# Glukosetransporter als Mediator funktioneller Effekte am menschlichen Myokard- Untersuchung am isolierten atrialen Gewebe von Diabetikern und Stoffwechselgesunden


eingereicht von

**Huber Marie-Sophie**

Mat.Nr.: 0433422


zur Erlangung des akademischen Grades

**Doktorin der gesamten Heilkunde**

**(Dr. med. univ.)**

an der

**Medizinischen Universität Graz**

ausgeführt an der

**Klinischen Abteilung für Kardiologie**

unter der Anleitung von

**Priv.-Doz. Dr. Dirk von Lewinski**

**Univ.-Prof. Dr. Burkert M. Pieske**

Ort, Datum …….. (Unterschrift)

*Eidesstattliche Erklärung*

*Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.*

*Graz, am ……* *Unterschrift*

# Vorwort

„ Grundlagenforschung ist ein wenig so, als ob man einen Pfeil in die Luft schießt und an der Stelle, wo er landet, eine Zielscheibe aufmalt.“

Homer Burton Adkins (1892 - 1949)

Das Medizinstudium ermöglicht mir einen weiten Einblick in den menschlichen Organismus. In den ersten Semestern studierte ich Aufbau und Funktion des Körpers. Später standen Erkrankungsbilder, Diagnostik und Behandlungsmöglichkeiten im Vordergrund der Ausbildung.

Besonders fesselte mich Funktion, Störungen und klinische Erscheinungsbilder des Herz-Kreislaufsystems. Auch in Anbetracht der Tatsache, dass kardiovaskuläre Erkrankungen die höchste Morbidität in den Industriestaaten aufweisen, erschien mir eine Diplomarbeit zu diesem Themenkomplex lohnend.

Durch Zufall stieß ich auf ein Thema, dass sich mit Inotropie am isolierten menschlichen Myokard befasst und im speziellen den Inotropiemechanismus zwischen Stoffwechselgesunden und Diabetikern vergleichen soll. Besonders herausfordernd war für mich, dass ich Aspekte des Zusammenwirkens von zwei Volkskrankheiten nämlich Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems und Diabetes mellitus jetzt auch experimentell im Labor studieren konnte.

Priv.-Doz. Dr. Dirk von Lewinski überließ mir im September 2008 dieses Thema und ich konnte bald darauf im Labor der klinischen Grundlagenforschung der Kardiologie starten. Nach kurzer Einführungsphase konnte ich schließlich eigenständig meine Experimente durchführen, welche ich erfolgreich im April 2009 abgeschlossen habe. Die Resultate möchte ich, neben einigen grundlegenden Einführungen in die Thematik, darlegen.

Zusammengefasst liefern die Experimente grundlagenwissenschaftliche Daten zur insulininduzierten Inotropie. Das ferne Ziel ist, diese in vitro Erkenntnisse klinisch nutzbar zu machen im Sinne von “from bench to bedside“.

# Danksagung

Ganz herzlich möchte ich mich bei meinem Diplomarbeitsbetreuer Priv.-Doz. Dr. Dirk von Lewinski bedanken. Von Anfang an begeisterte er mich durch sein Wissen im Bereich der Kardiologie und seine Art Studenten zu motivieren und diese auch in das Forschungsteam zu integrieren. Bei Fragestellungen und Problemen stand er jederzeit zur Verfügung. Zusätzlich ließ er Platz, eigene Ideen einzubringen und diese- wenn auch nicht immer erfolgreich- umzusetzen.

Ich möchte mich auch ganz herzlich bei Dr. Peter Rainer bedanken, der mir geduldig den Umgang mit den Messgeräten und den Ablauf des Messvorganges beigebracht hat. Jederzeit konnte ich mit ihm über einzelne Ergebnisse diskutieren. Weiters hat er mich bei der Auswertung einzelner Experimente unterstützt.

Ein weiterer Dank gilt Dr. Mounir Khafaga, den ich aufgrund seiner langjährigen Laborerfahrung jederzeit bei Komplikationen kontaktieren konnte. Er war immer bereit, diese gemeinsam mit mir zu beseitigen.

Auch möchte ich mich bei Dissertant Bernhard Doleschal, der neben Dr. Peter Rainer viel Zeit gemeinsam mit mir im Labor verbrachte und der mit mir einige „Exkursionen“ ins Wiener AKH unternommen hat, bedanken.

Natürlich gilt mein besonderer Dank auch Prof. Dr. Burkert Pieske, dem Abteilungsleiter der Kardiologie in Graz. Er ist jene Person, die experimentelle kardiologische Grundlagenforschung in Graz ermöglicht.

Last but not least bedanke ich bei meiner Familie für die finanzielle und mentale Unterstützung und bei meinen Freunden, die immer ein offenes Ohr für mich haben.

# Zusammenfassung

Einleitung und Ziel der Arbeit:

Insulin wirkt am menschlichen Myokard positiv inotrop. Diese funktionellen Effekte sind teilweise $Ca^{2+}$-abhängig und teilweise substratabhängig. In dieser Arbeit untersuchten wir die inotropen Effekte von Insulin und die zugrunde liegende Signaltransduktion am humanen Vorhofgewebe von Patienten mit Diabetes mellitus und Stoffwechselgesunden. Ziel der Arbeit war, die Bedeutung des Glukosetransportes als Mediator des insulinabhängigen positiven Effektes in beiden Patientengruppen zu examinieren und zu vergleichen.

Material und Methoden:

Die funktionellen Experimente wurden an isolierten humanen Vorhoftrabekel des rechten Herzohres von 71 Patienten, die sich einer Bypass und/oder einer Klappenersatzoperation unterziehen mussten, durchgeführt. Dafür wurden die einzelnen Muskelstreifen in Tyrodelösung mit verschiedenen energetischen Substraten (Glukose, Pyruvat oder Palmitoyl-L-Carnitin) elektrisch stimuliert (1Hz) und die Kontraktionskraft registriert. Der Einfluss von Insulin (20nM) auf die Kontraktionskraft wurde mit oder ohne Blockade der GLUT4-Translokation, des SGLT-1 (Sodium-dependent glucose cotransporter) und der PI3-Kinase determiniert. Weiters wurde der Einfluss von Metformin auf den inotropen Effekt von Insulin gemessen.

Ergebnisse:

Insulin vermittelte sowohl bei Diabetikern als auch bei Stoffwechselgesunden in Glukosetyrode einen signifikanten Anstieg der isometrischen Kontraktionskraft (jeweils vs Ausgangswert $p<0.05$). Dieser Effekt wurde durch Blockade der Glukosetransporter und der PI3-Kinase in beiden Gruppen reduziert (alle vs Kontrollgruppe $p<0.05$). Eine geringere Kraftzunahme konnte in Tyrode mit Pyruvat oder PALC als energetischem Substrat beobachtet werden. Hier kam es zu keiner weiteren Kraftminderung durch Blockade der GLUT4-Translokation oder des SGLT-1. Durch Blockade der PI3-Kinase in Pyruvattyrode konnte der PIE in beiden Gruppen verhindert werden. Präinkubation mit Metformin führte zu keiner Zunahme der insulininduzierten Inotropie.

