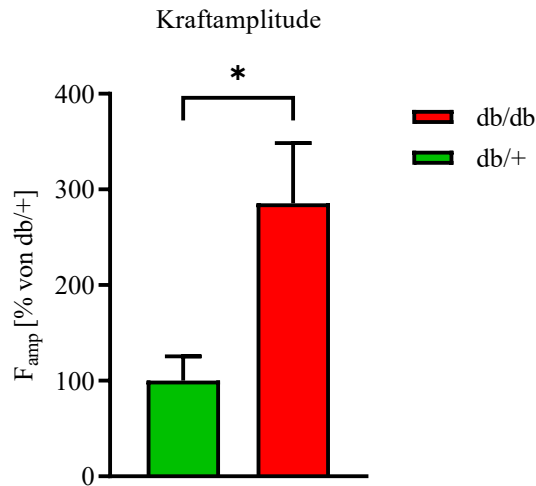


Abb. 29: Relative Kraftamplitude der Papillarmuskeln diabetischer (db/db) und nicht-diabetischer (db/+) Mäuse unter basalen Bedingungen. Das Säulendiagramm zeigt die in der jeweiligen Gruppe gemessene durchschnittliche Kraftamplitude (F_{amp}) in Prozent (%) unter basalen Bedingungen. Verglichen wurde die Kraftamplitude der Papillarmuskeln diabetischer (db/db) und nicht-diabetischer (db/+) Mäuse. Die Kraftamplitude ist normiert auf die durchschnittliche Kraftamplitude der db/+ -Gruppe unter basalen Bedingungen. Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm$ SEM. db/db ($n = 12$); db/+ ($n = 10$). Statistische Signifikanz ist mit einem Stern markiert. * entspricht $p\text{-Wert} \leq 0,05$. Statistischer Vergleich der Gruppen mittels ungepaarten t-Tests.

Auch die Geschwindigkeit des Kraftanstiegs zeigte sich bei der db/db-Gruppe im Vergleich zur db/+ -Gruppe signifikant erhöht ($p = 0,0301^*$; ungepaarter t-Test). Die relative Geschwindigkeit des Kraftanstiegs der Papillarmuskeln diabetischer Mäuse ist dabei um $173 \pm 74 \%$ erhöht (Abb. 30).

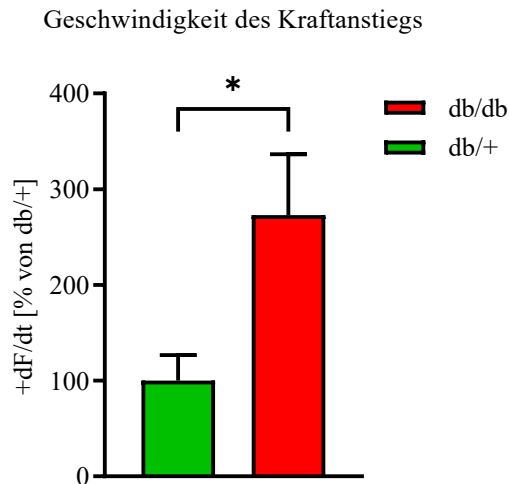


Abb. 30: Relative Geschwindigkeit des Kraftanstiegs der Papillarmuskeln diabetischer (db/db) und nicht-diabetischer (db/+) Mäuse unter basalen Bedingungen. Das Säulendiagramm zeigt die in der jeweiligen Gruppe gemessene durchschnittliche Geschwindigkeit des Kraftanstiegs (+dF/dt) in Prozent (%) unter basalen Bedingungen. Verglichen wurde die Geschwindigkeit des Kraftanstiegs der Papillarmuskeln diabetischer (db/db) und nicht-diabetischer (db/+) Mäuse. Die Geschwindigkeit des Kraftanstiegs ist normiert auf die durchschnittliche Geschwindigkeit des Kraftanstiegs der db/+ -Gruppe unter basalen Bedingungen. Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm$ SEM. db/db (n = 12); db/+ (n = 10). Statistische Signifikanz ist mit einem Stern markiert. * entspricht p-Wert $\leq 0,05$. Statistischer Vergleich der Gruppen mittels ungepaarten t-Tests.

Beim Vergleich der Geschwindigkeit des Kraftabfalls der beiden Gruppen fiel eine erhöhte -dF/dt der db/db-Gruppe auf. Die Geschwindigkeit des Kraftabfalls der Papillarmuskeln der db/db-Mäuse war verglichen mit der der db/+ -Mäuse um 201 ± 76 % signifikant erhöht (p = 0,0157*; ungepaarter t-Test) (Abb. 31).

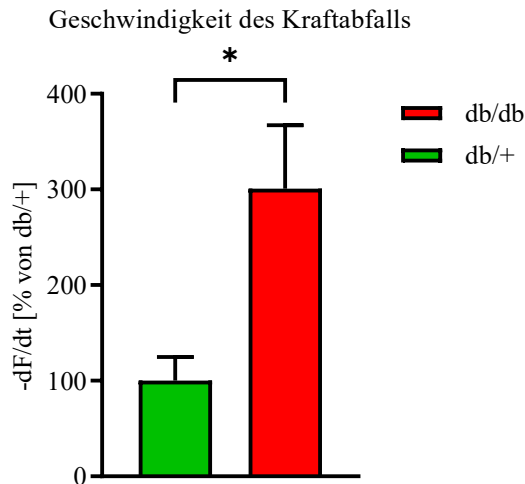


Abb. 31: Relative Geschwindigkeit des Kraftabfalls der Papillarmuskeln diabetischer (db/db) und nicht-diabetischer (db/+) Mäuse unter basalen Bedingungen. Das Säulendiagramm zeigt die in der jeweiligen Gruppe gemessene durchschnittliche Geschwindigkeit des Kraftabfalls ($-dF/dt$) in Prozent (%) unter basalen Bedingungen. Verglichen wurde die Geschwindigkeit des Kraftabfalls der Papillarmuskeln diabetischer (db/db) und nicht-diabetischer (db/+) Mäuse. Die Geschwindigkeit des Kraftabfalls ist normiert auf die durchschnittliche Geschwindigkeit des Kraftabfalls der db/+ -Gruppe unter basalen Bedingungen. Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm$ SEM. db/db (n = 12); db/+ (n = 10). Statistische Signifikanz ist mit einem Stern markiert. * entspricht p-Wert $\leq 0,05$. Statistischer Vergleich der Gruppen mittels ungepaarten t-Tests.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass sowohl die Kraftamplitude als auch die Geschwindigkeit des Kraftanstiegs und -abfalls des diabetischen Myokards unter basalen Bedingungen erhöht ausfallen. Anschließend sollte daher die kontraktile Funktion des diabetischen Myokards unter Stressbedingungen untersucht werden.

3.2.1.2 β -adrenerge Rezeptor-Stimulation mit Isoprenalin

Im Folgenden wurde das Kontraktionsverhalten des diabetischen Myokards bei β -adrenerger Rezeptor-Stimulation mit Isoprenalin untersucht (siehe Kapitel 3.1.1.2). Hierzu wurden die Kraftamplitude sowie die Geschwindigkeit des Kraftanstiegs und -abfalls des hinteren Papillarmuskels bei zunehmender Isoprenalinkonzentration von 1 nmol/l, 3 nmol/l, 10 nmol/l, 30 nmol/l, 100 nmol/l, 300 nmol/l und 1000 nmol/l gemessen. Damit sollte die Frage beantwortet werden, ob nach β -adrenerger Rezeptor-Stimulation die Parameter der Kraftentwicklung im diabetischen Myokard sich von denen der nicht-diabetischen Kontrollgruppe (db/+) unterscheiden oder ob diese vergleichbar sind.

Die generierten Messdaten von 12 Papillarmuskeln der db/db-Gruppe und 10 der db/+ -Gruppe wurden bei der Auswertung berücksichtigt. Auch bei diesen beiden Gruppen

konnten Flimmern und Extraschläge bei zunehmender Isoprenalinkonzentration beobachtet werden (siehe Kapitel 3.1.1.2). Diese Signale konnten nicht verwertet werden. In Abb. 32 ist die relative Anzahl der Papillarmuskeln mit Arrhythmien bei zunehmender Isoprenalinkonzentration dargestellt. Bei den db/db und db/+ -Mäusen zeigt eine vergleichbare Anzahl an Papillarmuskeln arrhythmische Signale unter Stimulation mit Isoprenalin.

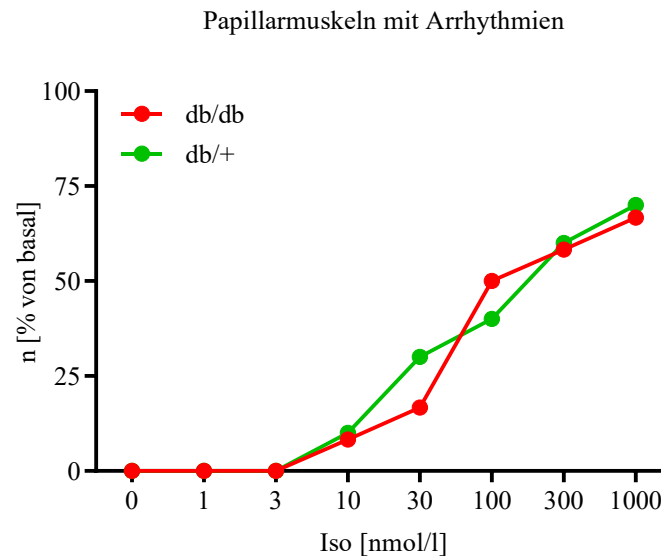


Abb. 32: Papillarmuskeln mit Arrhythmien diabetischer (db/db) und nicht-diabetischer (db/+) Mäuse bei β -adrenerger Rezeptor-Stimulation mit Isoprenalin. Dargestellt ist die relative Anzahl der Papillarmuskeln mit Arrhythmien (n) in Prozent (%) bei zunehmender Isoprenalinkonzentration (Iso) in Nanomol pro Liter (nmol/l). Dabei wurde die Anzahl der Papillarmuskeln mit arrhythmischem Signal mit der unter basalen Bedingungen gemessenen Papillarmuskeln ins Verhältnis gesetzt. Verglichen wird die Anzahl der Papillarmuskeln mit Arrhythmien diabetischer (db/db) und nicht-diabetischer (db/+) Mäuse. db/db (n = 12 bei Iso von 0 nmol/l); db/+ (n = 10 bei Iso von 0 nmol/l).

Die Kraftamplitude der diabetischen und nicht-diabetischen Papillarmuskeln steigt mit zunehmender Isoprenalinkonzentration an (Abb. 33). Die Kraftamplitude der db/db-Gruppe nimmt dabei wesentlich stärker zu als die der db/+ -Gruppe. Es besteht ein statistisch signifikanter Unterschied der Kraftamplitude zwischen db/db und db/+ ($p = 0.0091^{**}$; *mixed-effects analysis*).

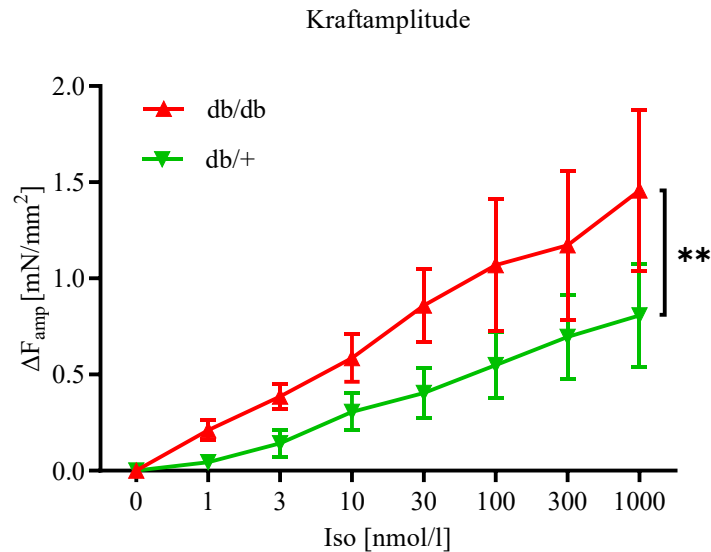


Abb. 33: Änderung der Kraftamplitude der Papillarmuskeln diabetischer (db/db) und nicht-diabetischer (db/+) Mäuse unter β -adrenerger Rezeptor-Stimulation mit Isoprenalin. Aufgetragen ist die in der jeweiligen Gruppe gemessene durchschnittliche Änderung der Kraftamplitude (ΔF_{amp}) in Millinewton pro Quadratmillimeter (mN/mm²) auf der y-Achse gegen die zunehmende Isoprenalinkonzentration (Iso) in Nanomol pro Liter (nmol/l) auf der x-Achse. Verglichen wurde die Kraftamplitude der Papillarmuskeln diabetischer (db/db) und nicht-diabetischer (db/+) Mäuse. Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm$ SEM. db/db (n = 12 bei Iso von 0 nmol/l); db/+ (n = 10 bei Iso von 0 nmol/l). Statistische Signifikanz ist mit einem Stern markiert. ** entspricht p-Wert ≤ 0.01 . Statistischer Vergleich der Gruppen mittels *mixed-effects analysis*.

Die Stimulation mittels Isoprenalin hat zudem Einfluss auf die Geschwindigkeit des Kraftanstiegs und so nimmt diese sowohl in der db/db als auch in der db/+ -Gruppe zu (Abb. 34). Die $+dF/dt$ von Papillarmuskeln der db/db-Gruppe steigt dabei stärker an als die der db/+ -Gruppe. Es besteht ein statistisch signifikanter Unterschied der Geschwindigkeit des Kraftanstiegs zwischen db/db und db/+ ($p = 0,0069^{**}$; *mixed-effects analysis*).

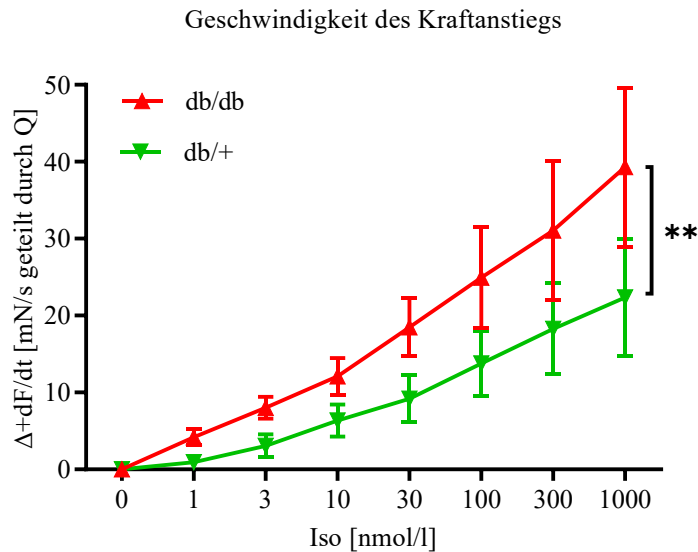


Abb. 34: Änderung der Geschwindigkeit des Kraftanstiegs der Papillarmuskeln diabetischer (db/db) und nicht-diabetischer (db/+) Mäuse unter β -adrenerger Rezeptor-Stimulation mit Isoprenalin. Aufgetragen ist die in der jeweiligen Gruppe gemessene durchschnittliche Änderung der Geschwindigkeit des Kraftanstiegs ($\Delta+dF/dt$) in Millinewton pro Sekunde (mN/s) geteilt durch die Querschnittsfläche des Muskels (Q) in Quadratmillimeter (mm^2) auf der y-Achse gegen die zunehmende Isoprenalinkonzentration (Iso) in Nanomol pro Liter (nmol/l) auf der x-Achse. Verglichen wurde die Geschwindigkeit des Kraftanstiegs der Papillarmuskeln diabetischer (db/db) und nicht-diabetischer (db/+) Mäuse. Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm$ SEM. db/db (n = 12 bei Iso von 0 nmol/l); db/+ (n = 10 bei Iso von 0 nmol/l). Statistische Signifikanz ist mit einem Stern markiert. ** entspricht p-Wert ≤ 0.01 . Statistischer Vergleich der Gruppen mittels *mixed-effects analysis*.

Wie die Geschwindigkeit des Kraftanstiegs steigt auch die Geschwindigkeit des Kraftabfalls nach β -adrenerger Rezeptor-Stimulation mit Isoprenalin in der db/db und der db/+ -Gruppe an (Abb. 35). Dabei steigt die $-dF/dt$ von Papillarmuskeln der db/db-Mäuse im Vergleich zur $-dF/dt$ von Papillarmuskeln der db/+ wesentlich stärker an. Zwischen db/db und db/+ -Gruppe besteht ein statistisch signifikanter Unterschied in der Änderung der Geschwindigkeit des Kraftabfalls (p = 0,0036**; *mixed-effects analysis*).

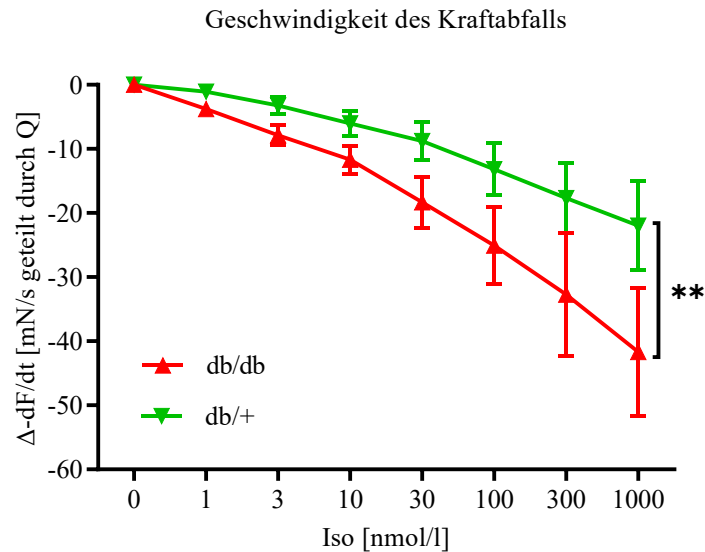


Abb. 35: Änderung der Geschwindigkeit des Kraftabfalls der Papillarmuskeln diabetischer (db/db) und nicht-diabetischer (db/+) Mäuse unter β -adrenerger Rezeptor-Stimulation mit Isoprenalin. Aufgetragen ist die in der jeweiligen Gruppe gemessene durchschnittliche Änderung der Geschwindigkeit des Kraftabfalls ($\Delta\text{-dF/dt}$) in Millinewton pro Sekunde (mN/s) geteilt durch die Querschnittsfläche des Muskels (Q) in Quadratmillimeter (mm^2) auf der y-Achse gegen die zunehmende Isoprenalinkonzentration (Iso) in Nanomol pro Liter (nmol/l) auf der x-Achse. Verglichen wurde die Geschwindigkeit des Kraftabfalls der Papillarmuskeln diabetischer (db/db) und nicht-diabetischer (db/+) Mäuse. Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm$ SEM. db/db (n = 12 bei Iso von 0 nmol/l); db/+ (n = 10 bei Iso von 0 nmol/l). Statistische Signifikanz ist mit einem Stern markiert. ** entspricht p-Wert ≤ 0.01 . Statistischer Vergleich der Gruppen mittels *mixed-effects analysis*.