Schlussfolgerung:

Glukosetransporter vermitteln am menschlichen Vorhofmyokard funktionelle Effekte von Insulin. Die Rolle des Glukosetransporters SGLT-1 wurde in diesem Zusammenhang erstmals beschrieben. Die glukoseabhängigen Effekte konnten durch Substratersatz mit Pyruvat oder PALC verdeutlicht werden. Zwischen Diabetikern und Stoffwechselgesunden war kein signifikanter Unterschied am multizellulären Streifenpräparat erkennbar.

**Schlüsselwörter:** Insulin, funktionelle Effekte, GLUT4, SGLT-1, PI3-Kinase, Diabetes mellitus, menschliches Vorhofgewebe.

# Abstract

Introduction and Objectives:

Insulin causes in human myocardium positive inotropic effects. These effects are partially $Ca^{2+}$-dependent and partially substrate dependent. Aim of this thesis was to examine insulin induces inotropy and signal transduction in human atrial myocardium of diabetical patients and patients without diabetes. We further tried to evaluate the involvement of glucose-transporters in insulin effects and find possible differences between patients with or without diabetes.

Materials and Methods:

Experiments were performed in isolated atrial trabeculae of right atrial appendages of 71 patients undergoing coronary artery bypass grafting or cardiac valve replacement surgery. Muscle strips where dissected with the help of a stereomicroscope (resulting diameter below 0,8mm), connected to a force transducer and superfused with Tyrode`s solution containing either glucose, pyruvate or palmitoyl-l-carnitine as energetic substrate. Isometric twitch force upon electric field stimulation (1Hz) was measured. The influence of insulin (20nm) on isometric twitch force was examined with or without blocking GLUT4-translocation, SGLT-1 or PI3-kinase.Moreover the influence of metformin on inotropic effects of insulin was assesed.

Results:

Developed force increased significantly on insulin administration when glucose containing perfusate was used in patients with or without diabetes (respectively both $p<0.05$). Through blocking GLUT4-translocation, SGLT-1 or PI3-kinase reduced these inotropic effects of insulin (respectively both groups $p<0.05$ vs controls).Insulin induced less inotropy in perfusate containing pyruvate or palmitoyl-l-carntine as energetic substrates. Glucosetransporter inhibition did not alter insulin effects in pyruvate containing Tyrode`s solution. Only inhibition of PI3-Kinase in pyruvate containing Tyrode`s solution increased developed twitch force. Preincubation with metformin did not affect insulin induced inotropy.

Conclusions:

Glucose-transporters mediate functional effects of Insulin in human atrial myocardium. The action of the glucose-transporter SGLT-1 in atrial myocardium was described for the first time. Exchange of energetic substrates shows that they are important for insulin induces inotropy. Differences according to the presence or absence of diabetes could not be detected.



**Key words:** Insulin, functional effects, GLUT4, SGLT-1, PI3-kinase, diabetes mellitus, human atrial myocardium.

# Inhaltsverzeichnis


**1 EINLEITUNG ..... 1**

1.1 MYOKARDIALE KONTRAKTION UND RELAXATION ..... 1
*1.1.1 Elektromechanische Koppelung ..... 1*
1.2 INOTROPIEMECHANISMEN ..... 2
*1.2.1 Dehnung ..... 2*
*1.2.2 Frequenzinotropie (erstmals von Bowditch 1871 am Froschherz beschrieben) ..... 3*
*1.2.3 Endogene Peptide ..... 3*
1.3 MYOKARDIALER SUBSTRATMETABOLISMUS ..... 4
*1.3.1 Kohlenhydratstoffwechsel ..... 4*
*1.3.2 Fettsäurenmetabolismus ..... 6*
*1.3.3 Interregulation von Fettsäure- und Kohlenhydratmetabolismus ..... 7*
*1.3.4 Regulatoren des myokardialen Metabolismus ..... 7*
1.4 INOTROPIE AM ISOLIERTEN MYOKARD ..... 8
*1.4.1 IGF-1 ..... 8*
*1.4.2 Insulin ..... 8*
1.5 DIABETES MELLITUS ..... 9
*1.5.1 Definition und Epidemiologie ..... 9*
*1.5.2 Herzerkrankung und Diabetes Mellitus ..... 9*
*1.5.3 Veränderungen des myokardialen Stoffwechsel bei Diabetikern ..... 10*
1.6 EINFLUSS ORALER ANTIDIABETIKA AUF DEN MYOKARDIALEN STOFFWECHSEL ..... 12
1.7 ZIELE UND FRAGESTELLUNGEN ..... 14

**2 MATERIAL UND METHODEN ..... 15**

2.1 UNTERSUCHTES HERZGEWEBE ..... 15
2.2 TRANSPORT UND PRÄPARATION ..... 16
*2.2.1 Kardioplegie ..... 16*
*2.2.2 Transport ..... 17*
*2.2.3 Präparation der Muskelstreifen ..... 17*
2.3 ANLAGE ZUR MESSUNG DER ISOMETRISCHEN KONTRAKTIONEN ..... 18
*2.3.1 Beschreibung des Messstandes ..... 18*
*2.3.2 Versuchsablauf ..... 21*
2.4 LÖSUNGEN UND SUBSTANZEN ..... 22
*2.4.1 Tyrodelösung ..... 22*
*2.4.2 Pharmakologische Substanzen ..... 23*
2.5 VERSUCHSPROTOKOLLE ..... 24
*2.5.1 Messsprotokoll 1: Glukosetransporter in Glukose - oder Pyruvattyrode ..... 24*
*2.5.2 Messprotokoll 2: PALC ..... 25*
*2.5.3 Messprotokoll 3: Metformin ..... 25*
*2.5.4 Besondere Probleme des Dehnungsprotokolls am Vorhofmyokard ..... 26*
2.6 AUSWERTUNG ..... 27
*2.6.1 Computergestützte Datenerhebung ..... 27*
*2.6.2 Manuelle Auswertung der Originalregistrierung ..... 27*
*2.6.3 Statistische Auswertung ..... 28*

**3 ERGEBNISSE ..... 29**

3.1 POSITIVER INOTROPER EFFEKT (PIE) VON INSULIN AM VORHOFMYOKARD IN GLUKOSETYRODE BEI DIABETIKERN UND NICHTDIABETIKER ..... 29
3.2 POSITIVER INOTROPER EFFEKT (PIE) VON INSULIN AM VORHOFMYOKARD IN PYRUVATTYRODE BEI DIABETIKERN UND NICHT DIABETIKERN ..... 30
3.3 PIE VON INSULIN BEI GLEICHZEITIGER INHIBITION DER GLUT4 TRANSLOKATION BEI DIABETIKERN UND NICHT DIABETIKERN IN GLUKOSETYRODE BZW. PYRUVATTYRODE ..... 31
3.4 PIE VON INSULIN BEI INHIBITION DES SGLT-1 1BEI DIABETIKERN UND NICHT DIABETIKERN IN GLUKOSETYRODE BZW. PYRUVATTYRODE ..... 33
3.5 PIE VON INSULIN BEI INHIBITION DER PI3-KINASE BEI DIABETIKERN UND NICHT DIABETIKERN IN GLUKOSETYRODE ..... 35
3.6 POSITIVER INOTROPER EFFEKT (PIE) VON INSULIN AM VORHOFMYOKARD IN TYRODE MIT PALMITOYL-L-CARNITIN UND VERMINDERTER GLUKOSEKONZENTRATION ..... 38

3.7 PIE von Insulin bei Präinkubation mit Metformin ..... 39
**4 DISKUSSION ..... 40**
4.1 Hämodynamische Effekte von Insulin ..... 40
4.2 Unterschied zwischen Glukose und Pyruvat als energetischem Substrat ..... 41
4.3 Kein Unterschied des direkten Effektes des Gukosetransporters GLUT4 am isolierten Vorhofmyocard bei Diabetikern und Nicht Diabetikern ..... 42
4.4 Kein Unterschied des direkten Effektes des SGLT-1 am isolierten Vorhofmyokard bei Diabetikern und Nicht Diabetikern ..... 43
4.5 Kein Unterschied der PI3-Kinase Aktivität am isolierten Vorhofmyokard bei Diabetikern und Nicht Diabetikern ..... 44
4.6 Keine erkennbaren Unterschiede des Glukosemetabolismus am isolierten Vorhofmyokard bei Diabetikern im Vergleich zu Nicht Diabetikern ..... 44
4.7 Einfluss von PALC am isolierten, humanen Vorhofmyokard ..... 45
4.8 Keine Steigerung der insulininduzierten Inotropie durch Präinkubation mit Metformin am isolierten, humanen Vorhofmyokard ..... 46
4.9 Therapeutische Konsequenzen ..... 47
4.10 Zusammenfassung ..... 49
**5 LITERATURVERZEICHNIS ..... 50**
**6 TABELLENANHANG ..... 55**

# Glossar und Abkürzungen

| | |
|---|---|
| AGE | Advanced glycation endproduct |
| AKE | Aortenklappenersatz |
| AMPK | Adenosinmonophosphat- aktivierte Proteinkinase |
| AR | Adrenorezeptor |
| ATPase | Adenosintriphosphatasen |
| BDM | 2,3- Butanedione-Monoxim |
| CABG | Coronary artery bypass graft |
| CIRKO | Cardiomyocyte insulin receptor knock out |
| CPA | Cyclopiazonic acid |
| CPT | Carnitin-Palmityltransferase |
| EF | Ejektionsfraktion |
| FATP | Fatty acid transport protein |
| GIK | Glukose-Insulin-Kalium |
| GLUT | Glukosetransporter |
| IGF | Insulin-like growth factor |
| LCFA | Long chain fatty acids |
| $L_{max}$ | Lenght |
| LVEF | Left ventricular ejection fraction |
| MHC | Myosin heavy chain |
| MKE | Mitralklappenersatz |
| NIDDM | Non-insulin-dependent diabetes mellitus |
| PALC | Palmitoyl-L-Carnitin |
| PDH | Pyruvatdehydrogenase |
| PFK | Phosphofruktokinase |
| PI-3 | Phosphatidylinositol-3 |
| PPAR | Peroxisom Proliferator Aktivierter Rezeptor |
| SERCA | Sarcoplasmatic endoplasmic reticulum calciumtransporting ATPase |
| SGLT | Sodium-dependent glucose cotransporter |
| SR | Sarkoplasmatisches Retikulum |
| STZ | Streptozotocin |
| WT | Wildtype |

# Abbbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1.1 ..... 4
ABBILDUNG 1.2 ..... 5
ABBILDUNG 1.3 ..... 6
ABBILDUNG 1.4 ..... 7
ABBILDUNG 1.5 ..... 11
ABBILDUNG 2.1 ..... 15
ABBILDUNG 2.2 ..... 18
ABBILDUNG 2.3 ..... 19
ABBILDUNG 2.4 ..... 20
ABBILDUNG 2.5 ..... 22
ABBILDUNG 2.6 ..... 26
ABBILDUNG 3.1 ..... 29
ABBILDUNG 3.2 ..... 30
ABBILDUNG 3.3 ..... 30
ABBILDUNG 3.4 ..... 31
ABBILDUNG 3.5 ..... 31
ABBILDUNG 3.6 ..... 32
ABBILDUNG 3.7 ..... 32
ABBILDUNG 3.8 ..... 33
ABBILDUNG 3.9 ..... 34
ABBILDUNG 3.10 ..... 34
ABBILDUNG 3.11 ..... 35
ABBILDUNG 3.12 ..... 35
ABBILDUNG 3.13 ..... 36
ABBILDUNG 3.14 ..... 37
ABBILDUNG 3.15 ..... 37
ABBILDUNG 3.16 ..... 38
ABBILDUNG 3.17 ..... 38
ABBILDUNG 3.18 ..... 39
ABBILDUNG 4.1 ..... 46

# Tabellenverzeichnis

TABELLE 2.1 ..... 16
TABELLE 2.2 ..... 18
TABELLE 2.3 ..... 22
TABELLE 2.4 ..... 22
TABELLE 2.5 ..... 22

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Myokardiale Kontraktion und Relaxation

### 1.1.1 Elektromechanische Koppelung

Während der zweiten Phase des Aktionspotentials (Plateauphase) strömt $Ca^{2+}$ entlang eines elektromechanischen Gradienten aus dem Extrazellulärraum (T-Tubuli) über L-Typ-$Ca^{2+}$-Kanäle (Dihydropyridinrezeptoren) ins Zellinnere. Diese Erhöhung des freien $Ca^{2+}$ bezogen auf die Zeit ($\Delta$[free $Ca^{2+}$]/$\Delta$t) induziert die Freisetzung von $Ca^{2+}$ aus dem Sarkoplasmatischem Retikulum über den Ryanodinrezeptor 2 (1). Das nun von $10^{-7}$ auf $10^{-5}$ mol/L erhöhte freie $Ca^{2+}$ im Zytosol bindet an Troponin C. Es kommt zur Konformationsänderung des Troponinkomplexes und in Folge zur Freilegung der Bindungsstelle für Myosin auf den Aktinfilamenten. Damit kann der ATP-abhängige Querbrückenzyklus beginnen.

Der Herzmuskel relaxiert, wenn die zytosolische $Ca^{2+}$- Konzentration absinkt. Dafür sind mehrere Mechanismen verantwortlich.