Zusammenfassend kann gefolgert werden, dass die db/db-Mäuse verglichen mit den db/+ -Mäusen ein stärkeres Ansprechen auf ansteigende Isoprenalinkonzentrationen zeigen. Dieses Ergebnis war für die Kraftamplitude, die Geschwindigkeit des Kraftanstiegs und -abfalls statistisch signifikant.

3.2.1.3 Erhöhung der Vorspannung

Anschließend wurde die Kraftentwicklung des diabetischen Myokards bei zunehmender Vorspannung untersucht. Hierzu wurde die Vorspannung des Papillarmuskels schrittweise auf 1 mN, 2 mN, 3 mN, 5 mN, und 7 mN erhöht. Untersucht wurden die Parameter der Kraftentwicklung wie die Kraftamplitude, die Geschwindigkeit des Kraftanstiegs und des Kraftabfalls von Papillarmuskeln der db/db und db/+ -Gruppe.

Die Messdaten von 11 Papillarmuskeln der db/db und 9 der db/+ -Gruppe wurden ausgewertet. Die zunehmende Steigerung der Vorspannung führte teilweise zu nicht

auswertbaren Signalen und so konnten nicht für jede Vorspannungsstufe Messdaten generiert werden. Auch hier waren arrhythmische Signale und komplette Signalverluste mitunter durch Abriss des Muskels ursächlich. In Abb. 36 ist die relative Anzahl an Papillarmuskeln mit Arrhythmien und Signalverlust bei zunehmender Isoprenalinkonzentration dargestellt. Sowohl bei der db/db als auch bei der db/+ -Gruppe treten bei zunehmender Vorspannung arrhythmische Signale auf oder die Muskeln lassen sich nicht mehr stimulieren.

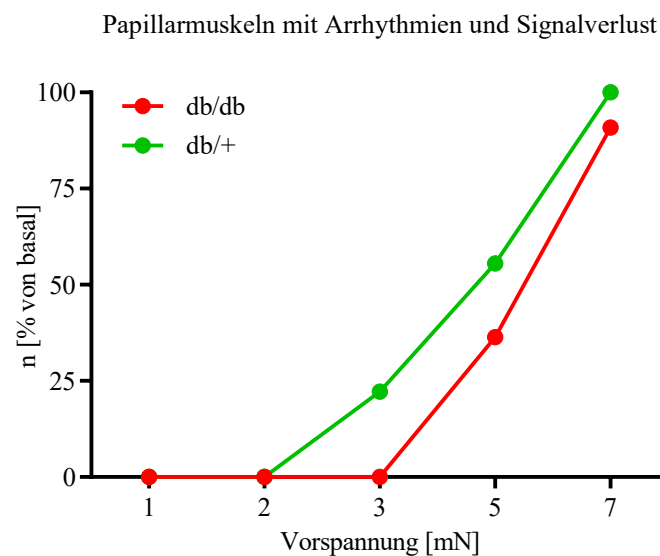


Abb. 36: Papillarmuskeln mit Arrhythmien und Signalverlust diabetischer (db/db) und nicht-diabetischer (db/+) Mäuse bei zunehmender Vorspannung. Dargestellt ist die in der jeweiligen Gruppe gemessene relative Anzahl an Papillarmuskeln mit Arrhythmien und Signalverlust (n) in Prozent (%) bei zunehmender Vorspannung in Millinewton (mN). Dabei wurde die Anzahl an Papillarmuskeln mit arrhythmischen Signalen und Signalverlust mit der Anzahl bei einer Vorspannung von 1 mN ins Verhältnis gesetzt. Verglichen wird die Anzahl an Papillarmuskeln mit Arrhythmien und Signalverlust diabetischer (db/db) und nicht-diabetischer (db/+) Mäuse. db/db (n = 11 bei 1 mN); db/+ (n = 9 bei 1 mN).

Es lässt sich feststellen, dass sowohl die Kraftamplitude des diabetischen Myokards als auch des nicht-diabetischen Myokards mit zunehmender Vorspannung abfiel (Abb. 37). Im Vergleich zur db/+ -Gruppe zeigten die Papillarmuskeln der db/db -Gruppe einen tendenziell stärkeren Abfall der F_{amp} . Es ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen db/db und db/+ -Gruppe ($p = 0,26$; *mixed-effects analysis*).

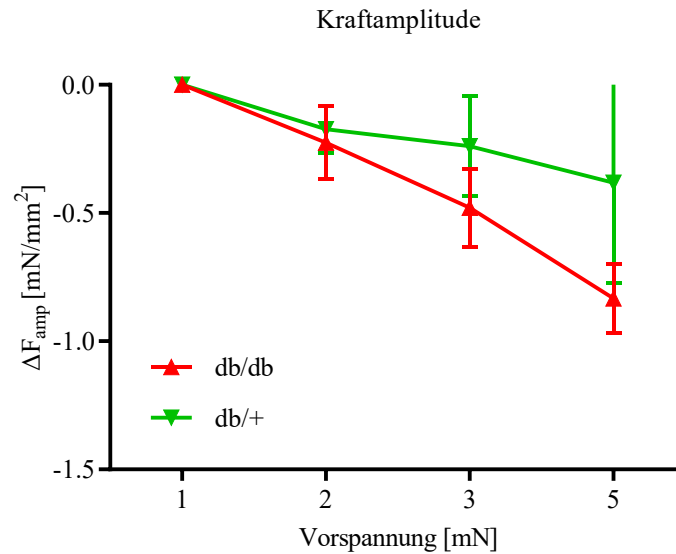


Abb. 37: Änderung der Kraftamplitude der Papillarmuskeln diabetischer (db/db) und nicht-diabetischer (db/+) Mäuse bei zunehmender Vorspannung. Aufgetragen ist die in der jeweiligen Gruppe gemessene durchschnittliche Änderung der Kraftamplitude (ΔF_{amp}) in Millinewton pro Quadratmillimeter (mN/mm^2) auf der y-Achse gegen die zunehmende Vorspannung des Papillarmuskels in Millinewton (mN) auf der x-Achse. Verglichen wurde die Kraftamplitude der Papillarmuskeln diabetischer (db/db) und nicht-diabetischer (db/+) Mäuse. Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm$ SEM. db/db ($n = 11$ bei 1 mN); db/+ ($n = 9$ bei 1 mN). Statistischer Vergleich der Gruppen mittels *mixed-effects analysis*.

Wie die Kraftamplitude fiel auch die Geschwindigkeit des Kraftanstiegs bei zunehmender Vorspannung ab (Abb. 38). Verglichen mit der db/+ -Gruppe fiel die $+dF/dt$ der Papillarmuskeln der db/db-Gruppe tendenziell stärker ab. Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen ergab sich nicht ($p = 0,10$; *mixed-effects analysis*).

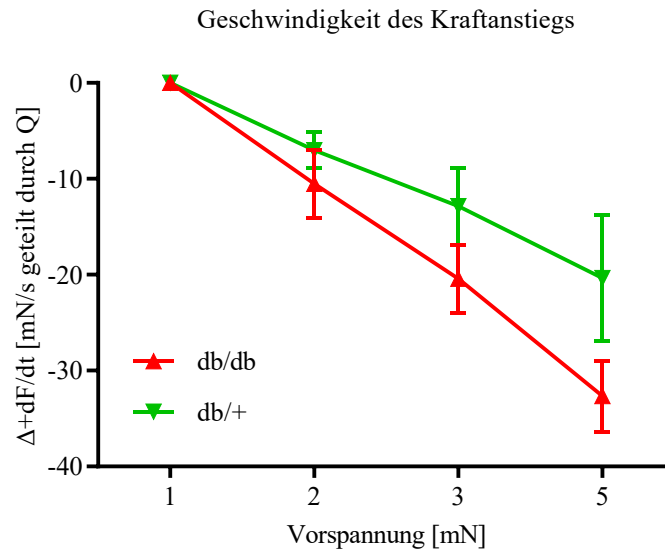


Abb. 38: Änderung der Geschwindigkeit des Kraftanstiegs der Papillarmuskeln diabetischer (db/db) und nicht-diabetischer (db/+) Mäuse bei zunehmender Vorspannung. Aufgetragen ist die in der jeweiligen Gruppe gemessene durchschnittliche Änderung der Geschwindigkeit des Kraftanstiegs ($\Delta+dF/dt$) in Millinewton pro Sekunde (mN/s) geteilt durch die Querschnittsfläche des Muskels (Q) in Quadratmillimeter (mm^2) auf der y-Achse gegen die zunehmende Vorspannung des Papillarmuskels in Millinewton (mN) auf der x-Achse. Verglichen wurde die Geschwindigkeit des Kraftanstiegs der Papillarmuskeln diabetischer (db/db) und nicht-diabetischer (db/+) Mäuse. Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm$ SEM. db/db ($n = 11$ bei 1 mN); db/+ ($n = 9$ bei 1 mN). Statistischer Vergleich der Gruppen mittels *mixed-effects analysis*.

Es konnte beobachtet werden, dass durch Erhöhung der Vorspannung die Geschwindigkeit des Kraftabfalls in der db/db und in der db/+ -Gruppe abfällt (Abb. 39). Dabei zeigt sich ein stärkerer Abfall der $-dF/dt$ der Papillarmuskeln der Mäuse mit diabetischer Stoffwechsellage. Es besteht ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen db/db und db/+ -Gruppe bezüglich der Geschwindigkeit des Kraftabfalls ($p = 0,0493^*$; *mixed-effects analysis*).

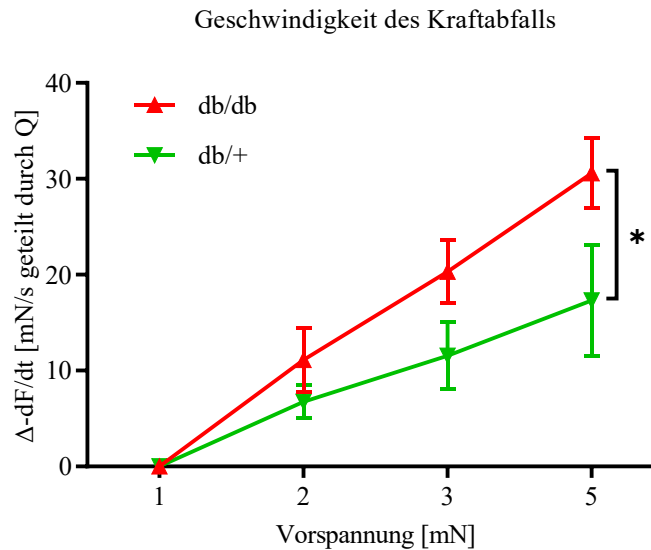


Abb. 39: Änderung der Geschwindigkeit des Kraftabfalls der Papillarmuskeln diabetischer (db/db) und nicht-diabetischer (db/+) Mäuse bei zunehmender Vorspannung. Aufgetragen ist die in der jeweiligen Gruppe gemessene durchschnittliche Änderung der Geschwindigkeit des Kraftabfalls ($\Delta\text{-dF/dt}$) in Millinewton pro Sekunde (mN/s) geteilt durch die Querschnittsfläche des Muskels (Q) in Quadratmillimeter (mm^2) auf der y-Achse gegen die zunehmende Vorspannung des Papillarmuskels in Millinewton (mN) auf der x-Achse. Verglichen wurde die Geschwindigkeit des Kraftabfalls der Papillarmuskeln diabetischer (db/db) und nicht-diabetischer (db/+) Mäuse. Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm$ SEM. db/db (n = 11 bei 1 mN); db/+ (n = 9 bei 1 mN). Statistischer Vergleich der Gruppen mittels *mixed-effects analysis*.

3.2.2 Aktive Kraftmessungen an gehäuteten Muskelfasern

Analog zu den Versuchen am Wildtyp-Herzen wurde auch die aktive Kraftentwicklung der db/db und db/+ Gruppe untersucht (siehe Kapitel 3.1.2). Dazu wurde die gehäutete Muskelfaser Lösungen mit unterschiedlichem Kalziumgehalt bzw. unterschiedlichem pCa-Wert ausgesetzt und die aktiven Kräfte gemessen.

Auch bei der db/db und db/+ Gruppe führten Schwierigkeiten bei der Präparation und Fixierung in der Messapparatur dazu, dass für manche Muskeln keine Daten erhoben werden konnten.

3.2.2.1 Ca^{2+} -Sensitivität

In den vorherigen Versuchen am Organbad hat sich bereits herausgestellt, dass das diabetische Myokard bei Stimulation mit Isoprenalin ein stärkeres Ansprechen auf die β -adrenerge Rezeptor-Stimulation mit Isoprenalin zeigt (siehe Kapitel 3.2.1.2). Ein Grund dafür könnte eine gesteigerte Sensitivität der Myofilamente für Kalzium sein, weshalb diese

im Folgenden untersucht wurde. Die Messung der aktiven Kräfte in Lösungen ansteigender Ca^{2+} -Konzentrationen erlaubt es, die Ca^{2+} -Sensitivität der Muskelfasern zu ermitteln. Auf diese Weise wurde untersucht, ob das diabetische Myokard eine veränderte Ca^{2+} -Sensitivität aufweist.

Zur Ermittlung der Ca^{2+} -Sensitivität wurden die Muskelfasern nacheinander Lösungen mit ansteigender Ca^{2+} -Konzentrationen ausgesetzt, sodass eine Aktivierungsreihe entstand. Die aktiv generierten Kräfte der Muskelfasern wurden dabei in mN/mm^2 gemessen. Im Folgenden wurden die Kräfte der Aktivierungsreihe mit $F_{\max}$ bei einem pCa von 4,5 in Bezug gesetzt. Dabei wurde $F_{\max}$ als 100 % festgelegt und die Kräfte der Aktivierungsreihe (bei pCa 8 / 5,96 / 5,85 / 5,72 / 5,57 / 5,37 / 5,06) als relative Kräfte (F [%]) von 0-100 % dargestellt (Abb. 40). Als $F_{\max}$ wurde dabei immer die zweite maximale Aktivierung bei pCa 4,5 nach der Aktivierungsreihe definiert. Verwendet wurden gehäutete Muskelfasern des vorderen Papillarmuskels aus db/db und db/+ -Mäuseherzen.

Der Vergleich zeigte eine unterschiedliche Ca^{2+} -Sensitivität gehäuteter Muskelfasern der db/db und db/+ -Gruppe. Es fiel eine deutliche Linksverschiebung der Kraft-Kalzium-Kurve der db/db-Gruppe im Vergleich zur db/+ -Gruppe auf (Abb. 40). Die db/db-Gruppe zeigte signifikant höhere pCa_{50} -Werte (db/db: $5,529 \pm 0,03$ vs. db/+: $5,386 \pm 0,03$; $p = 0,0041^{**}$; ungepaarter t-Test). Dies lässt auf eine höhere Ca^{2+} -Sensitivität der Muskelfasern der db/db-Tiere schließen. Die Differenz der pCa_{50} -Werte betrug 0,14.

Der Hill-Koeffizient der db/db-Gruppe war niedriger als der der db/+ -Gruppe (db/db: $2,73 \pm 0,22$ vs. db/+: $3,28 \pm 0,37$; $p = 0,21$; ungepaarter t-Test). Dieses Ergebnis war allerdings nicht signifikant.

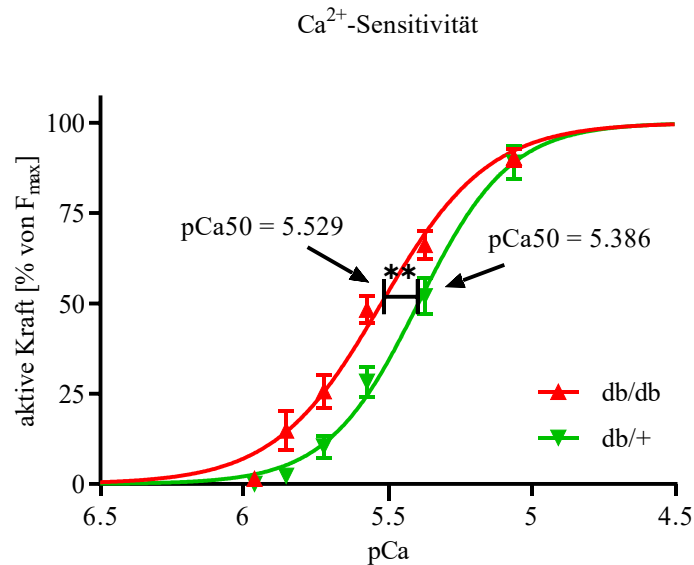


Abb. 40: Ca^{2+} -Sensitivität gehäuteter Muskelfasern von Mäusen mit diabetischer (db/db) und ohne diabetische Stoffwechsellage (db/+). Aufgetragen ist die in der jeweiligen Gruppe gemessene aktive relative Kraft in Prozent (%) im Bezug zur Maximalkraft ($F_{\max}$) von 100 % bei einem pCa von 4,5 auf der y-Achse gegen den negativ dekadischen Logarithmus der Kalziumkonzentration in der vorliegenden Lösung (pCa) auf der x-Achse. Eine sigmoidale Kraft-Kalzium-Kurve entsteht. Verglichen wurden die aktiven Kräfte gehäuteter Muskelfasern des Myokards von Mäusen mit diabetischer (db/db) und ohne diabetische Stoffwechsellage (db/+). Es zeigt sich eine Linksverschiebung der Kraft-Kalzium-Kurve der db/db-Gruppe mit signifikant erhöhtem pCa_{50} -Wert von $5,529 \pm 0,03$ im Vergleich zu db/+ -Gruppe mit einem pCa_{50} -Wert von $5,386 \pm 0,03$ ($p = 0,0041^{**}$; ungepaarter t-Test). pCa_{50} -Differenz von 0,14. Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm$ SEM. db/db ($n = 13$); db/+ ($n = 12$).

3.2.2.2 Maximale aktive Kraftentwicklung

Die maximal entwickelte aktive Kraft ($F_{\max}$) in mN/mm^2 der Muskelfasern wurde bei einem pCa von 4,5 erreicht. Berücksichtigt wurde hier lediglich die zweite maximale Aktivierung der Fasern am Ende einer Aktivierungsreihe. Die Ergebnisse werden als Mittelwerte $\pm$ SEM angegeben und sind in Abb. 41 dargestellt.

Der Vergleich von $F_{\max}$ der db/db und db/+ -Mäuse ergab keinen signifikanten Unterschied (db/db: $20 \pm 4 \text{ mN}/\text{mm}^2$ vs. db/+ : $21 \pm 4 \text{ mN}/\text{mm}^2$; $p = 0,90$; ungepaarter t-Test).