Erstens kommt es zur raschen Wiederaufnahme von $Ca^{2+}$ ins SR über einen ATP-abhängigen Prozess, der durch eine $Ca^{2+}$-ATPase (SERCA2a= Sarcoplasmatic Endoplasmic Reticulum Calciumtransporting ATPase) vermittelt wird. Diese wird von Phospholamban und im Vorhof zusätzlich vom homologen Strukturprotein Sarcolipin reguliert (2). Dabei wird Phospholamban durch cAMP-abhängige Proteinkinasen phosphoryliert und die Aktivität von SERCA2a enthemmt.

Zweitens wird die $Ca^{2+}$ - Konzentration über einen $3Na^{+}/Ca^{2+}$ - Austauschcarrier der Zellmembran reguliert. Dieser wird indirekt von der membranständigen $Na^{+}$-$K^{+}$-ATPase und damit dem $Na^{+}$- Gradienten getrieben.

Drittens wird $Ca^{2+}$ durch eine weitere primär-aktiv-transportierende $Ca^{2+}$-ATPase über die Zellmembran nach außen transportiert.

## 1.2 Inotropiemechanismen

Die unten angeführten Mechanismen führen physiologisch zu einer Zunahme der Kontraktilität des Herzens (positive Inotropie).

### 1.2.1 Dehnung

#### 1.2.1.1 Frank-Starling Mechanismus (erstmals 1895 von Otto Frank am Froschherz beschrieben)

In einem bestimmten Bereich führt eine Zunahme der Vordehnung des Herzmuskels zu einer Steigerung der entwickelten Muskelspannung. Da sich der Zeitpunkt der maximalen Spannungsentwicklung nicht verändert, nimmt die Geschwindigkeit der Spannungsentwicklung zu (dP/dt). Dies bedeutet, dass bei akut erhöhter Volumenbelastung der Ventrikel (preload↑), das Herz automatisch reagiert, indem es das Schlagvolumen erhöht. Die Erhöhung beruht u.a. auf der durch die Dehnung per se erhöhte $Ca^{2+}$- Empfindlichkeit der kontraktilen Proteine (3). Die Folge ist eine stärkere Kontraktilität. Bei erhöhter Druckbelastung des linken Ventrikels (afterload↑) nimmt zuerst das Schlagvolumen ab. Da der rechte Ventrikel vorerst nicht betroffen ist, wird weiterhin das gleiche Schlagvolumen in den linken Ventrikel gepumpt. Die Vorlast steigt damit und der linke Ventrikel kann nun gegen den erhöhten Widerstand dasselbe Schlagvolumen auswerfen.

#### 1.2.1.2 Sympathikus

Während körperlicher Anstrengung kommt es unter Abnahme des Parasympathikus und vermehrter Freisetzung von Noradrenalin an den sympathischen postganglionären Nervenenden zum erhöhten kardialen Output durch Erhöhung der Herzfrequenz und vermehrter Kontraktilität. Diese Effekte beruhen auf der durch Bindung an die Adrenorezeptoren gesteigerten Signaltransduktion.

Der AR gehört zu den 7-transmembran-Domänen Rezeptoren und ist G-Protein gekoppelt (G-Protein-Coupled-Receptor). Im Herzen dominiert dabei der $\beta_1$-Sutbyp (75-80%). Durch die Bindung kommt es zur Dissoziation des G-Proteins in

Gα und Gγ. Diese Untereinheiten aktivieren die Adenylatzyklase, welche die Biosynthese von cycloAMP katalysiert.
Durch erhöhtes cycloAMP kommt es zur Aktivierung der Proteinkinase A, welche zur Phosphorylierung von $Ca^{2+}$ - Kanälen und $Ca^{2+}$ -ATPasen führt und somit zum $Ca^{2+}$ -Einstrom über die L-Typ-$Ca^{2+}$-Kanäle.

### 1.2.2 Frequenzinotropie (erstmals von Bowditch 1871 am Froschherz beschrieben)

Am Albino- Kaninchen konnte gezeigt werden, dass die Kinetik der L-Typ-$Ca^{2+}$-Kanäle bei unterschiedlicher Herzfrequenz und unterschiedlichem diastolischem Membranpotential verändert ist. Je höher die Frequenz umso langsamer kommt es zum Abfall des $Ca^{2+}$ - Stroms und somit zu einem erhöhtem $Ca^{2+}$ - Transienten in der Zelle (5). Am gesunden menschlichen Herzen konnte ebenso gezeigt werden, dass eine Erhöhung positiv inotrop wirkt (6). Am Vorhof ist die Frequenzinotropie deutlich höher.
Weiters wird postuliert, dass neben dem Calciumstrom auch die SERCA eine Schlüsselrolle bei der Frequenzinotropie einnimmt (7).

### 1.2.3 Endogene Peptide

Dem Endothelin I, ein von Yanagisawa et al. 1988 entdecktem Peptid, wird sowohl eine positive als auch eine negative Inotropie am Herzen beigemessen, wobei sich hier Vorhof und Ventrikel unterscheiden. Meyer M. beschrieb, dass Endothelin im menschlichen Vorhof über den ET(a)-Rezeptor die PKC aktiviert, die in Folge den $Na^{+}/H^{+}$- Austauscher aktiviert (8). Weiters kommt es zur erhöhten myofibrillären $Ca^{2+}$- Empfindlichkeit (9). Am Mausherzen wurde der negative inotrope Effekt über die Aktivierung des ET(b)-Rezeptors, über die Aktivierung des $Na^{+}/Ca^{2+}$-Austauschers und über die Abnahme des $Ca^{2+}$-Transienten beschrieben (10). Die Effekte von Endothelin I sind jedoch stark speziesabhängig (11).
1990 wurde erstmals beschrieben, dass auch Angiotensin II, ein Schlüsselhormon des Blutdruck- und Wasserhaushaltes, am Vorhofmyokard positiv inotrop wirkt (12). Diese Wirkung wird über den AT-1 Rezeptor vermittelt (13).

## 1.3 Myokardialer Substratmetabolismus

Die Regulation des myokardialen Substratmetabolismus wurde in den letzten Jahrzehnten von einigen Arbeitsgruppen intensiv erforscht. In Anwesenheit von Kohlenhydraten und freien Fettsäuren (free fatty acids) stammen 60 – 90% der ATP- Gewinnung durch $O_2$- Substratoxidation in den Mitochondrien aus der ß-Oxidation der freien Fettsäuren. Dabei steigt der Substratumsatz linear mit vermehrter Arbeit (14 - 20).

### 1.3.1 Kohlenhydratstoffwechsel

Die Aufnahme von Glukose in die Kardiomyozyten wird primär über Glukosetransporter (GLUT) reguliert (21). Am Herzen werden im Wesentlichen zwei Glukosetransporterproteine exprimiert: GLUT1 und GLUT4. GLUT4 ist der dominierende Transporter (22). Er liegt intrazellulär in zwei Pools vor, dem endozytischen Pool und dem endosomalen Pool. An isolierten Rattenkardiomyozyten wurde demonstriert, dass Insulin den Transport der Glukosetransporter-beinhaltenden Vesikel vom Intrazellularraum an die Zelloberfläche stimuliert (23). Dieser insulinabhängige Weg wird partiell durch die Phosphatidylinositol-3 Kinase (PI3-Kinase) mediiert. Zusätzlich wird GLUT4 kontraktionsabhängig über die Aktivität von AMPK an die Zelloberfläche gebracht (24). Neben AMPK soll auch die diacylglycerolsensitive Proteinkinase D bei der insulinunabhängigen Translokation involviert sein (25). Abbildung 1.1 zeigt schematisch die GLUT4–Translokation an die Zelloberfläche.

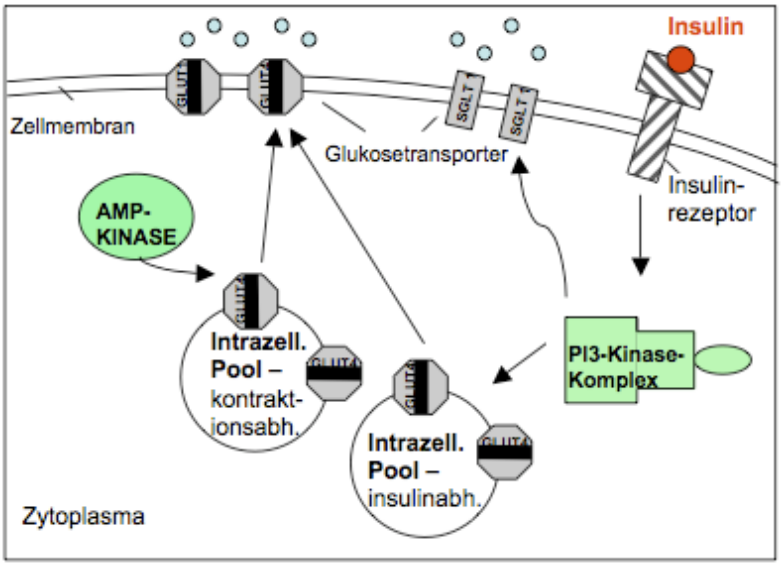


Abbildung 1.1 Schematische Darstellung der GLUT4-Translokation. Der insulinabhängige Anteil wird über den PI3-Kinase Komplex mediiert.

Zhou et al. haben 2003 erstmals die SGLT-1 und SGLT-2 Expression (sodium-glucose-co-transporter) an 23 menschlichen Organen mit der PCR-Methode quantifiziert. Die Expression von SGLT-1 am menschlichen Herzen war unerwartet hoch (3.4E+5 molecules/microg total RNA), zehnmal höher als in der Niere. Weiters ergab die in situ Hybridisation, dass menschliche Myozyten SGLT-1 mRNA exprimieren. Dieser hohe Wert suggeriert, dass SGLT-1 eine funktionelle Rolle beim Glukosetransport am Myokard einnimmt (26). Abbildung 1.2 zeigt vergleichend die Höhe der SGLT-1 Expression von Niere und Herz.

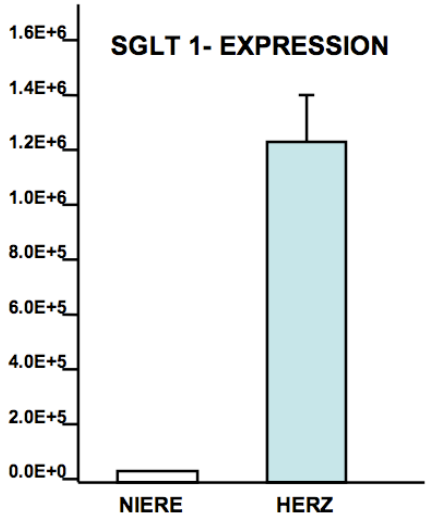


Abbildung 1.2 Vergleich SGLT-1 Expression Niere vs Herz. Im Herzen ist die Expression zehnmal so hoch wie in der Niere (modifiziert nach Zhou et al.).

Die für die Glykolyse verwendete Glukose stammt primär aus dem Plasma, da die Glykogenvorräte des Herzens relativ gering sind (27). Die aufgenommene Glukose tritt in den Embden-Meyerhof-Weg ein, welcher Glukose in mehreren Reaktionen zu 2 Molekülen Pyruvat konvertiert. Das Schlüsselenzym, die Phosphofruktokinase-1 (PFK1), dessen Produktion die Phosphorylierung von Fruktose-6-Phosphat zu Fruktose 1,6-Bisphosphat katalysiert, wird durch Fruktose 2,6- Bisphosphat reguliert, welche wiederum von der Phosphofruktokinase 2 (PFK2) katalysiert wird. Das aus der Glykolyse generierte Pyruvat wird primär über die Pyruvatdehydrogenase (PDH), einem Multienzymkomplex, in die Mitochondrien transportiert und dort zu Acetyl-CoA carboxyliert. PDH wird durch die PDH- Kinase phosphoryliert und dabei inaktiviert (am Herzen dominiert dabei PDK 4). Acetyl-CoA tritt in den Zitratzyklus ein und wird zu $H_2O$ und $CO_2$ zur ATP-Gewinnung oxidiert. Andererseits kann Pyruvat zu Laktat reduziert oder zu Oxalacetat oder Malat carboxyliert werden. Abbildung 1.3 zeigt schematisch die Glukosemetabolisierung in der Zelle.

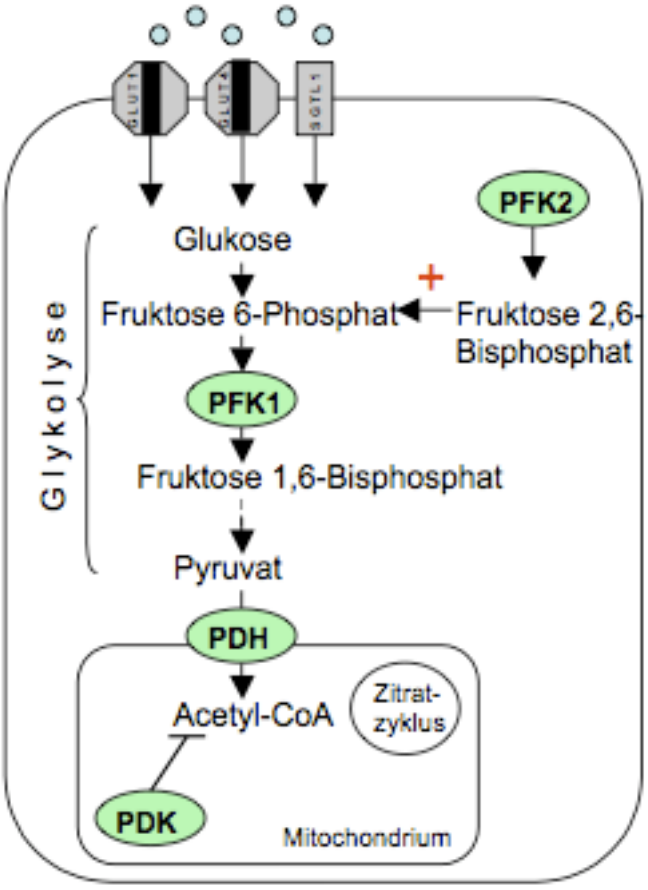


Abbildung 1.3 Schematische Darstellung der Glukosemetabolisierung in der Zelle.