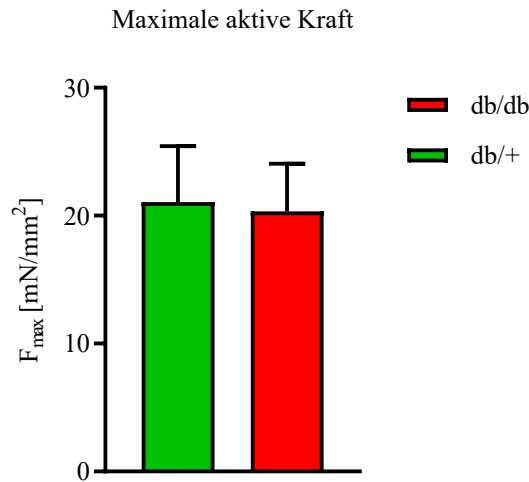


Abb. 41: Maximale aktive Kraftentwicklung gehäuteter Muskelfasern diabetischer (db/db) und nicht-diabetischer (db/+) Mäuse. Das Säulendiagramm zeigt die in der jeweiligen Gruppe gemessene maximal entwickelte aktive Kraft ($F_{\max}$) in Millinewton pro Quadratmillimeter (mN/mm²) von gehäuteten Muskelfasern, die bei einem pCa von 4,5 gemessen wurde. Verglichen wurde die $F_{\max}$ diabetischer (db/db) und nicht-diabetischer (db/+) gehäuteter Muskelfasern des Myokards. Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm$ SEM. db/db (n = 13); db/+ (n = 12). Statistischer Vergleich der Gruppen mittels ungepaarten t-Tests.

3.2.3 Passive Kraftmessungen an gehäuteten Muskelfasern

Um herauszufinden, ob der Diabetes Einfluss auf die passive Steifigkeit des Myokards hat, wurden Messungen der passiven Kraft an gehäuteten Muskelfasern durchgeführt. Dafür wurden Muskelfasern des vorderen Papillarmuskels von Tieren mit (db/db) und ohne diabetische Stoffwechsellage (db/+) untersucht. Die Messungen erfolgten analog zu den Versuchen am Wildtyp-Herzen (siehe Kapitel 3.1.3).

Wie auch bei der Messung der aktiven Kraftentwicklung resultieren die unterschiedlichen Gruppengrößen daraus, dass Präparation und Fixierung in der Messapparatur misslangen und Daten für die passive Kraftentwicklung nicht generiert werden konnten.

Es konnte beobachtet werden, dass die passive Kraft der Fasern der db/db-Gruppe vergleichbar mit der der db/+ -Gruppe ist. Dabei zeigte Abb. 42 einen annähernd gleichen Kurvenverlauf der passiven Kraftentwicklung für die beiden Gruppen in Abhängigkeit der Faserdehnung. Es lag kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen vor ($p = 0,88$; *two-way* ANOVA). Zusammenfassend zeigt sich die passive Steifigkeit gehäuteter Muskelfasern der db/db-Gruppe unverändert.

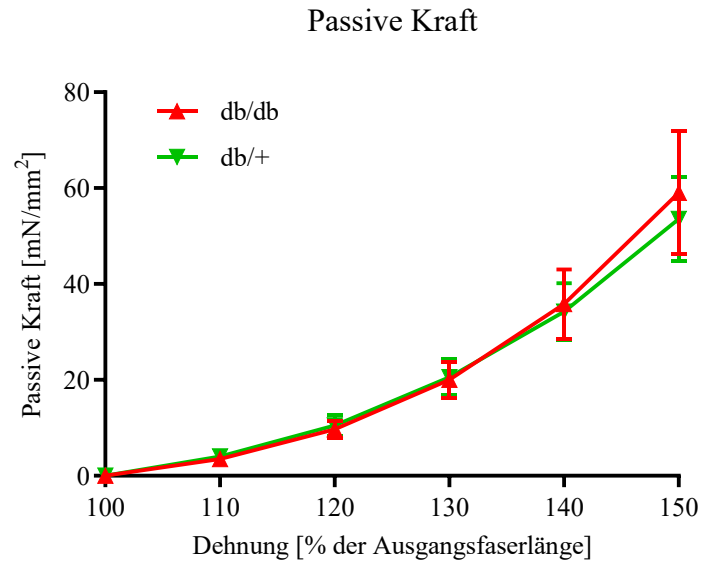


Abb. 42: Passive Kraftentwicklung gehäuteter Muskelfasern von Mäusen mit (db/db) und ohne diabetische Stoffwechsellaage (db/+). Aufgetragen ist die in der jeweiligen Gruppe gemessene durchschnittliche passive Kraft in Millinewton pro Quadratmillimeter (mN/mm^2) auf der y-Achse gegen die Dehnung der Muskelfaser in Prozent (%) auf der x-Achse. Verglichen wurden die passiven Kräfte gehäuteter Muskelfasern des Myokards von Mäusen mit diabetischer (db/db) und ohne diabetische Stoffwechsellaage (db/+). Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm$ SEM. db/db ($n = 16$); db/+ ($n = 15$). Statistischer Vergleich mittels *two-way* ANOVA.

4 Diskussion

Im Folgenden werden die erzielten Ergebnisse kurz zusammengefasst und diskutiert. Anschließend werden die verwendeten Tiermodelle sowie Methoden kritisch beurteilt. Abschließend werden Schlussfolgerungen abgeleitet und ein Ausblick für mögliche zukünftige Forschungsthemen gegeben.

4.1 *remote* Myokard nach I/R

Nach einem Myokardinfarkt kommt es zu Umbauprozessen im Myokard (*Remodeling*), die nicht nur das infarzierte Gewebe betreffen, sondern auch den nicht-ischämischen Bereich, das *remote* Myokard (39). Der Prozess des *Remodelings* kann negative Auswirkungen auf die Herzleistung haben und zur Funktionseinschränkung führen (39, 40). Bislang wurde das *remote* Myokard nur unzureichend untersucht, obwohl es eine zentrale Rolle für das Überleben des Organismus nach MI spielt und bereits in der frühen Phase nach I/R funktionell beeinträchtigt ist (47, 125).

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob sich die Funktion des *remote* Myokards im weiteren Verlauf erholt. Dazu wurde an isolierten Papillarmuskeln aus Mäuserzen 9-12 Tage nach einstündigem LAD-Verschluss die myokardiale Kraftentwicklung des *remote* Myokards analysiert. Dabei zeigte sich die Kraftamplitude sowie die Geschwindigkeit des Kraftanstiegs und -abfalls unter basalen Bedingungen im Vergleich zur Kontrollgruppe unverändert. Auch nach β -adrenerger Rezeptor-Stimulation mit Isoprenalin und nach Erhöhung der Vorspannung zeigten sich die Parameter der Kraftentwicklung im *remote* Myokard 9-12 Tage nach I/R unverändert. Bei Messung der Ca^{2+} -Sensitivität an gehäuteten Muskelfasern zeigte sich eine leichte Linksverschiebung der Kraft-Kalzium-Kurve mit tendenziell erhöhtem, aber nicht signifikant verändertem pCa_{50} -Wert der wt + I/R Gruppe. Auch die maximale aktive Kraftentwicklung zeigte sich statistisch nicht signifikant verändert, aber fiel tendenziell leicht erhöht aus. Die passive Steifigkeit des *remote* Myokards zeigte sich nicht signifikant erhöht.

4.1.1 Unveränderte Kontraktilität des *remote* Myokards nach I/R

9-12 Tage nach I/R stellte sich die vom *remote* Myokard generierte Kraft unter basalen Bedingungen unverändert dar. Gemessen wurde dabei die kontraktile Funktion des hinteren Papillarmuskels des linken Ventrikels im Organbad.

Es hat sich bereits gezeigt, dass die kontraktile Funktion des *remote* Myokards in der frühen Phase nach MI bei der Maus reduziert ist. So konnte in einer *in vitro* Messung an Mäusepapillarmuskeln 24 h nach I/R, sprich in der Frühphase nach MI, eine tendenziell geringere Kraftentwicklung des *remote* Myokards beobachtet werden. Dabei wurde die Stimulationsfrequenz im Organbad schrittweise gesteigert, was in einer nicht signifikant reduzierten Kraftamplitude des *remote* Myokards resultierte (121). Darüber hinaus hat eine Studie von Kronenbitter et al. (47) die Sarkomerfunktion der Kardiomyozyten von Wildtyp-Mäusen 24 h nach I/R untersucht. Dabei fiel eine reduzierte kontraktile Amplitude auf. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass ein gestörter Ca^{2+} -Kreislauf in den Kardiomyozyten vorliegt und für die kontraktile Dysfunktion verantwortlich gemacht wird (47). Aber auch *in vivo* konnten Epstein et al. (125) mittels Magnetresonanztomographie (MRT) eine kontraktile Dysfunktion des *remote* Myokards einen Tag nach MI bei der Maus nachweisen. Die vorliegende Arbeit stellte 9-12 Tage nach I/R eine erhaltene kontraktile Funktion im *remote* Myokard fest. Zu diesem Zeitpunkt haben bereits kardiale Umbauprozesse eingesetzt, die den Funktionsverlust nach MI zu kompensieren versuchen (22). Es lässt sich vermuten, dass im Rahmen des *Remodelings* adaptive Prozesse stattfinden, die dazu beitragen, dass sich die kontraktile Funktion des *remote* Myokards im Verlauf stabilisiert. Hier werden insbesondere Änderungen der passiven Steifigkeit beschrieben (126), auf die in Kapitel 4.1.5 näher eingegangen wird. Vergleichbares zeigte eine Studie von Binek et al. (127), die die kontraktile Funktion von Schweineherzen nach I/R zu verschiedenen Zeitpunkten mittels MRT untersuchte. Hier zeigte sich früh, das heißt 120 Minuten und 24 Stunden nach I/R, eine reduzierte Kontraktilität des *remote* Myokards. 7 Tage nach I/R war die kontraktile Funktion dagegen erhalten (127). Binek et al. (127) führten dies auf Prozesse des *Remodelings* zurück.

Zusammenfassend ließ sich 9-12 Tage nach I/R eine erhaltene kontraktile Funktion im *remote* Myokard feststellen. Interessant wäre es zu wissen, wie sich die Kontraktilität des *remote* Myokards im weiteren Verlauf des *Remodeling*-Prozesses verhält. Weiterführende Studien könnten hier ansetzen.

4.1.2 Unveränderte Kontraktilität des *remote* Myokards nach I/R nach β -adrenerger Rezeptor-Stimulation

Nachdem sich unter basalen Bedingungen eine unveränderte kontraktile Funktion des *remote* Myokards dargestellt, wurde anschließend der Einfluss von Isoprenalin untersucht. Isoprenalin wirkt als Agonist an den β -adrenergen Rezeptoren des Herzens (128). Über eine

Signalkaskade wird die PKA aktiviert, die wiederum Ca^{2+} -regulierende Proteine phosphoryliert (128, 129). Insgesamt geht die β -adrenerge Stimulation mit einer gesteigerten Kontraktionskraft und beschleunigten Relaxation einher (129) (siehe Kapitel 1.3.1). Nach β -adrenerger Rezeptor-Stimulation mittels Isoprenalin stellte sich das Kontraktionsverhalten des *remote* Myokards 9-12 Tage nach I/R im Vergleich zur *sham*-operierten Mäusen unverändert dar. Die Kraftamplitude sowie die Geschwindigkeit des Kraftanstiegs und -abfalls des *remote* Myokards zeigen sich in dieser Arbeit unverändert.

Eine Studie von Clozel et al. (130) erzielte vergleichbare Ergebnisse. Dabei zeigte sich die Kraftentwicklung nach Stimulation mit Isoprenalin im *remote* Myokard von Ratten drei Wochen nach MI erhalten. Des Weiteren konnte keine Änderung der Expression von β -adrenergen Rezeptoren festgestellt werden (130). Während in der vorliegenden Arbeit die Kraftentwicklung der Papillarmuskeln nach I/R betrachtet wurde, erzeugten Clozel et al. (130) den Myokardinfarkt durch eine permanente LAD-Ligatur und untersuchten den Einfluss von Isoprenalin auf die Kraftentwicklung der Papillarmuskeln. Auch der Zeitraum der Postinfarktphase deckt sich nicht genau (130).

Betrachtet man die frühe Postinfarktphase, so zeigte eine Studie an Meerschweinchen von Baumann et al. (131), dass 3 Tage nach MI das *remote* Myokard eine verringerte Ansprechbarkeit auf die β -adrenerge Rezeptor-Stimulation durch Isoprenalin aufweist. Dabei wurde die Kontraktilität von *ex vivo* perfundierten Herzen nach MI durch permanente Ligatur einer Arterie untersucht. Neben der verringerten β -adrenergen Ansprechbarkeit des *remote* Myokards wurden zudem 3 Tage nach MI eine reduzierte Zahl und auch Affinität der β -adrenergen Rezeptoren festgestellt. Es wird abgeleitet, dass nach MI die erhöhte Sympathikusaktivität erhöhte Katecholaminspiegel bedingt, die im Folgenden zur verminderten Expression und Affinität der β -adrenergen Rezeptoren führen und so in einer verminderten Ansprechbarkeit des *remote* Myokards auf Isoprenalin resultieren (131). Baumann et al. (131) zeigten darüber hinaus, dass die Kontraktilität nach Stimulation mit Isoprenalin 6 Tage nach MI unverändert zur Kontrollgruppe ist. Interessanterweise zeigt sich somit 6 Tage nach MI eine erhaltene Ansprechbarkeit des *remote* Myokards auf die β -adrenerge Rezeptor-Stimulation (131). Dies suggeriert, dass die Zeitspanne, die seit dem MI vergangen ist, entscheidend ist und dass das β -adrenerge System regenerativen Veränderungen unterliegt. Möglicherweise finden Prozesse statt, die im Verlauf wieder zum Erhalt der β -adrenergen Ansprechbarkeit beitragen. Beachtet werden muss, dass in der Studie Meerschweinchenherzen untersucht wurden (131), wogegen in der vorliegenden

Arbeit ein Mausmodell verwendet wurde. Weiterführende Studien könnten sich darauf konzentrieren, die β -adrenerge Ansprechbarkeit des *remote* Myokards der Maus nach I/R zu verschiedenen Zeitpunkten der Infarktheilung zu untersuchen.

Im Gesamten betrachtet scheint nicht nur die kontraktile Funktion des *remote* Myokards 9-12 Tage nach I/R unter basalen Bedingungen erhalten zu sein, sondern auch nach β -adrenerger Rezeptor-Stimulation mit Isoprenalin zeigt sich die Ansprechbarkeit des *remote* Myokards unverändert. In zukünftigen Studien könnten die Expression und Affinität von β -adrenergen Rezeptoren sowie Proteine des β -adrenergen Signalwegs näher betrachtet werden. Zudem sollten verschiedene Zeitpunkte untersucht werden.

4.1.3 Unveränderte Kontraktilität des *remote* Myokards nach I/R bei zunehmender Vorspannung

Im Anschluss wurde das Kontraktionsverhalten des *remote* Myokards 9-12 Tage nach I/R bei zunehmender Vorspannung untersucht. Dabei stellten sich die Parameter der Kraftentwicklung des *remote* Myokards gegenüber der *sham*-operierten Gruppe unverändert dar.

Eine Erhöhung der Vorspannung kann durch optimale Überlappung der dünnen und dicken Myofilamente zur erhöhten Kraftentwicklung beitragen (132). Dies spielt am Herzen für den Frank-Starling-Mechanismus eine entscheidende Rolle und ist für die Regulation des Herzvolumens essentiell (133) (siehe Kapitel 1.3.2). Bei den Messungen der Kontraktilität der Papillarmuskeln führte die Erhöhung der Vorspannung anfänglich zur Zunahme der Kraftamplitude in beiden Gruppen, was darauf schließen lässt, dass vorab keine optimale Überlappung der Myofilamente und damit auch keine optimale Kraftentwicklung vorherrschte. Im Verlauf kommt es durch die zunehmende Vorspannung zur Überdehnung der Papillarmuskeln, diese werden geschädigt und die kontraktile Funktion nimmt ab. In einer 2024 veröffentlichten Arbeit von Dreblow (121), die das *remote* Myokard 24 h nach I/R untersuchte, konnte bei zunehmender Vorspannung eine tendenziell geringere kontraktile Amplitude des *remote* Myokards beobachtet werden. Im weiteren Verlauf, 9-12 Tage nach I/R, scheint die Kraftentwicklung des *remote* Myokards hingegen erhalten zu sein. Möglicherweise spielen auch hier adaptive Prozesse nach MI im Rahmen des *Remodelings* eine Rolle, die zur funktionellen Stabilisierung des Myokards unter erhöhter mechanischer Belastung beitragen.

4.1.4 Unveränderte Ca^{2+} -Sensitivität des *remote* Myokards nach I/R

Die Ca^{2+} -Sensitivität des *remote* Myokards wurde 9-12 Tage nach I/R an gehäuteten Muskelfasern des vorderen Papillarmuskels gemessen. Dabei zeigte sich eine leichte Linksverschiebung der Kraft-Kalzium-Kurve mit tendenziell erhöhtem, aber nicht signifikant verändertem pCa_{50} -Wert der wt + I/R Gruppe.

In der Literatur finden sich Hinweise darauf, dass das nicht-infarzierte Myokard nach MI eine erhöhte Ca^{2+} -Sensitivität aufweist (134-136). Eine Studie von Avner et al. (134) an Mäusen hat 3 Tage nach permanenter LAD-Ligatur die Sensitivität der Myofilamente für Ca^{2+} betrachtet. Analog zur vorliegenden Arbeit wurden auch hier Muskelfasern eines Papillarmuskels des *remote* Myokards gehäutet und untersucht. Es fiel eine erhöhte Ca^{2+} -Sensitivität des *remote* Myokards auf. Passend dazu stellte sich eine veränderte Phosphorylierung von Proteinen des Sarkomers dar (134). Es ist bekannt, dass durch posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierung von Proteinen die Ca^{2+} -Sensitivität verändert werden kann (71, 72). Avner et al. (134) wiesen eine verringerte Phosphorylierung des TnI nach, was ursächlich für die erhöhte Ca^{2+} -Sensitivität sein könnte. Auch van der Velden et al. (135) stellten eine erhöhte Ca^{2+} -Sensitivität des *remote* Myokards fest. Gleichzeitig lag hier ebenfalls eine reduzierte Phosphorylierung des TnI vor. Allerdings wurden in diesem Fall Kardiomyozyten von Schweineherzen drei Wochen nach MI untersucht (135). Venkataraman et al. (136) beschäftigten sich zudem mit dem Zusammenhang von Ca^{2+} -Sensitivität und Arrhythmien im Myokard. Sie schlossen, dass die erhöhte Ca^{2+} -Sensitivität im *remote* Myokard die Entstehung von Arrhythmien begünstigt (136). Dies könnte die in dieser Arbeit beobachtete erhöhte Arrhythmieeigung des *remote* Myokards nach Stimulation der Papillarmuskeln mit Isoprenalin erklären (siehe Kapitel 3.1.1.2).

Im Gegensatz dazu stellten Li et al. (137) eine erniedrigte Ca^{2+} -Sensitivität bei Ratten 7 Tage nach MI durch Ligatur der linken Koronararterie fest. Passend dazu zeigte sich eine erhöhte Phosphorylierung des TnI (137). Die vorliegende Arbeit konnte keinen statistisch signifikanten Unterschied feststellen, auch wenn die Ca^{2+} -Sensitivität des *remote* Myokards tendenziell erhöht erschien.

Es ist möglich, dass die unterschiedlichen Ergebnisse durch speziesspezifische oder auch methodische Unterschiede zu erklären sind. Methodisch fällt auf, dass die genannten Studien zur Induktion eines MI bevorzugt eine permanente Ligatur von Arterien durchführen (134-

137), während die vorliegende Arbeit den Zustand nach I/R betrachtet. Auch der Zeitpunkt nach MI scheint Einfluss zu nehmen und könnte die Abweichung der Ergebnisse erklären. Hinweise darauf gibt eine Studie, die nachgewiesen hat, dass die posttranslationale Modifikation von Proteinen des Sarkomers nach MI zeitlich variiert. Dies könnte Einfluss auf die Ca^{2+} -Sensitivität nehmen und jene modulieren (138).

Viele Studien deuten auf eine erhöhte Ca^{2+} -Sensitivität des *remote* Myokards hin (134-136), obgleich sich auch Studien finden, die widersprüchliche Ergebnisse zeigen (137). Die vorliegende Arbeit konnte keinen statistisch signifikanten Unterschied bezüglich der Ca^{2+} -Sensitivität feststellen. Im Gesamten betrachtet fehlen Studien, die verschiedene Zeitpunkte betrachten und sich in Tiermodell sowie Methodik entsprechen.

4.1.5 Tendenziell erhöhte passive Steifigkeit des *remote* Myokards nach I/R

Die passive Steifigkeit des *remote* Myokards 9-12 Tage nach I/R zeigte sich tendenziell erhöht. Es bestand jedoch kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen.

Die passiven mechanischen Eigenschaften eines Muskels werden durch die extrazelluläre Matrix und durch das Titinmolekül vermittelt (76, 81) (siehe Kapitel 1.4). Titin ist ein großes Molekül, das sich innerhalb eines Halbsarkomers von der Z-Scheibe bis zur M-Bande erstreckt und elastische Eigenschaften aufweist (75). Die durch Titin vermittelte Elastizität ist wichtig für die Herzfunktion und kann Einfluss auf Ventrikelfüllung und -auswurf nehmen (76). Die passiven Eigenschaften des Titins können durch posttranslationale Modifikation, beispielsweise durch Phosphorylierung, moduliert werden (81).

Kötter et al. (126) konnten zeigen, dass die passive Steifigkeit im *remote* Myokard 3 Tage nach MI deutlich erhöht ist. Es wird angenommen, dass dadurch der mechanische Stress kompensiert wird, der durch den Verlust von funktionellem Myokardgewebe entsteht. Die zunehmende Versteifung stellt damit einen schnellen Adaptationsmechanismus dar, der die Herzleistung aufrechterhält, bis sich eine Infarktnarbe ausgebildet hat. Gestützt wird dieses Ergebnis dadurch, dass die Phosphorylierung der PEVK-Region des Titins signifikant erhöht war, welche ursächlich für die modifizierte passive Steifigkeit sein könnte. Passend dazu stellte sich auch eine Kinase, die Proteinkinase C-alpha, erhöht dar. Interessanterweise zeigte sich nach 10 Tagen ein Abfall der passiven Steifigkeit und auch das Niveau der Kinase sank. Die passive Steifigkeit im *remote* Myokard stellte sich jedoch weiterhin erhöht gegenüber der *sham*-operierten Kontrollgruppe dar. Es wurde abgeleitet, dass die strukturgebende

Wirkung des Titins nun nicht mehr erforderlich ist, da zu diesem Zeitpunkt die Narbenbildung im infarzierten Gewebe schon weit vorangeschritten ist. Aus der Studie wurde daher geschlossen, dass die durch Titin vermittelte passive Steifigkeit am frühen kardialen *Remodeling* nach einem Myokardinfarkt beteiligt ist. Im weiteren Verlauf ist dieser adaptive Prozess nicht mehr vonnöten und die passive Steifigkeit reduziert sich wieder (126). Die in dieser Arbeit generierten Ergebnisse der passiven Steifigkeit des *remote* Myokard 9-12 Tage nach I/R stellen sich statistisch nicht signifikant verändert dar, jedoch zeigte sich ein Trend zur erhöhten passiven Steifigkeit. Zu beachten ist, dass die zuvor beschriebenen Ergebnisse im Mausmodell 3 oder 10 Tage nach permanenter LAD-Ligatur erhoben wurden (126), während in der vorliegenden Arbeit eine 60-minütige Ischämie und anschließende 9-12-tägige Reperfusion in der Maus erfolgte. Die angewandte Methodik und der Zeitpunkt der Erhebung variiert also, was die Abweichung der Ergebnisse erklären könnte. Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass die Infarktgebiete sich nach permanenter LAD-Ligatur häufig größer darstellen als nach I/R (139). Dies könnte zu einer ausgeprägteren mechanischen Belastung des *remote* Myokards führen, wodurch die passive Steifigkeit kompensatorisch stärker ansteigt als nach I/R.

Zu den Annahmen von Kötter et al. (126) passt, dass die in dieser Arbeit gemessene Kontraktilität des *remote* Myokards 9-12 Tage nach I/R erhalten ist, was auf Prozesse des *Remodelings* zurückgeführt werden kann. Weiterführende Studien könnten die passive Steifigkeit zu einem früheren Zeitpunkt nach I/R untersuchen.

4.2 Diabetisches Myokard

Der Diabetes mellitus Typ 2 gilt als bedeutender Risikofaktor für die Entwicklung einer kardiovaskulären Erkrankung (101). Genaue Kenntnis über pathologische Veränderungen und Vorgänge am Myokard des Diabetikers sind daher von großem Interesse. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit das myokardiale Kontraktionsverhalten im diabetischen Myokard untersucht.

4.2.1 Gesteigerte Kontraktilität des diabetischen Myokards

Es konnte ein gesteigertes Kontraktionsverhalten des diabetischen Myokards unter basalen Bedingungen beobachtet werden. Gemessen wurde dabei die kontraktile Funktion des hinteren Papillarmuskels des linken Ventrikels im Organbad. Es stellten sich eine gesteigerte

Kraftamplitude sowie eine gesteigerte Geschwindigkeit des Kraftanstiegs und -abfalls der db/db-Mäuse dar.

Auch Belke et al. (111) untersuchten die Kontraktilität von db/db und db/+ -Tieren im Alter von 12 Wochen. Dabei stellten sie jedoch eine reduzierte kontraktile Funktion des diabetischen Herzens fest. Sie postulierten, dass ein gestörter intrazellulärer Ca^{2+} -Kreislauf die Ursache sei (111). Vergleichbares hat sich bereits in anderen Studien mit Tiermodellen für den Diabetes mellitus Typ 1 gezeigt, bei denen Veränderungen im Ca^{2+} -Kreislauf auffielen, die für eine reduzierte Kontraktilität verantwortlich gemacht wurden (140, 141). Es ist zu beachten, dass die Versuche von Belke et al. (111) am isoliert perfundierten Herzen durchgeführt wurden und eine verlangsamte Kontraktion und Relaxation durch Messung des linksventrikulären Drucks festgestellt wurde. In dieser Arbeit hingegen wurde die Kontraktilität einzelner Papillarmuskeln im Organbad untersucht.

Die von Belke et al. (111) beobachteten Veränderungen im Ca^{2+} -Kreislauf stellen sich durch veränderte Ca^{2+} -Ströme sowie durch eine vermehrte Expression des PLN und einer leicht reduzierten Expression der SERCA dar. Die SERCA ist verantwortlich für den Rücktransport des Ca^{2+} ins SR (54) und wird durch PLN reguliert (63) (siehe Kapitel 1.3.1). Im unphosphorylierten Zustand inhibiert PLN die SERCA-Aktivität (63). Liegt vermehrt PLN im unphosphorylierten Zustand vor, bedingt dies eine reduzierte SERCA-Aktivität, die für die veränderten Ca^{2+} -Transienten und schließlich die reduzierte kontraktile Funktion verantwortlich gemacht wird (111).

Berücksichtigt man die in der Literatur beschriebenen Veränderungen im Ca^{2+} -Kreislauf, so könnte es sein, dass diese durch eine erhöhte Ca^{2+} -Sensitivität kompensiert werden. In der vorliegenden Arbeit konnte eine erhöhte Sensitivität der Myofilamente für Ca^{2+} nachgewiesen werden, worauf in Kapitel 4.2.4 näher eingegangen wird. Dies könnte erklären, warum das diabetische Myokard trotz reduzierter Ca^{2+} -Kinetik eine erhaltene bzw. gesteigerte kontraktile Funktion aufweist. So zeigten auch Untersuchungen, die die Sarkomerfunktion der Kardiomyozyten von db/db-Mäusen darstellten, eine unveränderte kontraktile Amplitude sowie eine unveränderte Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit im Vergleich zur nicht-diabetischen Kontrollgruppe (110). Bisher unbekannte Faktoren könnten dazu beitragen, dass die im Rahmen dieser Arbeit gemessene Kontraktilität der db/db-Mäuse nicht nur erhalten, sondern sogar gesteigert ist. Hier könnten beispielsweise metabolische Faktoren relevant sein, denn diabetische Herzen generieren fast ausschließlich mittels β -Oxidation freier Fettsäuren Energie (142). Eine

Studie von Abdurrachim et al. (143) zeigte, dass Veränderungen des kardialen Stoffwechsels der db/db-Maus sich positiv auf die Herzfunktion auswirken können und vor der Ausbildung einer Herzinsuffizienz schützen.

Es lässt sich folgern, dass Studien unterschiedliche Ergebnisse liefern, was die Kraftentwicklung im diabetischen Myokard von db/db-Mäusen angeht. Zukünftig könnten einheitliche Methoden eine bessere Vergleichbarkeit ermöglichen.

4.2.2 Gesteigerte Kontraktilität des diabetischen Myokards nach β -adrenerger Rezeptor-Stimulation

Nachdem sich unter basalen Bedingungen eine gesteigerte Kontraktilität gezeigt hat, wurde der Einfluss der β -adrenergen Rezeptor-Stimulation auf die Kraftentwicklung der im Organbad untersuchten Papillarmuskeln betrachtet. Nach β -adrenerger Rezeptor-Stimulation konnte ein stärkeres Ansprechen des diabetischen Myokards auf die ansteigende Isoprenalinkonzentration nachgewiesen werden.

In der Literatur finden sich dazu widersprüchliche Aussagen. So untersuchte eine Studie von Jiang et al. (144) die Kraftentwicklung der Papillarmuskeln von Ratten mit einer diabetischen Stoffwechsellage (*Zucker-Diabetic-Fatty* Ratten). Hier zeigte sich nach Stimulation mit Isoprenalin eine reduzierte Kraftentwicklung der diabetischen Tiere im Vergleich zur Kontrollgruppe. Des Weiteren wurde beobachtet, dass die Expression der β_1 -Adrenozeptoren und β_2 -Adrenozeptoren im diabetischen Rattenherz herunterreguliert war und für die verringerte Ansprechbarkeit auf Isoprenalin verantwortlich gemacht wurde (144). Es wird angenommen, dass der Diabetes mellitus mit einer erhöhten Sympathikusaktivität einhergeht (145) und so erhöhte Katecholaminspiegel zur verminderten Expression von β -adrenergen Rezeptoren beitragen könnten (146). Jiang et al. (144) gehen jedoch davon aus, dass zugleich veränderte β -adrenerge Signalwege den Einfluss von Isoprenalin auf das diabetische Myokard modulieren. Auch andere Studien mit Tiermodellen für den Diabetes mellitus Typ 1 stellten eine verringerte β -adrenerge Ansprechbarkeit des diabetischen Myokards fest (147-149).

Dagegen zeigten Ratten nach Induktion eines Diabetes mellitus mittels Injektion von Streptozotocin eine verstärkte β -adrenerge Reaktion auf Isoprenalin (150). Die Studie von Sellers und Chess-Williams (150) wurde am isoliert perfundierten Rattenherz durchgeführt, bei denen die diabetische Stoffwechsellage lediglich für zwei Wochen bestand. Sie schlossen, dass Abweichungen in den Literaturdaten am ehesten auf die unterschiedliche

Dauer der diabetischen Stoffwechsellaage zurückzuführen sind (150). Unterstützt wird diese Annahme von einer Studie, die eine gesteigerte Reaktion auf Isoprenalin der Papillarmuskeln von Ratten nach zweiwöchiger, nicht aber nach zwölfwöchiger Diabetesdauer feststellten (151). Die von Sellers und Chess-Williams (150) beobachtete verstärkte Ansprechbarkeit auf die β -adrenerge Rezeptor-Stimulation könnte daher nicht von Dauer sein und nur vorübergehend auftreten. Es ist möglich, dass Vergleichbares auch bei der db/db-Maus stattfindet. So könnte die in dieser Arbeit gemessene gesteigerte Ansprechbarkeit des diabetischen Myokards auf die β -adrenerge Rezeptor-Stimulation auch nur transient sein und mit dem Alter der Mäuse bzw. der Dauer der diabetischen Stoffwechsellaage zusammenhängen. Zukünftige Studien könnten diese Hypothese untersuchen.

Eine plausible Erklärung für die verstärkte Reaktion nach β -adrenerger Rezeptor-Stimulation liefert die in dieser Arbeit gemessene gesteigerte Ca^{2+} -Sensitivität des diabetischen Myokards (siehe Kapitel 4.2.4). Wie bei den Wildtyp-Mäusen bereits erläutert (siehe Kapitel 4.1.2), führt der β -adrenerge Agonist Isoprenalin über eine Aktivierung der PKA zur Phosphorylierung von Ca^{2+} -regulierenden Proteinen und die im Zytosol vorliegende Ca^{2+} -Konzentration erhöht sich (128, 129). Liegt eine erhöhte Ca^{2+} -Sensitivität des diabetischen Myokards vor, kann dies den stärkeren Anstieg der Kontraktionskraft nach β -adrenerger Rezeptor-Stimulation im Vergleich zum nicht-diabetischen Myokard erklären.

Zusammenfassend kann gefolgert werden, dass in der Literatur unterschiedliche Aussagen bezüglich der Reaktion des diabetischen Myokards auf die β -adrenerge Rezeptor-Stimulation bestehen. Im Gesamten ist die gesteigerte Ansprechbarkeit auf die β -adrenerge Rezeptor-Stimulation mit anderen Befunden der vorliegenden Arbeit vereinbar und passt zu der erhöhten Ca^{2+} -Sensitivität des diabetischen Myokards.

4.2.3 Tendenziell verringerte Kontraktilität des diabetischen Myokards bei zunehmender Vorspannung

Mit zunehmender Vorspannung zeigte sich ein tendenziell stärkerer Abfall der Kraftamplitude sowie der Geschwindigkeit des Kraftanstiegs des diabetischen Myokards ohne statistische Signifikanz. Die Geschwindigkeit des Kraftabfalls fiel mit zunehmender Vorspannung stärker ab als bei der Kontrollgruppe mit statistischer Signifikanz.

Wie bei den Wildtyp-Mäusen bereits erläutert, kann die Erhöhung der Vorspannung durch optimale Überlappung der dünnen und dicken Myofilamente zur erhöhten Kraftentwicklung

beitragen (132), was für den Frank-Starling-Mechanismus essentiell ist (133) (siehe Kapitel 1.3.2). Bei den Messungen der Kontraktilität der Papillarmuskeln führte die Erhöhung der Vorspannung zur Abnahme der kontraktilen Funktion. Dies lässt darauf schließen, dass die Muskeln über die optimale Sarkomerlänge hinaus gedehnt wurden, die Überlappung der Filamente vermindert ist und die Querbrückenbildung erschwert (132). Die Muskeln wurden durch die zunehmende Vorspannung überdehnt und durch die mechanische Belastung geschädigt, was die Abnahme der kontraktilen Funktion erklärt.

Interessanterweise zeigte das diabetische Myokard unter basalen Bedingungen eine gesteigerte Kraftentwicklung, während es bei Belastung durch Erhöhung der Vorspannung eine verringerte Kontraktilität aufwies. Dabei könnten verschiedene pathophysiologische Veränderungen im diabetischen Myokard eine Rolle spielen. Bei einer starken Dehnung des Muskels ist vor allem die durch die extrazelluläre Matrix vermittelte passive Steifigkeit des Myokards relevant (152). Es hat sich gezeigt, dass das Myokard von db/db-Mäusen durch erhöhte Kollagenablagerung zur Fibrose neigt (153). Die dadurch bedingte Änderung der passiven Steifigkeit könnte erklären, warum die Kontraktilität der db/db-Mäuse tendenziell stärker abfällt als die der nicht-diabetischen Gruppe. Ein weiterer Aspekt ist die Umstellung des Stoffwechsels der Kardiomyozyten von der Glykolyse hin zur β -Oxidation von Fettsäuren (154). Dies ist mit einem erhöhten Sauerstoffverbrauch im Myokard verbunden (155) und führt darüber hinaus zur Ansammlung von reaktiven Sauerstoffspezies, was die Zellen schädigt (156). Diese metabolischen Veränderungen sind mit einer kontraktilen Dysfunktion assoziiert (157) und könnten eine Erklärung für die eingeschränkte Anpassungsfähigkeit des diabetischen Myokards unter Belastung liefern.

4.2.4 Erhöhte Ca^{2+} -Sensitivität des diabetischen Myokards

Die Messung der Ca^{2+} -Sensitivität erfolgte an gehäuteten Muskelfasern des vorderen Papillarmuskels. Es zeigte sich eine deutliche Linksverschiebung der Kraft-Kalzium-Kurve mit einem erhöhten pCa_{50} -Wert, was für eine erhöhte Ca^{2+} -Sensitivität des diabetischen Myokards spricht.

Eine Studie von Greenman et al. (158) untersuchte die Ca^{2+} -Sensitivität in Kardiomyozyten von Ratten, die durch eine Mutation im Leptinrezeptor eine diabetische Stoffwechsellage entwickelten (Zucker-*Diabetic-Fatty* Ratten). Dabei wurde eine gesteigerte Sensitivität der Myofilamente für Ca^{2+} mit einem erhöhten pCa_{50} -Wert festgestellt (158). Bekannt ist, dass die Ca^{2+} -Sensitivität durch Phosphorylierung von Myofilamentproteinen moduliert werden

kann (71, 72). Greenman et al. (158) untersuchten daher den Phosphorylierungsstatus von verschiedenen Proteinen, darunter TnI. TnI ist die inhibitorische Untereinheit des Troponinkomplexes und besitzt an Serin 23 und Serin 24 jeweils eine Phosphorylierungsstelle. Wird TnI an beiden phosphoryliert, reduziert sich die Ca^{2+} -Affinität der Ca^{2+} -bindenden Untereinheit TnC und die Ca^{2+} -Sensitivität nimmt ab (159). Bei den Versuchen stellten sie eine reduzierte Phosphorylierung des TnI an den genannten Phosphorylierungsstellen fest, was die erhöhte Sensitivität der Myofilamente für Ca^{2+} erklären würde. Sie untersuchten auch den Phosphorylierungsstatus von anderen Myofilamentproteinen, die sich jedoch unverändert darstellten (158). Auch in db/db-Mäusen zeigten Funk et al. (110) eine verminderte Expression des an Serin 23 und 24 phosphorylierten TnI. Dies könnte die in der vorliegenden Arbeit beobachtete erhöhte Ca^{2+} -Sensitivität erklären. Beachtet werden muss, dass auch andere Mechanismen potentiell Einfluss auf die Ca^{2+} -Sensitivität nehmen können. Zukünftige Studien könnten analog zu den Versuchen von Greenman et al. (158) auch in db/db-Mäusen den Phosphorylierungsstatus anderer Proteine untersuchen.