### 1.3.2 Fettsäurenmetabolismus

Die Aufnahme der langkettigen Fettsäuren (LCFAs) erfolgt über die Transportproteine FATP I und CD 36/FAT, welche mit der Veresterung der freien Fettsäuren zu Acyl-CoA über die Acyl-CoA Synthethase (FACS) gekoppelt sind (28).

Die daraus resultierten Acyl-CoAs werden durch die Muskel-Carnitin-Palmityltransferase I (M-CPT I) in deren Carnitinderivate konvertiert (29), welche in die Zwischenmembran der Mitochondrien geschleust werden.

CPT-I wird durch Malonyl–CoA stark gehemmt (30). Malonyl-CoA wird aus Acetyl-CoA durch die Acetyl-CoA-Carboxylase (ACC) carboxyliert (31). Danach transportiert die Carnitinacyltransferase die Derivate im Austausch mit freiem Carnitin in die innere Mitochondrienmembran. Zuletzt generiert CPT-II Acetyl-Co A für die β-Oxidation (32). Abbildung 1.4 zeigt schematisch die Fettsäurenmetabolisierung in der Zelle.

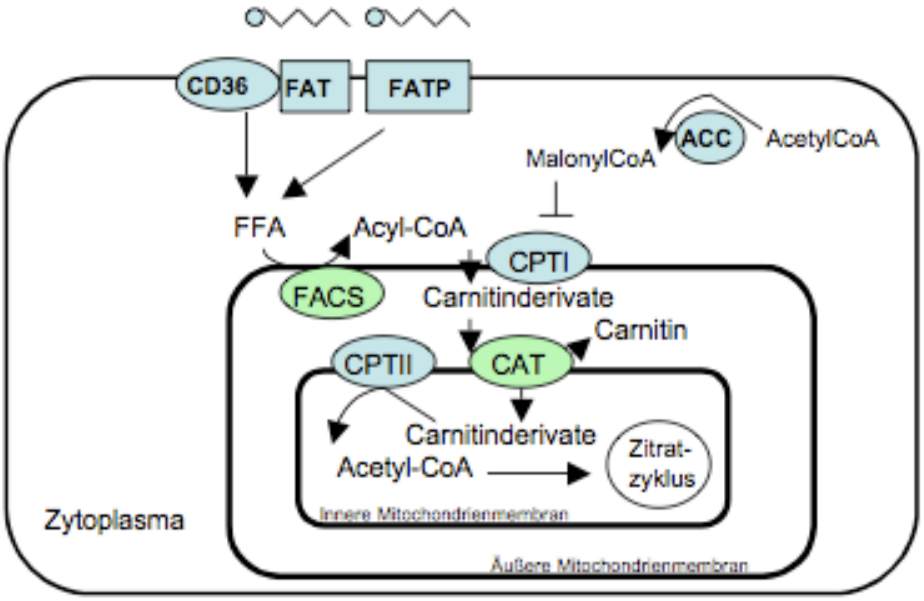


Abbildung 1.4 Schematische Darstellung der Fettsäurenmetabolisierung in der Zelle.

### 1.3.3 Interregulation von Fettsäure- und Kohlenhydratmetabolismus

Ist die Rate des Fettsäurenmetabolismus hoch, wird die PDH durch eine Zunahme von Acetyl-CoA/freiem Acetyl-CoA und NAD+/NADH in den Mitochondrien phosphoryliert und damit inhibiert. Im Gegenzug führt die Hemmung des Fettsäurenmetabolismus zur erhöhten Glukose- und Laktataufnahme und Oxidation durch verminderte Zitratlevels und verminderte Acetyl-CoA und NADH-Levels in der mitochondrialen Matrix (33).

### 1.3.4 Regulatoren des myokardialen Metabolismus

Die Transkriptionsfaktoren Peroxisomen Proliferator-Aktivierende Rezeptoren (PPARs) sind entscheidend für die Regulation des Metabolismus in den Mitochondrien. Es wurden drei Isoformen identifiziert: PPRA$\alpha$, PPRA$\beta$ und PPAR$\gamma$, welche alle durch Fettsäuren aktiviert werden. Die durch PPARs kontrollierte Genexpression wird durch den PPAR Coaktivator–1 (PGC-1) gefördert (34). Der aktivierte PPRA$\alpha$ induziert die Genexpression von Proteinen, die an der Fettsäurenoxidation beteiligt sind (35). Es kommt zu Inhibierung des Pyruvatdehydrogenasekomplexes durch Phosphorylierung mittels PDK 4 und durch erhöhte Acetyl-CoA-Levels in den Mitochondrien und somit zur Hemmung der Oxidation von Pyruvat, dem Endprodukt der Glykolyse (36).

## 1.4 Inotropie am isolierten Myokard

### 1.4.1 IGF-1

IGF 1 (Insulin-like growth factor), ein dem Insulin in Struktur und Funktion ähnliches Peptidhormon, welches primär aus der Leber nach Stimulation durch das Wachstumshormons (GH) sezerniert wird, wird auch lokal von Kardiomyozyten exprimiert (37). Von Lewinski et al. (38) zeigten am isolierten menschlichen Myokard, dass IGF–1 positiv inotrop wirkt (innerhalb von 3- 4 Minuten). Die positiv inotrope Wirkung wurde durch den IGF-1-Rezeptor vermittelt. Nach Hemmung des IGF-1-Rezeptors konnte der inotrope Effekt fast vollständig aufgehoben werden. Dieser $Ca^{2+}$-abhängige Effekt beruhte auf vermehrte L-Typ-$Ca^{2+}$- Ströme einerseits und auf vermehrtem umgekehrtem $Na^{+}/Ca^{2+}$- Austausch andererseits.

### 1.4.2 Insulin

Insulin, ein Peptidhormon aus 51 Aminosäuren, wird in den $\beta$-Zellen der Langerhans`schen Inseln des Pankreas produziert und primär in Abhängigkeit von der Glukosekonzentration im extrazellulären Raum durch Exozytose der $\beta$-Granula sezerniert. Die Insulinwirkung am Herzen erfolgt über den Insulinrezeptor, einem tetrameren Transmembranprotein der Struktur $\alpha_2\beta_2$.