Weitere publizierte Literaturdaten liefern widersprüchliche Ergebnisse, was die Sensitivität der Myofilamente für Ca^{2+} angeht. So zeigte sich in anderen Tiermodellen eine unveränderte (160) oder auch reduzierte Ca^{2+} -Sensitivität (161) im diabetischen Myokard. Auch beim Menschen bestehen Hinweise darauf, dass die Ca^{2+} -Sensitivität im Myokard des Diabetikers erniedrigt ist. Dabei muss angemerkt werden, dass diese Patienten bereits eine diastolische Dysfunktion und damit Anzeichen einer diabetischen Kardiomyopathie gezeigt hatten (162). Beachtet werden muss, dass die Ca^{2+} -Sensitivität längenabhängig ist (67) und die Vergleichbarkeit der Ergebnisse von Studien dadurch limitiert wird, dass unterschiedliche Vordehnungen der Muskelfasern bzw. Kardiomyozyten erfolgten.

Eine erhöhte Ca^{2+} -Sensitivität geht mit einer gesteigerten Kontraktilität einher, kann aber auch die Relaxation des Muskels erschweren (67). Greenman et al. (158) leiteten ab, dass die erhöhte Sensitivität der Myofilamente für Ca^{2+} dabei hilft, die kontraktile Funktion des Myokards zu erhalten, und damit einen Mechanismus darstellt, der die veränderte Ca^{2+} -Kinetik kompensieren könnte. Im Hinblick auf die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit kann die erhöhte Ca^{2+} -Sensitivität eine Erklärung für die erhaltene Kontraktilität des diabetischen Myokards liefern. In diesem Fall ist die kontraktile Funktion des diabetischen Myokards unter basalen Bedingungen nicht nur erhalten, sondern stellt sich gegenüber den nicht-diabetischen Mäusen erhöht dar. Hier spielen womöglich noch andere Faktoren eine Rolle

(siehe Kapitel 4.2.1). Berücksichtigt man die Ergebnisse der Studie am Menschen, bei denen eine diastolische Dysfunktion sowie eine erniedrigte Ca^{2+} -Sensitivität im diabetischen Myokard vorlagen (162), kann eine Hypothese formuliert werden. Es lässt sich vermuten, dass die erhöhte Ca^{2+} -Sensitivität vor Ausbildung einer diabetischen Kardiomyopathie zum Erhalt der kontraktilen Funktion beiträgt. Im weiteren Verlauf geht dieser Mechanismus womöglich verloren, die Ca^{2+} -Sensitivität reduziert sich und eine diabetische Kardiomyopathie bildet sich aus (110). Dabei muss beachtet werden, dass hier Ergebnisse von Studien mit Myokard von Mensch und Maus verglichen werden. Weitere Studien sollten sich darauf fokussieren, die Sensitivität der Myofilamente für Ca^{2+} in älteren db/db-Mäusen zu untersuchen, bei denen sich bereits eine diabetische Kardiomyopathie manifestiert hat.

Zuvor wurde bereits eine gesteigerte Kraftentwicklung des diabetischen Myokards bei β -adrenerger Rezeptor-Stimulation durch Isoprenalin beschrieben (siehe Kapitel 4.2.2). Die erhöhte Ca^{2+} -Sensitivität stellt eine plausible Erklärung dafür dar.

Zusammenfassend machen verschiedene Studien unterschiedliche Aussagen über die Sensitivität des diabetischen Myokards für Ca^{2+} (158, 160-162). Die von Funk et al. (110) erhobenen Befunde einer verringerten Expression des phosphorylierten TnI stellen sich aber passend zu der in der vorliegenden Arbeit gefundenen erhöhten Ca^{2+} -Sensitivität in db/db-Mäusen dar. Auch die Daten der Kontraktilitätsmessungen im Organbad dieser Arbeit passen mit der erhöhten Ca^{2+} -Sensitivität zusammen und können durch diese zum Teil erklärt werden. Es empfiehlt sich, weitere Studien bezüglich Ursache und Auswirkung einer erhöhten Ca^{2+} -Sensitivität durchzuführen. Zudem scheint der Zeitpunkt im Erkrankungsverlauf eine Rolle zu spielen, weshalb die zeitliche Entwicklung näher beleuchtet werden sollte.

4.2.5 Unveränderte passive Steifigkeit des diabetischen Myokards

Die passive Steifigkeit des diabetischen Myokards wurde an gehäuteten Muskelfasern des vorderen Papillarmuskels untersucht. Es wurden db/db sowie db/+ -Mäuse im Alter von 10-12 Wochen verwendet. Dabei zeigte sich die passive Steifigkeit des diabetischen Myokards gegenüber der nicht-diabetischen Kontrollgruppe unverändert.

In der publizierten Literatur hingegen finden sich Daten, die auf eine erhöhte passive Steifigkeit des diabetischen Myokards hindeuten (110, 163-165). So untersuchte eine Studie von Hamdani et al. (163) die Kardiomyozyten von db/db-Mäusen und stellte eine erhöhte passive Steifigkeit im Vergleich zu db/+ -Mäusen fest. Es ist bekannt, dass das Titinmolekül

durch Phosphorylierung modifiziert werden kann, was wiederum Auswirkungen auf die passive Kraftentwicklung eines Muskels hat (166). In der von Hamdani et al. (163) durchgeführten Studie konnte ein veränderter Phosphorylierungsstatus mit Hypophosphorylierung der N2B-Isoform des Titins festgestellt werden, welcher für die veränderte Steifigkeit verantwortlich gemacht wurde. Im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit, bei der Muskelfasern untersucht wurden, wurden in der Studie einzelne Kardiomyozyten isoliert und analysiert. Zudem waren die Mäuse 16 Wochen alt (163). Auch in Bezug auf den Menschen bestehen Hinweise darauf, dass sich beim Diabetiker eine erhöhte passive Steifigkeit des Herzmuskels ausbildet. So zeigte eine Studie, bei der Biopsien von Patienten mit Diabetes und vorliegender Aortenklappenstenose untersucht wurden, dass die Kardiomyozyten im Vergleich zu Patienten ohne Diabetes eine erhöhte passive Kraft entwickeln. Gleichzeitig wurde hier auch eine geringere Phosphorylierung der steiferen N2B-Isoform des Titins festgestellt, die als ursächlich angesehen wurde (164). Dies deckt sich mit den Ergebnissen von Hopf et al. (165), die ebenfalls eine erhöhte passive Steifigkeit in Kardiomyozyten von Diabetikern sowie eine veränderte Phosphorylierung des Titins nachwiesen. Zu beachten ist, dass die Patienten Medikamente erhielten, die Einfluss auf den Phosphorylierungsstatus nehmen. Zudem wurde hier nicht zwischen Diabetes mellitus Typ 1 und 2 unterschieden (165).

Es wird angenommen, dass eine erhöhte kardiale Steifigkeit beim Diabetiker zur Entwicklung einer diastolischen Dysfunktion beiträgt. Diese ist mit dem Risiko assoziiert, eine Herzinsuffizienz zu entwickeln (167). Eine beim Diabetiker auftretende diastolische Dysfunktion wird auch als Erstmanifestation einer diabetischen Kardiomyopathie verstanden (168). Eine erhöhte passive Steifigkeit des Myokards könnte dabei einen Beitrag leisten (167). In der vorliegenden Arbeit wurden die diabetischen Mäuseherzen im Alter von 10-12 Wochen untersucht. Dies ist ein Zeitpunkt, zu dem erfahrungsgemäß noch keine diabetische Kardiomyopathie vorliegt. Dies hat eine Studie von Funk et al. (110) gezeigt, die db/db und db/+ -Tiere im Alter von 10-12 Wochen mittels MRT untersuchten. In diesem Alter ließ sich demnach noch keine reduzierte Herzfunktion der diabetischen Tiere feststellen. Daneben zeigte sich ebenfalls eine erhöhte passive Kraftentwicklung der diabetischen Tiere (110). Funk et al. (110) leiteten aus ihren Versuchen ab, dass die erhöhte passive Steifigkeit im diabetischen Myokard die myokardiale Kraftentwicklung unterstützt und daher einen Mechanismus darstellt, die gestörte Ca^{2+} -Homöostase (siehe Kapitel 4.2.1) im diabetischen Mäuseherz zu kompensieren.

Die Literatur scheint eindeutig, was die passive Steifigkeit des diabetischen Myokards betrifft. So zeigte sich in vielen Studien eine erhöhte passive Steifigkeit im diabetischen Myokard (110, 163-165). Dies konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Den Annahmen von Funk et al. (110) nach scheint eine erhöhte passive Steifigkeit jedoch nicht immer nachteilig für die Herzfunktion, sondern könnte insbesondere beim Diabetiker dazu beitragen, die kontraktile Funktion zu erhalten. Ob diese Annahme zutrifft, muss in weiteren Untersuchungen überprüft werden.

4.3 Kritische Beurteilung der verwendeten Tiermodelle und Methoden

4.3.1 Myokardiale Ischämie und Reperfusion im Mausmodell

In dieser Arbeit wurden Wildtyp-Mäuse verwendet, bei denen durch Ligatur der LAD ein Myokardinfarkt erzeugt wurde. Die Ischämie wurde dabei für 60 Minuten aufrechterhalten, gefolgt von einer 9-12-tägigen Phase der Reperfusion. Das genaue Vorgehen wurde in Kapitel 2.2.1 beschrieben. Die Ligatur eines Koronargefäßes und anschließende Reperfusion ist eine etablierte Methode für die Induktion eines Myokardinfarktes (169-171).

Im Vergleich zum Modell der permanenten LAD Ligatur wird beim Ischämie/Reperfusionsmodell die Perfusion im infarzierten Gewebe wiederhergestellt (139). Dies stimmt mit dem klinischen Vorgehen überein, denn nach den Leitlinien der *European Society of Cardiology* sollen Patienten mit Myokardinfarkt schnellstmöglich einer Reperfusionstherapie zugeführt werden (18). Das Modell eignet sich daher gut, um die klinische Situation darzustellen (172).

Der Myokardinfarkt des Versuchstiers wird durch Ligatur der Koronararterie künstlich erzeugt. Beim Menschen hingegen entsteht der Myokardinfarkt als akutes Ereignis durch bestehende Risikofaktoren, die zum thrombotischen Verschluss der Arterie führen (6, 173). Dies kann im Tiermodell schlecht dargestellt werden. Die verwendeten Versuchstiere sind abgesehen von dem Infarkt gesund und haben keine Komorbiditäten, wie sie häufig beim Patienten mit Myokardinfarkt vorliegen (174). Dies ist vorteilhaft, da die Effekte der myokardialen Ischämie so unabhängig von Begleiterkrankungen, vor allem unabhängig von der Atherosklerose, untersucht werden können.

Die Ligatur des Gefäßes erfolgte stets an der gleichen Lokalisation und auch Ischämie und Reperfusion erfolgten zu vorab klar definierten Zeitpunkten. Dies macht die Ergebnisse reproduzierbar und sorgt für eine gute Vergleichbarkeit.

Im Gesamten stellt das Tiermodell also eine gute Möglichkeit dar, Fragestellungen im Zusammenhang mit einem Myokardinfarkt zu untersuchen. Vorteilhaft ist vor allem die Ähnlichkeit des *Closed-chest* Modells mit atraumatischer Ischämie und Reperfusion zur klinischen Situation.

4.3.2 Diabetes mellitus Typ 2 im Mausmodell

Homozygote Leptinrezeptor-defiziente db/db-Mäuse sind ein etabliertes Tiermodell für den Diabetes mellitus Typ 2 (114). In Kapitel 1.5.3 wurde das Tiermodell mit seinen metabolischen Charakteristiken bereits beschrieben. Im Folgenden soll beurteilt werden, inwiefern das Modell das Krankheitsbild des Diabetes mellitus Typ 2 beim Menschen widerspiegelt und welche Limitationen bestehen.

Die Stoffwechselveränderungen bei der db/db-Maus entstehen durch eine monogenetische Veränderung (115). Die Entstehung des Diabetes mellitus Typ 2 beim Menschen hingegen ist multifaktoriell und umfasst neben genetischen Faktoren auch Umweltfaktoren (175).

Wie auch beim Menschen entwickelt die db/db-Maus eine diabetische Stoffwechsellage, die durch Hyperglykämie, Hyperinsulinämie sowie Insulinresistenz gekennzeichnet ist (90, 113, 119). Darüber hinaus weist sie ein ausgeprägtes Übergewicht auf (119), was auch beim Menschen mit dem Auftreten von Diabetes mellitus Typ 2 assoziiert ist (176). Auch die zellulären pankreatischen Veränderungen der diabetischen Tiere (120) ähneln denen von Typ 2 Diabetikern, bei denen sich eine Beta-Zell-Dysfunktion ausbildet (177).

Die Hyperglykämien sind bei der db/db-Maus sehr ausgeprägt (121). Im Vergleich dazu zeigen sich beim Diabetiker durchschnittlich niedrigere Blutglukosespiegel (178). Auch der zeitliche Verlauf der metabolischen Veränderungen variiert und so entwickeln diabetische Mäuse schon im frühen Alter eine diabetische Stoffwechsellage (119). Beim Typ 2 Diabetiker handelt es sich eher um einen schleichenden Verlauf, der sich oft erst im fortgeschrittenen Alter manifestiert (94).

Während Diabetiker häufig eine ausgeprägte Dyslipidämie mit erniedrigtem *High-Density-Lipoprotein*-Cholesterin aufweisen (179), konnten bei der db/db-Maus erhöhte *High-Density-Lipoprotein*-Cholesterinwerte festgestellt werden (180). Zudem zeigte sich, dass die

db/db-Maus im Vergleich zu heterozygoten nicht-diabetischen Tieren ein geringeres Risiko für atherosklerotische Veränderungen aufweist (181). Beim Diabetiker hingegen sind durch die Atherosklerose bedingte makrovaskuläre Komplikationen eine häufige Folgeerkrankung des Diabetes (182).

Ein weiterer Punkt, den es zu bedenken gilt, ist die limitierte Verfügbarkeit von db/db-Mäusen (113). Dies liegt daran, dass die db/db-Weibchen infertil sind (183), was die Zucht der Tiere erschwert. Die Verwendung von db/db-Mäusen in der Diabetesforschung ist daher kostenintensiv (113) und auch tierschutzrechtlich zu bedenken. Die Lebensspanne der db/db-Mäuse ist außerdem stark verkürzt (115). Studien, die langfristige Effekte beobachten sind daher nicht durchführbar.

Zusammenfassend lässt sich schlussfolgern, dass das Tiermodell nicht in der Lage ist das komplexe Krankheitsbild des Diabetes mellitus Typ 2 allumfassend abzubilden. Jedoch bestehen zwischen einem Typ 2 Diabetiker und der db/db-Maus durchaus Parallelen. Das Tiermodell eignet sich daher für die Beantwortung von Fragestellungen im Zusammenhang mit dem Diabetes mellitus Typ 2.

4.3.3 Kraftmessungen am Organbad

Organbadmessungen sind eine etablierte Methode, um die Kontraktilität von Organen *in vitro* zu untersuchen (184-186). Bei den Messungen am Organbad wurde der hintere Papillarmuskels des linken Ventrikels untersucht. Dabei wurden die Papillarmuskeln isoliert und in die Gewebekammer eingebracht, die mit einer physiologischen Nährlösung gefüllt war.

Bei den Versuchen am Organbad ist die Präparation ein entscheidender und kritischer Vorgang. Zum einen musste die Präparation des Papillarmuskels sehr schnell erfolgen. Zum anderen musste diese sehr behutsam durchgeführt werden. In jedem Fall galt es, starken Zug auf das Gewebe zu vermeiden. Die Muskeln erfuhren so bei Präparation und Fixierung in der Gewebekammer mehr oder weniger mechanische Belastung, was Auswirkungen auf die Kraftentwicklung haben kann. Zu beachten ist, dass die Methodik daher nur für Geübte in der Präparation zugänglich ist. Des Weiteren konnte beim Präparieren der Papillarmuskel nicht gänzlich vom ventrikulärem Myokardgewebe befreit werden. Auch dies kann Auswirkungen auf die Kraftentwicklung haben.

Auch die optimale Vorbereitung der Nährlösung ist ein kritischer Schritt. Es ist essentiell, dass die Temperatur und der pH-Wert der verwendeten Nährlösung konstant gehalten

werden. Zudem muss berücksichtigt werden, dass die Versorgung des Gewebes in der Organbadapparatur mit Sauerstoff und Nährstoffen durch Diffusion limitiert ist. Eine verminderte Oxygenierung könnte sich negativ auf die Kraftentwicklung auswirken (187).

Versuche am Organbad bieten generell den Vorteil, dass die Messungen unabhängig von hämodynamischen Faktoren wie Vor- und Nachlast oder der Herzfrequenz sind. Diese können sogar gezielt variiert und der Einfluss gemessen werden (187). Ferner besteht die Möglichkeit der direkten pharmakologischen Stimulation mit verschiedenen Substanzen. Jedoch muss bedacht werden, dass die Versuche an isolierten Papillarmuskeln nicht die *in vivo* Situation widerspiegeln können. So werden die im Organismus physiologisch herrschenden Bedingungen vernachlässigt, wie beispielsweise hormonelle Wirkungen oder nervale Innervation (187). Auch die kontraktile Funktion des Herzens als Ganzes kann nicht dargestellt werden. Nichtsdestotrotz eignen sich gerade die Papillarmuskeln für die Organbadmessungen, weil diese einerseits reproduzierbar identifiziert werden können und sie andererseits für Messungen der Kontraktilität aufgrund ihrer parallelen Muskelfaseranordnung ideal sind.

4.3.4 Kraftmessungen gehäuteter Muskelfasern

Die aktive und passive Kraftentwicklung wurde an gehäuteten Muskelfasern durchgeführt. Dabei handelt es sich um eine etablierte Methode, um die Ca^{2+} -Sensitivität (188, 189) und auch die passive Steifigkeit (190) von Muskelpräparaten zu untersuchen.

Durch einen mechanischen oder chemischen Häutungsprozess besteht ein direkter Zugang zu den Myofilamenten der Muskelzelle. Jedoch bildet dies nicht die Situation im lebenden Organismus ab. Der Häutungsprozess der Fasern geht neben dem Verlust der Zellmembran auch mit dem Wegfall von intrazellulären Komponenten wie den Zellorganellen einher. Es wird angenommen, dass insbesondere die Ca^{2+} -Sensitivität durch verschiedene Kinasen und Proteasen moduliert werden kann (67). Auch die Ca^{2+} -Sensitizer Taurin und Carnosin gehen verloren und es resultiert eine niedrigere Ca^{2+} -Sensitivität (191). Die Kraftmessungen von gehäuteten Muskelfasern bilden daher nicht die Kraftentwicklung *in vivo* ab. Nichtsdestotrotz kommt es durch den Häutungsprozess zum Wegfall von Einflussfaktoren und die Sarkomerfunktion kann unabhängig von diesen betrachtet werden. Das komplexe System wird so auf die wesentlichen Komponenten reduziert und erlaubt die eindeutige Charakterisierung der Sarkomerantwort (67).

Es war wichtig, die Messungen bei einer konstanten Temperatur durchzuführen, da Änderungen der Ca^{2+} -Sensitivität auch durch Temperaturschwankungen hervorgerufen werden können (192). Die Messungen wurden daher stets bei Raumtemperatur durchgeführt.

Beim Zuschneiden der Muskelfasern mussten Präparate mit einem geringen Faserdurchmesser hergestellt werden. Dies war essenziell, um eine ausreichende Diffusion von ATP aus den Versuchslösungen zu gewährleisten (193). Die gemessenen Kräfte wurden auf die Querschnittsfläche der jeweiligen Faser bezogen und die Werte damit normalisiert.

Die passiven Kräfte wurden durch schrittweise Dehnung der Faser erzeugt und auch bei der aktiven Kraftmessung wurde die Muskelfaser vorgedehnt. Dazu wurde die Ruhesarkomerlänge manuell eingestellt und die Faserlänge bestimmt. Durch Ungenauigkeiten kann es im Folgenden dazu kommen, dass die Muskelfaser mehr oder weniger gedehnt wird als eigentlich erwünscht.

4.4 Schlussfolgerungen

remote Myokard:

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten darauf hin, dass die kontraktile Funktion des *remote* Myokards 9-12 Tage nach I/R unter basalen Bedingungen sowie nach β -adrenerger Stimulation unverändert ist. Dabei scheint sich die initial verminderte Kontraktionskraft des *remote* Myokards nach MI im Verlauf der inflammatorischen und proliferativen Postinfarktphase zu stabilisieren, was auf eine Erholung des kontraktiven Apparates zwischen Tag 1 und Tag 10 hindeutet. Es lässt sich vermuten, dass hier Prozesse des myokardialen *Remodelings* in Kraft treten und die erhöhte mechanische Belastung nach MI kompensiert wird. Diese adaptiven Vorgänge könnten im beschriebenen Zeitraum zum Erhalt der kontraktiven Funktion beitragen und so die Herzfunktion aufrechterhalten. Ferner konnten die Versuche zur Fasermessung eine tendenziell erhöhte, jedoch nicht signifikant veränderte Ca^{2+} -Sensitivität sowie passive Steifigkeit zeigen. Passend dazu postulieren Kötter et al. (126), dass eine erhöhte passive Steifigkeit des *remote* Myokards früh nach MI einen entscheidenden Beitrag zum *Remodeling* leistet. Im weiteren zeitlichen Verlauf fällt diese ab, was darauf schließen lässt, dass die erhöhte passive Steifigkeit als Mechanismus, der die kardiale Funktion erhält, nicht mehr erforderlich ist (126). In der vorliegenden Arbeit zeigte sich 9-12 Tage nach I/R eine unveränderte passive Steifigkeit, was die Hypothese von Kötter et al. (126) stützt.

Abschließend lässt sich sagen, dass das *remote* Myokard 9-12 Tage nach I/R fähig ist, seine kontraktile Funktion zu erhalten. Am ehesten sind hier Anpassungsmechanismen im Rahmen des *Remodelings* relevant.

Diabetisches Myokard:

Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse sprechen dafür, dass der Diabetes mellitus Typ 2 bereits vor dem Auftreten einer diabetischen Kardiomyopathie mit Veränderungen des Myokards einhergeht, die die kardiale Funktion beeinflussen können. So kommt es auf molekularer Ebene sowohl zu maladaptiven als auch kompensatorischen Alterationen der Sarkomerfunktion. Ein zentraler Mechanismus ist der Ca^{2+} -Kreislauf mitsamt der Ca^{2+} -regulierenden Proteine und der Ca^{2+} -Sensitivität. Die in dieser Arbeit gemessene erhöhte Ca^{2+} -Sensitivität scheint einen Mechanismus darzustellen, der die veränderte Ca^{2+} -Kinetik im diabetischen Myokard kompensiert und somit die kontraktile Funktion erhält (158). Im weiteren Verlauf der Erkrankung könnte diese Kompensation jedoch verloren gehen, die Ca^{2+} -Sensitivität reduziert sich, was zur konsekutiven Ausbildung einer diabetischen Kardiomyopathie beiträgt (110). In der vorliegenden Arbeit zeigt das diabetische Myokard unter basalen Bedingungen nicht nur eine erhaltene, sondern sogar eine gesteigerte kontraktile Funktion. Auch findet sich eine erhöhte β -adrenerge Ansprechbarkeit des Myokards bei den db/db-Mäusen. Die erhöhte Ca^{2+} -Sensitivität des diabetischen Myokards bietet eine plausible Erklärung dafür. Die passive Steifigkeit des diabetischen Myokards stellte sich in dieser Arbeit unverändert dar. Die Auswirkungen der in der Literatur beschriebenen erhöhten passiven Steifigkeit scheinen noch nicht eindeutig geklärt zu sein. Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass eine erhöhte passive Steifigkeit analog zur Ca^{2+} -Sensitivität vor Ausbildung einer diabetischen Kardiomyopathie die Kraftentwicklung des diabetischen Myokards fördert. Somit könnte es sich um einen adaptiven Prozess handeln, der dem gestörten Ca^{2+} -Kreislauf entgegentritt (110).

4.5 Ausblick

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit als Ausgangspunkt für vertiefende Analysen dienen können.

Interessant wäre es, in zukünftigen Studien verschiedene Zeitpunkte nach I/R zu betrachten, um darzustellen, wie sich die kontraktile Funktion, die β -adrenerge Ansprechbarkeit, die Ca^{2+} -Sensitivität sowie die passive Steifigkeit des *remote* Myokards im Verlauf verändern. Zudem könnten für ein besseres Verständnis die molekulare Expression und Affinität von

β -adrenergen Rezeptoren sowie Proteinen des β -adrenergen Signalwegs näher betrachtet werden. Auch die damit einhergehende Veränderung der Ca^{2+} -Sensitivität ist ein Ansatzpunkt. Ein besseres Verständnis dieser Vorgänge und Adaptationsmechanismen in den Kardiomyozyten könnte auch einen klinischen Nutzen liefern und für Patienten nach MI relevant sein.

Es zeigt sich außerdem ein Bedarf an weiterführenden Untersuchungen des Ca^{2+} -Kreislaufs bei db/db-Mäusen. Hier ist eine Identifizierung der Mechanismen bzw. Proteine, die eine erhöhte Ca^{2+} -Sensitivität des diabetischen Myokards bedingen, naheliegend. Darüber hinaus scheint eine genaue Evaluierung der myokardialen Veränderungen der db/db-Mäuse im zeitlichen Verlauf erforderlich, um die Auswirkungen einer diabetischen Kardiomyopathie sowie der Dauer diabetischen Stoffwechsellaage zu beleuchten.

Vor dem Hintergrund, dass Diabetiker häufig einen MI erleiden (102) und dieser mit einer schlechten Prognose assoziiert ist (103), können auch Studien relevant sein, die die kontraktile Funktion des *remote* Myokards beim Diabetiker untersuchen. Zukünftige Projekte könnten hier ansetzen, um neue therapeutische Ansätze zu entwickeln.

5 Literaturverzeichnis

1. World Health Organization. Cardiovascular diseases (CVDs) [Internet]. Geneva: World Health Organization; 2025 [zitiert am 12. August 2025]. Verfügbar unter: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds)).
2. Statistisches Bundesamt (Destatis). Statistischer Bericht - Todesursachen in Deutschland 2023. Wiesbaden: Statistisches Bundesamt; 2024. Verfügbar unter: <https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/Publikationen/Downloads-Todesursachen/statistischer-bericht-todesursachen-2120400237005.html>.
3. Statistisches Bundesamt (Destatis). Todesursachen nach Krankheitsarten 2023 [Internet]. Wiesbaden: Statistisches Bundesamt; 2025 [zitiert am 11. September 2025]. Verfügbar unter: https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/_Grafik/_Interaktiv/todesursachen-krankheitsarten.html.
4. Deutsche Herzstiftung e.V. Deutscher Herzbericht 2021. Frankfurt am Main, Deutschland: Deutsche Herzstiftung e.V.; 2022. Verfügbar unter: <https://herzstiftung.de/system/files/2022-09/DHB21-Herzbericht-2021.pdf>.
5. Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, Chaitman BR, Bax JJ, Morrow DA, et al. Fourth Universal Definition of Myocardial Infarction (2018). *Journal of the American College of Cardiology*. 2018;72(18):2231-64. DOI: 10.1016/j.jacc.2018.08.1038
6. Davies MJ. The pathophysiology of acute coronary syndromes. *Heart*. 2000;83(3):361-6. DOI: 10.1136/heart.83.3.361
7. Ross R. Atherosclerosis - an inflammatory disease. *The New England Journal of Medicine*. 1999;340(2):115-26. DOI: 10.1056/NEJM199901143400207
8. Weber C, Noels H. Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options. *Nature Medicine*. 2011;17(11):1410-22. DOI: 10.1038/nm.2538
9. Insull W, Jr. The pathology of atherosclerosis: plaque development and plaque responses to medical treatment. *The American Journal of Medicine*. 2009;122(1 Suppl):3-14. DOI: 10.1016/j.amjmed.2008.10.013
10. Bentzon JF, Otsuka F, Virmani R, Falk E. Mechanisms of plaque formation and rupture. *Circulation Research*. 2014;114(12):1852-66. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.114.302721
11. Bundesärztekammer (BÄK), Kassenärztliche Bundesvereinigung (KBV), Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF). Nationale VersorgungsLeitlinie Chronische KHK, Version 6.0. 2022. DOI: 10.6101/AZQ/000491
12. Hajar R. Risk factors for coronary artery disease: Historical perspectives. *Heart Views*. 2017;18(3):109-14. DOI: 10.4103/HEARTVIEWS.HEARTVIEWS_106_17

13. Lu L, Liu M, Sun R, Zheng Y, Zhang P. Myocardial Infarction: Symptoms and Treatments. *Cell Biochemistry and Biophysics*. 2015;72(3):865-7. DOI: 10.1007/s12013-015-0553-4
14. Arenja N, Mueller C, Ehl NF, Brinkert M, Roost K, Reichlin T, et al. Prevalence, extent, and independent predictors of silent myocardial infarction. *The American Journal of Medicine*. 2013;126(6):515-22. DOI: 10.1016/j.amjmed.2012.11.028
15. White HD, Chew DP. Acute myocardial infarction. *Lancet*. 2008;372(9638):570-84. DOI: 10.1016/s0140-6736(08)61237-4
16. Brodie BR, Webb J, Cox DA, Qureshi M, Kalynych A, Turco M, et al. Impact of time to treatment on myocardial reperfusion and infarct size with primary percutaneous coronary intervention for acute myocardial infarction (from the EMERALD Trial). *The American Journal of Cardiology*. 2007;99(12):1680-6. DOI: 10.1016/j.amjcard.2007.01.047
17. De Luca G, Suryapranata H, Ottervanger JP, Antman EM. Time delay to treatment and mortality in primary angioplasty for acute myocardial infarction: every minute of delay counts. *Circulation*. 2004;109(10):1223-5. DOI: 10.1161/01.CIR.0000121424.76486.20
18. Ibanez B, James S, Agewall S, Antunes MJ, Bucciarelli-Ducci C, Bueno H, et al. 2017 ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation: The Task Force for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation of the European Society of Cardiology (ESC). *European Heart Journal*. 2018;39(2):119-77. DOI: 10.1093/eurheartj/ehx393
19. Jenča D, Melenovský V, Stehlik J, Staněk V, Kettner J, Kautzner J, et al. Heart failure after myocardial infarction: incidence and predictors. *ESC Heart Failure*. 2021;8(1):222-37. DOI: 10.1002/ehf2.13144
20. Pfeffer MA, Braunwald E. Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications. *Circulation*. 1990;81(4):1161-72. DOI: 10.1161/01.cir.81.4.1161
21. Reimer KA, Lowe JE, Rasmussen MM, Jennings RB. The wavefront phenomenon of ischemic cell death. 1. Myocardial infarct size vs duration of coronary occlusion in dogs. *Circulation*. 1977;56(5):786-94. DOI: 10.1161/01.cir.56.5.786
22. Frangogiannis NG. The mechanistic basis of infarct healing. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2006;8(11-12):1907-39. DOI: 10.1089/ars.2006.8.1907
23. Peet C, Ivetic A, Bromage DI, Shah AM. Cardiac monocytes and macrophages after myocardial infarction. *Cardiovascular Research*. 2020;116(6):1101-12. DOI: 10.1093/cvr/cvz336
24. Ghigo A, Franco I, Morello F, Hirsch E. Myocyte signalling in leucocyte recruitment to the heart. *Cardiovascular Research*. 2014;102(2):270-80. DOI: 10.1093/cvr/cvu030

25. Frangogiannis NG. Pathophysiology of Myocardial Infarction. *Comprehensive Physiology*. 2015;5(4):1841-75. DOI: 10.1002/cphy.c150006
26. Nahrendorf M, Swirski FK, Aikawa E, Stangenberg L, Wurdinger T, Figueiredo JL, et al. The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *The Journal of Experimental Medicine*. 2007;204(12):3037-47. DOI: 10.1084/jem.20070885
27. Chen W, Frangogiannis NG. Fibroblasts in post-infarction inflammation and cardiac repair. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2013;1833(4):945-53. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2012.08.023
28. Shinde AV, Frangogiannis NG. Fibroblasts in myocardial infarction: a role in inflammation and repair. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2014;70:74-82. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2013.11.015
29. González-Santamaría J, Villalba M, Busnadiego O, López-Olañeta MM, Sandoval P, Snabel J, et al. Matrix cross-linking lysyl oxidases are induced in response to myocardial infarction and promote cardiac dysfunction. *Cardiovascular Research*. 2016;109(1):67-78. DOI: 10.1093/cvr/cvv214
30. Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, Simoons ML, Chaitman BR, White HD, et al. Third universal definition of myocardial infarction. *European Heart Journal*. 2012;33(20):2551-67. DOI: 10.1093/eurheartj/ehs184
31. Altamirano F, Wang ZV, Hill JA. Cardioprotection in ischaemia-reperfusion injury: novel mechanisms and clinical translation. *The Journal of Physiology*. 2015;593(17):3773-88. DOI: 10.1113/JP270953
32. Laflamme MA, Murry CE. Regenerating the heart. *Nature Biotechnology*. 2005;23(7):845-56. DOI: 10.1038/nbt1117
33. Konstantinidis K, Whelan RS, Kitsis RN. Mechanisms of cell death in heart disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2012;32(7):1552-62. DOI: 10.1161/ATVBAHA.111.224915
34. Hausenloy DJ, Yellon DM. Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target. *The Journal of Clinical Investigation*. 2013;123(1):92-100. DOI: 10.1172/JCI62874
35. Piper HM, García-Dorado D. Prime causes of rapid cardiomyocyte death during reperfusion. *The Annals of Thoracic Surgery*. 1999;68(5):1913-9. DOI: 10.1016/s0003-4975(99)01025-5
36. Piper HM, García-Dorado D, Ovize M. A fresh look at reperfusion injury. *Cardiovascular Research*. 1998;38(2):291-300. DOI: 10.1016/s0008-6363(98)00033-9
37. Yellon DM, Hausenloy DJ. Myocardial reperfusion injury. *The New England Journal of Medicine*. 2007;357(11):1121-35. DOI: 10.1056/NEJMra071667

38. Sutton MG, Sharpe N. Left ventricular remodeling after myocardial infarction: pathophysiology and therapy. *Circulation*. 2000;101(25):2981-8. DOI: 10.1161/01.cir.101.25.2981
39. Cleutjens JP, Blankesteijn WM, Daemen MJ, Smits JF. The infarcted myocardium: simply dead tissue, or a lively target for therapeutic interventions. *Cardiovascular Research*. 1999;44(2):232-41. DOI: 10.1016/s0008-6363(99)00212-6
40. Cohn JN, Ferrari R, Sharpe N. Cardiac remodeling—concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. *Journal of the American College of Cardiology*. 2000;35(3):569-82. DOI: 10.1016/s0735-1097(99)00630-0
41. Sun Y. Myocardial repair/remodelling following infarction: roles of local factors. *Cardiovascular Research*. 2009;81(3):482-90. DOI: 10.1093/cvr/cvn333
42. Fedak PW, Verma S, Weisel RD, Li RK. Cardiac remodeling and failure: from molecules to man (Part I). *Cardiovascular Pathology*. 2005;14(1):1-11. DOI: 10.1016/j.carpath.2004.12.002
43. Levy D, Garrison RJ, Savage DD, Kannel WB, Castelli WP. Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study. *The New England Journal of Medicine*. 1990;322(22):1561-6. DOI: 10.1056/NEJM199005313222203
44. Haider AW, Larson MG, Benjamin EJ, Levy D. Increased left ventricular mass and hypertrophy are associated with increased risk for sudden death. *Journal of the American College of Cardiology*. 1998;32(5):1454-9. DOI: 10.1016/s0735-1097(98)00407-0
45. Talman V, Ruskoaho H. Cardiac fibrosis in myocardial infarction—from repair and remodeling to regeneration. *Cell and Tissue Research*. 2016;365(3):563-81. DOI: 10.1007/s00441-016-2431-9
46. Francis Stuart SD, De Jesus NM, Lindsey ML, Ripplinger CM. The crossroads of inflammation, fibrosis, and arrhythmia following myocardial infarction. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2016;91:114-22. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2015.12.024
47. Kronenbitter A, Funk F, Hackert K, Gorreßen S, Glaser D, Boknik P, et al. Impaired Ca²⁺ cycling of nonischemic myocytes contributes to sarcomere dysfunction early after myocardial infarction. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2018;119:28-39. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2018.04.004
48. Bers DM. Calcium cycling and signaling in cardiac myocytes. *Annual Review of Physiology*. 2008;70:23-49. DOI: 10.1146/annurev.physiol.70.113006.100455
49. Kraft T, Brenner B. Muskulatur. In: Pape H-C, Kurtz A, Silbernagl S. *Physiologie*. 9., vollständig überarbeitete Auflage. Stuttgart: Thieme; 2019. p. 136-72.