Am isolierten Myokard von Patienten mit Herzinsuffizienz im Endstadium wurde ein konzentrationsabhängiger positiv-inotroper Effekt von Insulin nachgewiesen. Als energetisches Substrat wurde Glukose bzw. Pyruvat verwendet. Durch die Hemmung der Glykolyse mit Zugabe durch 0-5 $\mu$mol/L Iodacetat wurde der inotrope Effekt um ≈ 50% reduziert und entsprach ungefähr dem Ausmaß des inotropen Effektes mit Pyruvat als energetischem Substrat. Weiters wurde der positive inotrope Effekt durch Präinkubation mit dem selektiven PI3-Kinase Blocker Wortmannin fast vollständig gehemmt. Dieses Ergebnis suggeriert, dass die PI3-Kinase Signaltransduktion von Insulin eine Schlüsselrolle einnimmt. Somit ist nur ein Teil des Effektes abhängig von vermehrter Glykolyse. An weiteren Experimenten wurde exploriert, ob der Effekt $Ca^{2+}$-abhängig ist. Durch das licht-

emittierende Indikatorprotein Äquorin konnte an einigen Experimenten gezeigt werden, dass der PIE von Insulin teilweise $Ca^{2+}$-abhängig war. Durch Hemmung der Funktion des sarkoplasmatischen Retikulum mit Cyclopiazon-Säure (CPA) und Ryanodin wurde dieser $Ca^{2+}$-abhängige Effekt fast vollständig gehemmt. Dabei könnte der intrazelluläre $Ca^{2+}$- Gehalt durch den $Na^{+}/Ca^{2+}$- Austauscher, der normal $Ca^{2+}$ gegen $Na^{+}$ aus der Zelle schleust, aber auch einen umgekehrten Modus besitzt, beeinflusst werden, denn durch Blocken des reversen $Na^{+}/Ca^{2+}$ - Austausch-Modus mit KB-R 7943 wurde der Effekt um ca. 60% reduziert (39).

## 1.5 Diabetes mellitus

### 1.5.1 Definition und Epidemiologie

Diabetes mellitus ist eine chronische Stoffwechselerkrankung, die auf einem absoluten oder relativen Mangel an Insulin beruht und in deren Folge, oft erst nach längerer Krankheitsdauer, Schäden an Blutgefäßen, Nervensystem und dem Herzen auftreten können. Die Hauptformen des D.m. sind der TypI D.m, der durch eine immunologische bedingte β-Zelldestruktion zum absoluten Insulinmangel führt und der TypII D.m. dessen Bandbreite sich von einer vorwiegenden Insulinresistenz mit relativem Insulinmangel bis zu einem vorwiegend sekretorischem Defekt mit Insulinresistenz erstreckt.
Die Prävalenz für alle Altersgruppen lag im Jahr 2000 weltweit bei 2,8 % und soll bis zum Jahr 2030 auf 4,4 % ansteigen, das wären 366 Millionen Menschen. Vor allem in den Entwicklungsländern und in der Altersgruppe › 65 Jahre steigt die Prävalenz enorm (40).

### 1.5.2 Herzerkrankung und Diabetes mellitus

Die Prävalenz für Herzerkrankungen bei Diabetikern liegt bei fast 20%, im Vergleich zur Kontrollbevölkerung, wo sie bei 4-6 % liegt (41).
Die koronare Herzerkrankung ist der Hauptgrund für die erhöhte Mortalität bei Diabetikern, welche häufig zusätzliche Risikofaktoren, wie Hypertonie aufweisen (42). Dabei ist das Risiko für Männer zweifach und für Frauen dreifach erhöht (43).

Bereits im subklinischen Stadium konnte bei Diabetikern eine erhöhte koronare Artherosklerose nachgewiesen werden (44).
Jedoch kann bei Diabetikern auch in Abwesenheit einer Gefäßerkrankung eine kardiale Dysfunktion auftreten, bekannt als diabetische Kardiomyopathie. Nach Ausschluss von asymptomatischer Ischämie und Hypertrophie wies eine signifikante Anzahl von Diabetikern eine systolische und diastolische Dysfunktion auf (45). Weiters stellt Diabetes mellitus einen Risikofaktor für die idiopathische Kardiomyopathie in der Allgemeinbevölkerung der USA dar (46).
Am Mausmodell wurde demonstriert, dass db/db Mäuse (diabetisches Mausmodell) aufgrund einer reduzierten Herzfrequenz und eines geringeren Schlagvolumens einen um 35% verminderten kardialen Output haben. Die Ejektionsfraktion blieb jedoch unverändert (47).

### 1.5.3 Veränderungen des myokardialen Stoffwechsel bei Diabetikern

Bei Diabetikern kommt es zu Veränderungen des Stoffwechsels. Die verantwortlichen maladaptiven metabolischen Prozesse am Myokard beruhen wahrscheinlich auf:

1) Der Hyperglykämie bei Diabetikern. Diese resultiert aus inadäquatem Glukoseverbrauch und erhöhter Glukoseproduktion in der Leber.

2) Der vermehrten Lipolyse in den Fettzellen und der vermehrten Lipoproteinsynthese in der Leber – somit kommt es zum Anstieg der freien Fettsäuren und der Triglyceride im Blut.

3) Dem reziproken Zusammenhang von Glukose und Fettsäurenmetabolismus. 1997 beschrieb Randle (48), dass wahrscheinlich der erhöhte Fettsäurenumsatz den Glukoseverbrauch bei TypI und TypII Diabetikern verringert, wobei die Hemmung der Glukoseoxidation stärker als die Hemmung der Glykolyse und diese stärker als die Hemmung der Glukoseaufnahme ist. Abbildung 1.5 zeigt schematisch die Veränderung des relativen Umsatzes von Glukose und Fettsäuren bei Diabetikern.

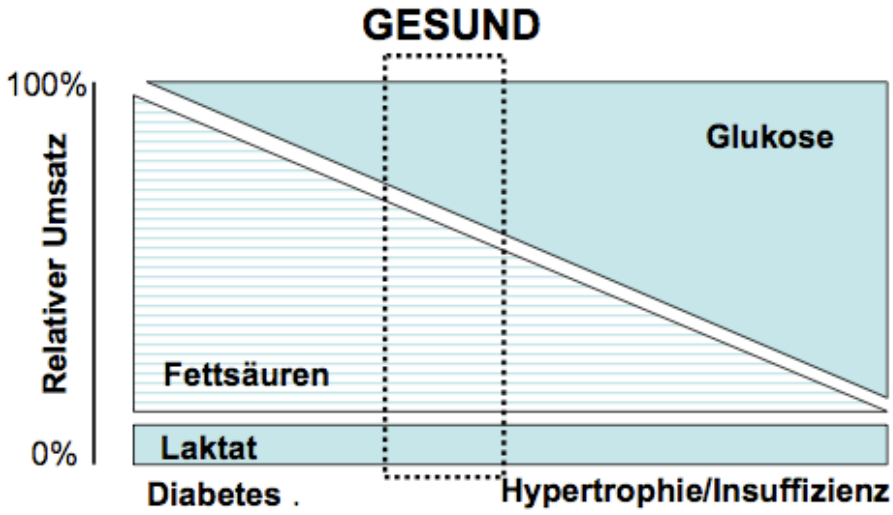


Abbildung 1.5 Veränderung des Glukose- und Fettsäurenumsatzes bei Diabetikern (modifiziert nach Glatz et al.).