50. Fürst DO, Schröder R. Quergestreifte Muskulatur. In: Heinrich PC, Müller M, Graeve L. Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie. 9., vollständig überarbeitete Auflage. Berlin: Springer; 2014. p. 787-804.
51. Lüllmann-Rauch R, Asan E. Taschenlehrbuch Histologie. 6., vollständig überarbeitete Auflage. Stuttgart: Thieme; 2019.
52. Eschenhagen T. Pharmakologie des kardiovaskulären Systems - das Herz. In: Aktories K, Förstermann U, Hofmann F, Starke K. Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie: Begründet von W Forth, D Henschler, W Rummel. 12. Auflage. München: Elsevier; 2017. p. 351-402.
53. Hoth M, Wischmeyer E. Herz. In: Behrends JC, Bischofberger J, Deutzmann R, Ehmke H, Frings S, Grissmer S, et al. Duale Reihe Physiologie. 4., unveränderte Auflage. Stuttgart: Thieme; 2021. p. 81-115.
54. Bers DM. Calcium fluxes involved in control of cardiac myocyte contraction. *Circulation Research*. 2000;87(4):275-81. DOI: 10.1161/01.RES.87.4.275
55. Scriven DRL, Dan P, Moore EDW. Distribution of proteins implicated in excitation-contraction coupling in rat ventricular myocytes. *Biophysical Journal*. 2000;79(5):2682-91. DOI: 10.1016/s0006-3495(00)76506-4
56. Klöcker N, Piper H-M. Herzerregung. In: Brandes R, Lang F, Schmidt RF. Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie. 32. Auflage. Berlin: Springer; 2019. p. 187-98.
57. Bers DM. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature*. 2002;415(6868):198-205. DOI: 10.1038/415198a
58. Lohse MJ, Engelhardt S, Eschenhagen T. What is the role of β -adrenergic signaling in heart failure? *Circulation Research*. 2003;93(10):896-906. DOI: 10.1161/01.RES.0000102042.83024.CA
59. Haase H, Bartel S, Karczewski P, Morano I, Krause EG. In-vivo phosphorylation of the cardiac L-type calcium channel beta-subunit in response to catecholamines. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 1996;163/164:99-106. DOI: 10.1007/bf00408645
60. Kamp TJ, Hell JW. Regulation of cardiac L-type calcium channels by protein kinase A and protein kinase C. *Circulation Research*. 2000;87(12):1095-102. DOI: 10.1161/01.res.87.12.1095
61. Lindemann JP, Jones LR, Hathaway DR, Henry BG, Watanabe AM. β -Adrenergic stimulation of phospholamban phosphorylation and Ca^{2+} -ATPase activity in guinea pig ventricles. *The Journal of Biological Chemistry*. 1983;258(1):464-71. DOI: 10.1016/s0021-9258(18)33279-4
62. Mundiña de Weilenmann C, Vittone L, de Cingolani G, Mattiazzi A. Dissociation between contraction and relaxation: The possible role of phospholamban phosphorylation. *Basic Research in Cardiology*. 1987;82(6):507-16. DOI: 10.1007/bf01907220

63. Kim HW, Steenaart NA, Ferguson DG, Kranias EG. Functional reconstitution of the cardiac sarcoplasmic reticulum Ca²⁺(+)-ATPase with phospholamban in phospholipid vesicles. *The Journal of Biological Chemistry*. 1990;265(3):1702-9. DOI: 10.1016/s0021-9258(19)40073-2
64. Tada M, Kirchberger MA, Repke DI, Katz AM. The stimulation of calcium transport in cardiac sarcoplasmic reticulum by adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase. *The Journal of Biological Chemistry*. 1974;249(19):6174-80. DOI: 10.1016/s0021-9258(19)42237-0
65. Huke S, Knollmann BC. Increased myofilament Ca²⁺-sensitivity and arrhythmia susceptibility. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2010;48(5):824-33. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2010.01.011
66. MacIntosh BR. Role of calcium sensitivity modulation in skeletal muscle performance. *News in Physiological Sciences*. 2003;18(6):222-5. DOI: 10.1152/nips.01456.2003
67. Chung JH, Biesiadecki BJ, Ziolo MT, Davis JP, Janssen PML. Myofilament calcium sensitivity: Role in regulation of in vivo cardiac contraction and relaxation. *Frontiers in Physiology*. 2016;7:562. DOI: 10.3389/fphys.2016.00562
68. Kentish JC, ter Keurs HE, Ricciardi L, Bucx JJ, Noble MI. Comparison between the sarcomere length-force relations of intact and skinned trabeculae from rat right ventricle. Influence of calcium concentrations on these relations. *Circulation Research*. 1986;58(6):755-68. DOI: 10.1161/01.res.58.6.755
69. Hibberd MG, Jewell BR. Calcium- and length-dependent force production in rat ventricular muscle. *The Journal of Physiology*. 1982;329(1):527-40. DOI: 10.1113/jphysiol.1982.sp014317
70. Gulati J, Babu A. Effect of acidosis on Ca²⁺ sensitivity of skinned cardiac muscle with troponin C exchange. Implications for myocardial ischemia. *FEBS Letters*. 1989;245(1-2):279-82. DOI: 10.1016/0014-5793(89)80237-6
71. Mope L, McClellan GB, Winegrad S. Calcium sensitivity of the contractile system and phosphorylation of troponin in hyperpermeable cardiac cells. *The Journal of General Physiology*. 1980;75(3):271-82. DOI: 10.1085/jgp.75.3.271
72. Morano I, Bächle-Stolz C, Katus A, Rüegg JC. Increased calcium sensitivity of chemically skinned human atria by myosin light chain kinase. *Basic Research in Cardiology*. 1988;83(4):350-9. DOI: 10.1007/bf02005820
73. Layland J, Solaro RJ, Shah AM. Regulation of cardiac contractile function by troponin I phosphorylation. *Cardiovascular Research*. 2005;66(1):12-21. DOI: 10.1016/j.cardiores.2004.12.022
74. de Tombe PP, Mateja RD, Tachampa K, Ait Mou Y, Farman GP, Irving TC. Myofilament length dependent activation. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2010;48(5):851-8. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2009.12.017
75. Freiburg A, Trombitas K, Hell W, Cazorla O, Fougère F, Centner T, et al. Series of exon-skipping events in the elastic spring region of titin as the structural basis for

- myofibrillar elastic diversity. *Circulation Research*. 2000;86(11):1114-21. DOI: 10.1161/01.res.86.11.1114
76. Granzier HL, Irving TC. Passive tension in cardiac muscle: contribution of collagen, titin, microtubules, and intermediate filaments. *Biophysical Journal*. 1995;68(3):1027-44. DOI: 10.1016/S0006-3495(95)80278-X
 77. Krüger M, Linke WA. The giant protein titin: a regulatory node that integrates myocyte signaling pathways. *The Journal of Biological Chemistry*. 2011;286(12):9905-12. DOI: 10.1074/jbc.R110.173260
 78. LeWinter MM, Wu Y, Labeit S, Granzier H. Cardiac titin: structure, functions and role in disease. *Clinica Chimica Acta*. 2007;375(1-2):1-9. DOI: 10.1016/j.cca.2006.06.035
 79. Bang ML, Centner T, Fornoff F, Geach AJ, Gotthardt M, McNabb M, et al. The complete gene sequence of titin, expression of an unusual approximately 700-kDa titin isoform, and its interaction with obscurin identify a novel Z-line to I-band linking system. *Circulation Research*. 2001;89(11):1065-72. DOI: 10.1161/hh2301.100981
 80. Cazorla O, Freiburg A, Helmes M, Centner T, McNabb M, Wu Y, et al. Differential expression of cardiac titin isoforms and modulation of cellular stiffness. *Circulation Research*. 2000;86(1):59-67. DOI: 10.1161/01.res.86.1.59
 81. Linke WA, Hamdani N. Gigantic business: titin properties and function through thick and thin. *Circulation Research*. 2014;114(6):1052-68. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.114.301286
 82. Granzier H, Labeit S. Cardiac titin: an adjustable multi-functional spring. *The Journal of Physiology*. 2002;541(Pt 2):335-42. DOI: 10.1113/jphysiol.2001.014381
 83. Anderson BR, Granzier HL. Titin-based tension in the cardiac sarcomere: molecular origin and physiological adaptations. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. 2012;110(2-3):204-17. DOI: 10.1016/j.pbiomolbio.2012.08.003
 84. Fukuda N, Sasaki D, Ishiwata S, Kurihara S. Length dependence of tension generation in rat skinned cardiac muscle: role of titin in the Frank-Starling mechanism of the heart. *Circulation*. 2001;104(14):1639-45. DOI: 10.1161/hc3901.095898
 85. Lee EJ, Peng J, Radke M, Gotthardt M, Granzier HL. Calcium sensitivity and the Frank-Starling mechanism of the heart are increased in titin N2B region-deficient mice. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2010;49(3):449-58. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2010.05.006
 86. Krüger M, Kötter S. Titin, a central mediator for hypertrophic signaling, exercise-induced mechanosignaling and skeletal muscle remodeling. *Frontiers in Physiology*. 2016;7:76. DOI: 10.3389/fphys.2016.00076
 87. Morrish NJ, Wang S-L, Stevens LK, Fuller JH, Keen H, Group at WMS. Mortality and causes of death in the WHO multinational study of vascular disease in diabetes. *Diabetologia*. 2001;44(Suppl. 2):14-21. DOI: 10.1007/pl00002934

88. Sun H, Saeedi P, Karuranga S, Pinkepank M, Ogurtsova K, Duncan BB, et al. IDF Diabetes Atlas: Global, regional and country-level diabetes prevalence estimates for 2021 and projections for 2045. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 2022;183:109119. DOI: 10.1016/j.diabres.2021.109119
89. Zhou B, Lu Y, Hajifathalian K, Bentham J, Di Cesare M, Danaei G, et al. Worldwide trends in diabetes since 1980: a pooled analysis of 751 population-based studies with 4·4 million participants. *The Lancet*. 2016;387(10027):1513-30. DOI: 10.1016/s0140-6736(16)00618-8
90. International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas, 10th Edition. Brüssel, Belgien: International Diabetes Federation; 2021. Verfügbar unter: <https://diabetesatlas.org/atlas/tenth-edition/>.
91. American Diabetes Association. Economic Costs of Diabetes in the U.S. in 2017. *Diabetes Care*. 2018;41(5):917-28. DOI: 10.2337/dci18-0007
92. Linnenkamp U, Andrich S, Icks A. Gesundheitsökonomische Aspekte des Diabetes. In: Deutsche Diabetes Gesellschaft (DDG) und diabetesDE - Deutsche Diabetes-Hilfe. Deutscher Gesundheitsbericht Diabetes 2017. Mainz, Deutschland: Kirchheim + Co GmbH; 2016.
93. World Health Organization. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications: report of a WHO consultation. Part 1: Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Genf, Schweiz: World Health Organization; 1999. Verfügbar unter: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/66040>.
94. World Health Organization. Global Report on Diabetes. Genf, Schweiz: World Health Organization; 2016. Verfügbar unter: <https://www.who.int/publications/i/item/9789241565257>.
95. Meigs JB, Cupples LA, Wilson PW. Parental transmission of type 2 diabetes: The Framingham Offspring Study. *Diabetes*. 2000;49(12):2201-7. DOI: 10.2337/diabetes.49.12.2201
96. Hu FB, Manson JE, Stampfer MJ, Colditz G, Liu S, Solomon CG, et al. Diet, lifestyle, and the risk of type 2 diabetes mellitus in women. *The New England Journal of Medicine*. 2001;345(11):790-7. DOI: 10.1056/NEJMoa010492
97. Goffrier B, Mandy S, Bätzing-Feigenbaum J. Administrative Prävalenzen und Inzidenzen des Diabetes mellitus von 2009 bis 2015. Versorgungsatlas-Bericht Nr. 17/03. Berlin, Deutschland: Zentralinstitut für die kassenärztliche Versorgung in Deutschland (Zi). 2017. Verfügbar unter: <http://www.versorgungsatlas.de/themen/alle-analysen-nach-datum-sortiert/?tab=6&uid=79>.
98. Pinhas-Hamiel O, Zeitler P. The global spread of type 2 diabetes mellitus in children and adolescents. *The Journal of Pediatrics*. 2005;146(5):693-700. DOI: 10.1016/j.jpeds.2004.12.042
99. American Diabetes Association. Type 2 diabetes in children and adolescents. *Diabetes Care*. 2000;23(3):381-9. DOI: 10.2337/diacare.23.3.381

100. International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas, 7th Edition. Brüssel, Belgien: International Diabetes Federation; 2015. Verfügbar unter: <https://diabetesatlas.org/atlas/seventh-edition/>.
101. Kannel WB, McGee DL. Diabetes and glucose tolerance as risk factors for cardiovascular disease: The Framingham study. *Diabetes Care*. 1979;2(2):120-6. DOI: 10.2337/diacare.2.2.120
102. Rytter L, Troelsen S, Beck-Nielsen H. Prevalence and mortality of acute myocardial infarction in patients with diabetes. *Diabetes Care*. 1985;8(3):230-4. DOI: 10.2337/diacare.8.3.230
103. Miettinen H, Lehto S, Salomaa V, Mähönen M, Niemelä M, Haffner SM, et al. Impact of diabetes on mortality after the first myocardial infarction. *Diabetes Care*. 1998;21(1):69-75. DOI: 10.2337/diacare.21.1.69
104. Nichols GA, Gullion CM, Koro CE, Ephross SA, Brown JB. The incidence of congestive heart failure in type 2 diabetes: An update. *Diabetes Care*. 2004;27(8):1879-84. DOI: 10.2337/diacare.27.8.1879
105. Jouven X, Lemaître RN, Rea TD, Sotoodehnia N, Empana JP, Siscovick DS. Diabetes, glucose level, and risk of sudden cardiac death. *European Heart Journal*. 2005;26(20):2142-7. DOI: 10.1093/eurheartj/ehi376
106. Rubler S, Dlugash J, Yuceoglu YZ, Kumral T, Branwood AW, Grishman A. New type of cardiomyopathy associated with diabetic glomerulosclerosis. *The American Journal of Cardiology*. 1972;30(6):595-602. DOI: 10.1016/0002-9149(72)90595-4
107. Ritchie RH, Abel ED. Basic Mechanisms of Diabetic Heart Disease. *Circulation Research*. 2020;126(11):1501-25. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.120.315913
108. Tan Y, Zhang Z, Zheng C, Wintergerst KA, Keller BB, Cai L. Mechanisms of diabetic cardiomyopathy and potential therapeutic strategies: preclinical and clinical evidence. *Nature Reviews Cardiology*. 2020;17(9):585-607. DOI: 10.1038/s41569-020-0339-2
109. Riehle C, Bauersachs J. Of mice and men: models and mechanisms of diabetic cardiomyopathy. *Basic Research in Cardiology*. 2019;114(1):1-22. DOI: 10.1007/s00395-018-0711-0
110. Funk F, Kronenbitter A, IsiĆ M, Flocke V, Gorreßen S, Semmler D, et al. Diabetes disturbs functional adaptation of the remote myocardium after ischemia/reperfusion. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2022;173:47-60. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2022.09.002
111. Belke DD, Swanson EA, Dillmann WH. Decreased sarcoplasmic reticulum activity and contractility in diabetic db/db mouse heart. *Diabetes*. 2004;53(12):3201-8. DOI: 10.2337/diabetes.53.12.3201
112. Pereira L, Matthes J, Schuster I, Valdivia HH, Herzig S, Richard S, et al. Mechanisms of [Ca²⁺]_i transient decrease in cardiomyopathy of db/db type 2 diabetic mice. *Diabetes*. 2006;55(3):608-15. DOI: 10.2337/diabetes.55.03.06.db05-1284

113. Srinivasan K, Ramarao P. Animal models in type 2 diabetes research: an overview. *Indian Journal of Medical Research*. 2007;125(3):451-72.
114. Reed MJ, Scribner KA. In-vivo and in-vitro models of type 2 diabetes in pharmaceutical drug discovery. *Diabetes, Obesity and Metabolism*. 1999;1(2):75-86. DOI: 10.1046/j.1463-1326.1999.00014.x
115. Hummel KP, Dickie MM, Coleman DL. Diabetes, a new mutation in the mouse. *Science*. 1966;153(3740):1127-8. DOI: 10.1126/science.153.3740.1127
116. Coleman DL. A historical perspective on leptin. *Nature medicine*. 2010;16(10):1097-9. DOI: 10.1038/nm1010-1097
117. Chen H, Charlat O, Tartaglia LA, Woolf EA, Weng X, Ellis SJ, et al. Evidence that the diabetes gene encodes the leptin receptor: Identification of a mutation in the leptin receptor gene in db/db mice. *Cell*. 1996;84(3):491-5. DOI: 10.1016/s0092-8674(00)81294-5
118. Wang B, Chandrasekera PC, Pippin JJ. Leptin- and leptin receptor-deficient rodent models: relevance for human type 2 diabetes. *Current Diabetes Reviews*. 2014;10(2):131-45. DOI: 10.2174/1573399810666140508121012
119. Wyse BM, Dulin WE. The influence of age and dietary conditions on diabetes in the db mouse. *Diabetologia*. 1970;6(3):268-73. DOI: 10.1007/bf01212237
120. Coleman DL, Hummel KP. Studies with the mutation, diabetes, in the mouse. *Diabetologia*. 1967;3(2):238-48. DOI: 10.1007/BF01222201
121. Dreblow CIA. Analyse der mechanischen Funktion isolierter Papillarmuskelpräparate nach akutem Myokardinfarkt [Dissertation]. Düsseldorf: Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf; 2024.
122. Rüegg JC. Calcium-Regulation der Muskelkontraktion: Die molekularen Regulationsmechanismen der Kontraktilität. *Naturwissenschaften*. 1987;74(12):579-84. DOI: 10.1007/bf00368515
123. Borlak J, Zwadlo C. The myosin ATPase inhibitor 2,3-butanedione monoxime dictates transcriptional activation of ion channels and Ca²⁺-handling proteins. *Molecular Pharmacology*. 2004;66(3):708-17. DOI: 10.1016/s0026-895x(24)05655-4
124. Perreault CL, Mulieri LA, Alpert NR, Ransil BJ, Allen PD, Morgan JP. Cellular basis of negative inotropic effect of 2,3-butanedione monoxime in human myocardium. *The American Journal of Physiology*. 1992;263(2):H503-H10. DOI: 10.1152/ajpheart.1992.263.2.H503
125. Epstein FH, Yang Z, Gilson WD, Berr SS, Kramer CM, French BA. MR tagging early after myocardial infarction in mice demonstrates contractile dysfunction in adjacent and remote regions. *Magnetic Resonance in Medicine*. 2002;48(2):399-403. DOI: 10.1002/mrm.10210
126. Kötter S, Kazmierowska M, Andresen C, Bottermann K, Grandoch M, Gorressen S, et al. Titin-based cardiac myocyte stiffening contributes to early adaptive ventricular

remodeling after myocardial infarction. *Circulation Research*. 2016;119(9):1017-29. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.116.309685

127. Binek A, Fernández-Jiménez R, Jorge I, Camafeita E, López JA, Bagwan N, et al. Proteomic footprint of myocardial ischemia/reperfusion injury: Longitudinal study of the at-risk and remote regions in the pig model. *Scientific Reports*. 2017;7(1):12343. DOI: 10.1038/s41598-017-11985-5
128. Wegener AD, Simmerman HK, Lindemann JP, Jones LR. Phospholamban phosphorylation in intact ventricles. *The Journal of Biological Chemistry*. 1989;264(19):11468-74. DOI: 10.1016/s0021-9258(18)60487-9
129. Yoshida A, Takahashi M, Imagawa T, Shigekawa M, Takisawa H, Nakamura T. Phosphorylation of ryanodine receptors in rat myocytes during beta-adrenergic stimulation. *The Journal of Biochemistry*. 1992;111(2):186-90. DOI: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a123735
130. Clozel JP, Holck M, Osterrieder W, Burkard W, Da Prada MD. Effects of chronic myocardial infarction on responsiveness to isoprenaline and the state of myocardial beta adrenoceptors in rats. *Cardiovascular Research*. 1987;21(9):688-95. DOI: 10.1093/cvr/21.9.688
131. Baumann G, Riess G, Erhardt WD, Felix SB, Ludwig L, Blümel G, et al. Impaired beta-adrenergic stimulation in the uninvolved ventricle post-acute myocardial infarction: Reversible defect due to excessive circulating catecholamine-induced decline in number and affinity of beta-receptors. *American Heart Journal*. 1981;101(5):569-81. DOI: 10.1016/0002-8703(81)90223-4
132. Gordon AM, Huxley AF, Julian FJ. The variation in isometric tension with sarcomere length in vertebrate muscle fibres. *The Journal of Physiology*. 1966;184(1):170-92. DOI: 10.1113/jphysiol.1966.sp007909
133. Shiels HA, White E. The Frank-Starling mechanism in vertebrate cardiac myocytes. *The Journal of Experimental Biology*. 2008;211(Pt 13):2005-13. DOI: 10.1242/jeb.003145
134. Avner BS, Shioura KM, Scruggs SB, Grachoff M, Geenen DL, Helseth DL, Jr., et al. Myocardial infarction in mice alters sarcomeric function via post-translational protein modification. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2012;363(1-2):203-15. DOI: 10.1007/s11010-011-1172-z
135. van der Velden J, Merkus D, Klarenbeek BR, James AT, Boontje NM, Dekkers DH, et al. Alterations in myofilament function contribute to left ventricular dysfunction in pigs early after myocardial infarction. *Circulation Research*. 2004;95(11):e85-95. DOI: 10.1161/01.RES.0000149531.02904.09
136. Venkataraman R, Baldo MP, Hwang HS, Veltri T, Pinto JR, Baudenbacher FJ, et al. Myofilament calcium de-sensitization and contractile uncoupling prevent pause-triggered ventricular tachycardia in mouse hearts with chronic myocardial infarction. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2013;60:8-15. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2013.03.022

137. Li P, Hofmann PA, Li B, Malhotra A, Cheng W, Sonnenblick EH, et al. Myocardial infarction alters myofilament calcium sensitivity and mechanical behavior of myocytes. *The American Journal of Physiology*. 1997;272(1):H360-70. DOI: 10.1152/ajpheart.1997.272.1.H360
138. Walker LA, Walker JS, Ambler SK, Buttrick PM. Stage-specific changes in myofilament protein phosphorylation following myocardial infarction in mice. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2010;48(6):1180-6. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2009.09.010
139. De Villiers C, Riley PR. Mouse models of myocardial infarction: comparing permanent ligation and ischaemia-reperfusion. *Disease Models & Mechanisms*. 2020;13(11):dmm046565. DOI: 10.1242/dmm.046565
140. Penpargkul S, Fein F, Sonnenblick EH, Scheuer J. Depressed cardiac sarcoplasmic reticular function from diabetic rats. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 1981;13(3):303-9. DOI: 10.1016/0022-2828(81)90318-7
141. Ganguly PK, Pierce GN, Dhalla KS, Dhalla NS. Defective sarcoplasmic reticular calcium transport in diabetic cardiomyopathy. *The American Journal of Physiology*. 1983;244(6):E528-35.
142. Oakes ND, Thalén P, Aasum E, Edgley A, Larsen T, Furler SM, et al. Cardiac metabolism in mice: tracer method developments and in vivo application revealing profound metabolic inflexibility in diabetes. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 2006;290(5):E870-81. DOI: 10.1152/ajpendo.00233.2005
143. Abdurrachim D, Nabben M, Hoerr V, Kuhlmann MT, Bovenkamp P, Ciapaite J, et al. Diabetic db/db mice do not develop heart failure upon pressure overload: a longitudinal in vivo PET, MRI, and MRS study on cardiac metabolic, structural, and functional adaptations. *Cardiovascular Research*. 2017;113(10):1148-60. DOI: 10.1093/cvr/cvx100
144. Jiang C, Carillion A, Na N, De Jong A, Feldman S, Lacorte JM, et al. Modification of the β -adrenoceptor stimulation pathway in Zucker obese and obese diabetic rat myocardium. *Critical Care Medicine*. 2015;43(7):e241-9. DOI: 10.1097/CCM.0000000000000999
145. Canale MP, Manca di Villahermosa S, Martino G, Rovella V, Noce A, De Lorenzo A, et al. Obesity-related metabolic syndrome: mechanisms of sympathetic overactivity. *International Journal of Endocrinology*. 2013;2013:865965. DOI: 10.1155/2013/865965
146. Altan VM, Arioglu E, Guner S, Ozcelikay AT. The influence of diabetes on cardiac beta-adrenoceptor subtypes. *Heart Failure Reviews*. 2007;12(1):58-65. DOI: 10.1007/s10741-007-9005-6
147. Tamada A, Hattori Y, Houzen H, Yamada Y, Sakuma I, Kitabatake A, et al. Effects of β -adrenoceptor stimulation on contractility, $[Ca^{2+}]_i$, and Ca^{2+} current in diabetic rat cardiomyocytes. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 1998;274(6):H1849-H57. DOI: 10.1152/ajpheart.1998.274.6.H1849

148. Gando S, Hattori Y, Akaishi Y, Nishihira J, Kanno M. Impaired contractile response to beta adrenoceptor stimulation in diabetic rat hearts: alterations in beta adrenoceptors-G protein-adenylate cyclase system and phospholamban phosphorylation. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 1997;282(1):475-84.
149. Atkins FL, Dowell RT, Love S. β -adrenergic receptors, adenylyate cyclase activity, and cardiac dysfunction in the diabetic rat. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 1985;7(1):66-70. DOI: 10.1097/00005344-198501000-00011
150. Sellers DJ, Chess-Williams R. The effect of streptozotocin-induced diabetes on cardiac beta-adrenoceptor subtypes in the rat. *Journal of Autonomic Pharmacology*. 2001;21(1):15-21. DOI: 10.1046/j.1365-2680.2001.00200.x
151. Austin CE, Chess-Williams R. Transient elevation of cardiac β -adrenoceptor responsiveness and receptor number in the streptozotocin-diabetic rat. *Journal of Autonomic Pharmacology*. 1992;12(4):205-14. DOI: 10.1111/j.1474-8673.1992.tb00334.x
152. Chung CS, Granzier HL. Contribution of titin and extracellular matrix to passive pressure and measurement of sarcomere length in the mouse left ventricle. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2011;50(4):731-9. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2011.01.005
153. Hutchinson KR, Lord CK, West TA, Stewart JA, Jr. Cardiac fibroblast-dependent extracellular matrix accumulation is associated with diastolic stiffness in type 2 diabetes. *PLoS One*. 2013;8(8):e72080. DOI: 10.1371/journal.pone.0072080
154. Belke DD, Larsen TS, Gibbs EM, Severson DL. Altered metabolism causes cardiac dysfunction in perfused hearts from diabetic (db/db) mice. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*. 2000;279(5):E1104–E113. DOI: 10.1152/ajpendo.2000.279.5.E1104
155. Buchanan J, Mazumder PK, Hu P, Chakrabarti G, Roberts MW, Yun UJ, et al. Reduced cardiac efficiency and altered substrate metabolism precedes the onset of hyperglycemia and contractile dysfunction in two mouse models of insulin resistance and obesity. *Endocrinology*. 2005;146(12):5341-9. DOI: 10.1210/en.2005-0938
156. Borradaile NM, Schaffer JE. Lipotoxicity in the heart. *Current Hypertension Reports*. 2005;7(6):412–7. DOI: 10.1007/s11906-005-0035-y
157. Aasum E, Hafstad AD, Severson DL, Larsen TS. Age-dependent changes in metabolism, contractile function, and ischemic sensitivity in hearts from db/db mice. *Diabetes*. 2003;52(2):434–41. DOI: 10.2337/diabetes.52.2.434
158. Greenman AC, Diffie GM, Power AS, Wilkins GT, Gold OMS, Erickson JR, et al. Increased myofilament calcium sensitivity is associated with decreased cardiac troponin I phosphorylation in the diabetic rat heart. *Experimental Physiology*. 2021;106(11):2235-47. DOI: 10.1113/EP089730

159. Zhang R, Zhao J, Potter JD. Phosphorylation of both serine residues in cardiac troponin I is required to decrease the Ca²⁺ affinity of cardiac troponin C. *The Journal of Biological Chemistry*. 1995;270(51):30773-80. DOI: 10.1074/jbc.270.51.30773
160. van den Brom CE, Huisman MC, Vlasblom R, Boontje NM, Duijst S, Lubberink M, et al. Altered myocardial substrate metabolism is associated with myocardial dysfunction in early diabetic cardiomyopathy in rats: studies using positron emission tomography. *Cardiovascular Diabetology*. 2009;8:39. DOI: 10.1186/1475-2840-8-39
161. Akella AB, Ding XL, Cheng R, Gulati J. Diminished Ca²⁺ sensitivity of skinned cardiac muscle contractility coincident with troponin T-band shifts in the diabetic rat. *Circulation Research*. 1995;76(4):600-6. DOI: 10.1161/01.res.76.4.600
162. Jweied EE, McKinney RD, Walker LA, Brodsky I, Geha AS, Massad MG, et al. Depressed cardiac myofilament function in human diabetes mellitus. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2005;289(6):H2478-83. DOI: 10.1152/ajpheart.00638.2005
163. Hamdani N, Hervent AS, Vandekerckhove L, Matheeußen V, Demolder M, Baerts L, et al. Left ventricular diastolic dysfunction and myocardial stiffness in diabetic mice is attenuated by inhibition of dipeptidyl peptidase 4. *Cardiovascular Research*. 2014;104(3):423-31. DOI: 10.1093/cvr/cvu223
164. Falcão-Pires I, Hamdani N, Borbély A, Gavina C, Schalkwijk CG, van der Velden J, et al. Diabetes mellitus worsens diastolic left ventricular dysfunction in aortic stenosis through altered myocardial structure and cardiomyocyte stiffness. *Circulation*. 2011;124(10):1151-9. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.111.025270
165. Hopf AE, Andresen C, Kötter S, Isić M, Ulrich K, Sahin S, et al. Diabetes-induced cardiomyocyte passive stiffening is caused by impaired insulin-dependent titin modification and can be modulated by neuregulin-1. *Circulation Research*. 2018;123(3):342-55. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.117.312166
166. Krüger M, Linke WA. Titin-based mechanical signalling in normal and failing myocardium. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2009;46(4):490-8. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2009.01.004
167. van Heerebeek L, Hamdani N, Handoko ML, Falcao-Pires I, Musters RJ, Kupreishvili K, et al. Diastolic stiffness of the failing diabetic heart: importance of fibrosis, advanced glycation end products, and myocyte resting tension. *Circulation*. 2008;117(1):43-51. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.107.728550
168. Schannwell CM, Schneppenheim M, Perings S, Plehn G, Strauer BE. Left ventricular diastolic dysfunction as an early manifestation of diabetic cardiomyopathy. *Cardiology*. 2002;98(1-2):33-9. DOI: 10.1159/000064682
169. Duerr GD, Wu S, Schneider ML, Marggraf V, Weisheit CK, Velten M, et al. CpG postconditioning after reperfused myocardial infarction is associated with modulated inflammation, less apoptosis, and better left ventricular function. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2020;319(5):H995-H1007. DOI: 10.1152/ajpheart.00269.2020

170. Alter C, Ding Z, Flögel U, Scheller J, Schrader J. A2bR-dependent signaling alters immune cell composition and enhances IL-6 formation in the ischemic heart. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2019;317(1):H190-H200. DOI: 10.1152/ajpheart.00029.2019
171. del Monte F, Lebeche D, Guerrero JL, Tsuji T, Doye AA, Gwathmey JK, et al. Abrogation of ventricular arrhythmias in a model of ischemia and reperfusion by targeting myocardial calcium cycling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004;101(15):5622-7. DOI: 10.1073/pnas.0305778101
172. Lindsey ML, Brunt KR, Kirk JA, Kleinbongard P, Calvert JW, de Castro Bras LE, et al. Guidelines for in vivo mouse models of myocardial infarction. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2021;321(6):H1056-H73. DOI: 10.1152/ajpheart.00459.2021
173. Anand SS, Islam S, Rosengren A, Franzosi MG, Steyn K, Yusufali AH, et al. Risk factors for myocardial infarction in women and men: insights from the INTERHEART study. *European Heart Journal*. 2008;29(7):932-40. DOI: 10.1093/eurheartj/ehn018
174. McManus DD, Nguyen HL, Saczynski JS, Tisminetzky M, Bourell P, Goldberg RJ. Multiple cardiovascular comorbidities and acute myocardial infarction: temporal trends (1990-2007) and impact on death rates at 30 days and 1 year. *Clinical Epidemiology*. 2012;4:115-23. DOI: 10.2147/CLEP.S30883
175. Sacks DB, McDonald JM. The pathogenesis of type II diabetes mellitus. A polygenic disease. *American Journal of Clinical Pathology*. 1996;105(2):149-56. DOI: 10.1093/ajcp/105.2.149
176. Freemantle N, Holmes J, Hockey A, Kumar S. How strong is the association between abdominal obesity and the incidence of type 2 diabetes? *International Journal of Clinical Practice*. 2008;62(9):1391-6. DOI: 10.1111/j.1742-1241.2008.01805.x
177. Kahn SE. The relative contributions of insulin resistance and beta-cell dysfunction to the pathophysiology of Type 2 diabetes. *Diabetologia*. 2003;46(1):3-19. DOI: 10.1007/s00125-002-1009-0
178. Monnier L, Mas E, Ginet C, Michel F, Villon L, Cristol J-P, et al. Activation of oxidative stress by acute glucose fluctuations compared with sustained chronic hyperglycemia in patients with type 2 diabetes. *JAMA*. 2006;295(14):1681-7. DOI: 10.1001/jama.295.14.1681
179. Jacobs MJ, Kleisli T, Pio JR, Malik S, L'Italien GJ, Chen RS, et al. Prevalence and control of dyslipidemia among persons with diabetes in the United States. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 2005;70(3):263-9. DOI: 10.1016/j.diabres.2005.03.032
180. Nishina PM, Naggert JK, Verstuyft J, Paigen B. Atherosclerosis in genetically obese mice: The mutants obese, diabetes, fat, tubby, and lethal yellow. *Metabolism*. 1994;43(5):554-8. DOI: 10.1016/0026-0495(94)90195-3

181. Clark TA, Pierce GN. Cardiovascular complications of non-insulin-dependent diabetes: the JCR:LA-cp rat. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*. 2000;43(1):1-10. DOI: 10.1016/s1056-8719(00)00081-2
182. Fowler MJ. Microvascular and macrovascular complications of diabetes. *Clinical Diabetes*. 2008;26(2):77-82. DOI: 10.2337/diaclin.26.2.77
183. Chua Jr SC, Liu SM, Li Q, Sun A, DeNino WF, Heymsfield SB, et al. Transgenic complementation of leptin receptor deficiency. II. Increased leptin receptor transgene dose effects on obesity/diabetes and fertility/lactation in *lepr-db/db* mice. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 2004;286(3):E384-92. DOI: 10.1152/ajpendo.00349.2003
184. Jin L, Lipinski A, Conklin DJ. A simple method for normalization of aortic contractility. *Journal of Vascular Research*. 2018;55(3):177-86. DOI: 10.1159/000490245
185. Brunckhorst CB, Shemer I, Mika Y, Ben-Haim SA, Burkhoff D. Cardiac contractility modulation by non-excitatory currents: studies in isolated cardiac muscle. *European Journal of Heart Failure*. 2006;8(1):7-15. DOI: 10.1016/j.ejheart.2005.05.011
186. van Meeteren ME, van Bergeijk JD, van Dijk AP, Tak CJ, Meijssen MA, Zijlstra FJ. Intestinal permeability and contractility in murine colitis. *Mediators of Inflammation*. 1998;7(3):163-8. DOI: 10.1080/09629359891090
187. Uhl S, Freichel M, Mathar I. Contractility measurements on isolated papillary muscles for the investigation of cardiac inotropy in mice. *Journal of Visualized Experiments*. 2015(103). DOI: 10.3791/53076
188. Jagatheesan G, Rajan S, Ahmed RP, Petrashevskaya N, Boivin G, Arteaga GM, et al. Striated muscle tropomyosin isoforms differentially regulate cardiac performance and myofilament calcium sensitivity. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*. 2010;31(3):227-39. DOI: 10.1007/s10974-010-9228-3
189. Wang Y, Fuchs F. Interfilament spacing, Ca²⁺ sensitivity, and Ca²⁺ binding in skinned bovine cardiac muscle. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*. 2001;22(3):251-7. DOI: 10.1023/a:1012298921684
190. Krüger M, Linke WA. Protein kinase-A phosphorylates titin in human heart muscle and reduces myofibrillar passive tension. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*. 2006;27(5-7):435-44. DOI: 10.1007/s10974-006-9090-5
191. Gao WD, Backx PH, Azan-Backx M, Marban E. Myofilament Ca²⁺ sensitivity in intact versus skinned rat ventricular muscle. *Circulation Research*. 1994;74(3):408-15. DOI: 10.1161/01.res.74.3.408
192. Stephenson DG, Williams DA. Calcium-activated force responses in fast- and slow-twitch skinned muscle fibres of the rat at different temperatures. *The Journal of Physiology*. 1981;317(1):281-302. DOI: 10.1113/jphysiol.1981.sp013825

193. Güth K, Wojciechowski R. Perfusion cuvette for the simultaneous measurement of mechanical, optical and energetic parameters of skinned muscle fibres. *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology*. 1986;407(5):552-7. DOI: 10.1007/bf00657515

Danksagung

Zuerst möchte ich mich herzlich bei meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Joachim Schmitt, für die Überlassung des Themas sowie für die engagierte Betreuung und fachliche Unterstützung während der Anfertigung dieser Promotionsarbeit bedanken. Sein wertvolles Feedback, seine hilfreichen Anmerkungen sowie das entgegengebrachte Vertrauen haben wesentlich zum Gelingen dieser Promotion beigetragen.

Ein herzlicher Dank gilt auch meiner Co-Betreuerin, Frau Prof. Dr. Martina Krüger, für die fachliche Anleitung im Bereich der Fasermessungen sowie für die Begutachtung dieser Dissertation.

Yeşim Özçelik danke ich für die Vermittlung der methodischen Abläufe der Organbadmessungen.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für die finanzielle Unterstützung während der Erstellung dieser Arbeit im Rahmen des Sonderforschungsbereichs 1116.

Meiner Freundin Anna danke ich herzlich für das Korrekturlesen dieser Arbeit sowie für ihre Unterstützung bei jeglichen Fragen in der Endphase der Dissertation.

Ein besonderer Dank gilt meiner Familie und Freunden für ihre beständige Unterstützung und ihren Zuspruch während der gesamten Promotionszeit.