4) Der Ansammlung von Glukose, Glykogen, Glukose-6-Phosphat, Fruktose-6-Phosphat, Glykogen, Pyruvat und Laktat (49). Die Akkumulation von Glykolysemetaboliten führt wahrscheinlich zu AGEs (Advanced glycosylation end products) (50).

5) Dem erhöhten Fettsäuretransport über die Plasmamembran. Dies wurde im Tiermodell am Streptozotocin (STZ) - induzierten Diabetes demonstriert und beruht auf erhöhter FAT/CD 36 Levels an der Plasmamembran und auf deren erhöhten mRNA-Expression (51). Es wird vermutet, dass das Transporterprotein CD-36 dabei eine Schlüsselrolle spielt. Durch vermehrte membranständige CD-36- Levels resultieren vermehrte TAG-Speicher, die den insulininduzierten Glukosetransport hemmen (52).

6) Der Aktivierung des Peroxisomen Proliferator-Aktivierenden Rezeptors $\alpha$ (PPAR-$\alpha$). An MHC-PPAR knockout Mäusen konnte gezeigt werden, dass PPRA-$\alpha$, ein kritischer Regulator des myokardialen Fettsäuremetabolismus reziprok zur Glukoseaufnahme aktiviert wird und diese Veränderungen speziell im diabetischen Herz maladaptativ wirken (53).

7) Der Aktivierung der glukosesensitiven Transkriptionsfaktoren, welche zu Transkriptionsveränderungen führen. Dabei kommt es zu Veränderungen

der Expression der Myosin-Schwerkette (MHC) mit einer Zunahme des MHCβ-Subtyps und einer Abnahme von MHCα (54-56).

8) Möglicherweise einer Abnahme der totalen GLUT4- Konzentration im Herzen. Am Mausmodell wurde demonstriert, dass die totale GLUT4-Konzentration bei db/db Mäusen im Herzen um 56% reduziert war (47). Im Gegenzug konnten jedoch von Lewinski et al. zeigen, dass es keinerlei signifikante Unterschiede in der mRNA- Expression von sowohl GLUT4, GLUT1 und SGLT-1 bei Diabetikern gibt.

9) Einer Veränderung der $Ca^{2+}$-Homöostase. Die Enzyme, die die Glykolyse katalysieren, liegen nahe dem SR und dem Sarkolemm (57). Weiters dient das durch Glykolyse generierte ATP bevorzugt dem Ionentransport (58). Durch vermehrten Fettsäureabbau könnte ein vermindertes freies intrazelluläres $Ca^{2+}$ resultieren. An db/db Mäusen konnte gezeigt werden, dass die Expression der SERCA2a und dem $Na^{+}/Ca^{2+}$- Austauscher verringert war (59). Eine weitere Studie an Streptozotocin-induzierten diabetischen Ratten zeigte eine verringerte Expression von SERCA2a und ein verlangsamtes Aktionspotential, verursacht durch einen verlangsamten $Ca^{2+}$-Strom. Es gibt jedoch keine Evidenz, dass dies die veränderte Kontraktilität bei der diabetischen Kardiomyopathie beeinflusst (60).

## 1.6 Einfluss oraler Antidiabetika auf den myokardialen Stoffwechsel

Metformin, ein orales Antidiabetikum der Gruppe der Biguanide, senkt den Blutzuckerspiegel und verbessert die Insulinsensitivität. 1994 wurde die Hypothese geprüft, ob Metformin einen Defekt der zellulären Glukoseaufnahme normalisiert. Die Experimente zeigten am menschlichen isolierten Skelettmuskel, dass nach Präinkubation mit Metformin in einer Konzentration von 0,1mmol/L die insulinstimulierte Glukoseaufnahme bei sieben Patienten mit der geringsten Ansprache auf Insulin in vivo und in vitro, verbessert war (61). Im April 2009 erschien eine klinische Studie, in der Patienten mit D.m. TypII entweder mit Metformin, Pioglitazon, einem weiteren oralen Antidiabetikum, das die

Insulinsensivität verbessert, oder Placebo therapiert wurden. Nach 24 Wochen Therapie wies die Patientengruppe, die mit Pioglitazon therapiert worden war, eine bessere linksventrikuläre Funktion und eine verbesserte Glukoseaufnahme in die Zelle auf. In der Metformin-Gruppe wurde keine verbesserte Glukoseaufnahme nachgewiesen (62).

## 1.7 Ziele und Fragestellungen

1.) Gibt es Unterschiede der insulininduzierten Inotropie zwischen Diabetikern und Nichtdiabetikern?

2.) Inwieweit verändert der Austausch von Glukose mit Pyruvat als energetischem Substrat den insulininduzierten Effekt bei Diabetikern und Nichtdiabetikern?

3.) Wird der insulininduzierte Effekt durch GLUT4-Transporthemmer vermindert und besteht hier ein Unterschied zwischen Diabetikern und Nichtdiabetiker?

4.) Wird der insulininduzierte Mechanismus durch SGLT-1-Transporthemmer vermindert und besteht hier ein Unterschied zwischen Diabetikern und Nichtdiabetikern?

5.) Wird der insulininduzierte Mechanismus durch Hemmung der PI3-Kinase vermindert und besteht hier ein Unterschied zwischen Diabetikern und Nichtdiabetikern?

6.) Inwieweit beeinflussen orale Antidiabetika den myokardialen Stoffwechsel?

7.) Inwiewieit wird der PIE von Insulin mit Fettsäuremetaboliten als energetischem Substrat verändert?

8.) Kann man aufgrund der Resultate Rückschlüsse auf den myokardialen Stoffwechsel bei Diabetes Mellitus ziehen?

9.) Können die Resultate therapeutische Konsequenzen in der Diabetesbehandlung mit sich bringen?

# 2 Material und Methoden

## 2.1 Untersuchtes Herzgewebe

Die im Rahmen dieser Arbeit ausgeführten Experimente wurden an isolierten humanen Vorhoftrabekeln durchgeführt. Das Vorhofgewebe stammte von Patienten, die sich einer Bypass-Operation und/oder einer Herzklappenersatz-Operation unterziehen mussten. Intraoperativ, während des Kanülierungsschrittes, der dem Anschluss des Patienten-Kreislaufes an die Herz-Lungen-Maschine dient, wurde der dreieckige obere Teil des rechten Vorhofes (rechtes Herzohr, Auricula dextra), in dem sich Trabekel (Mm. pectinati) befinden, herausgeschnitten. Die Größe des gewonnenen Herzohres betrug ca. 6-12mm x 6-12mm. Abbildung 2.1 zeigt ein rechtes Herzohr.

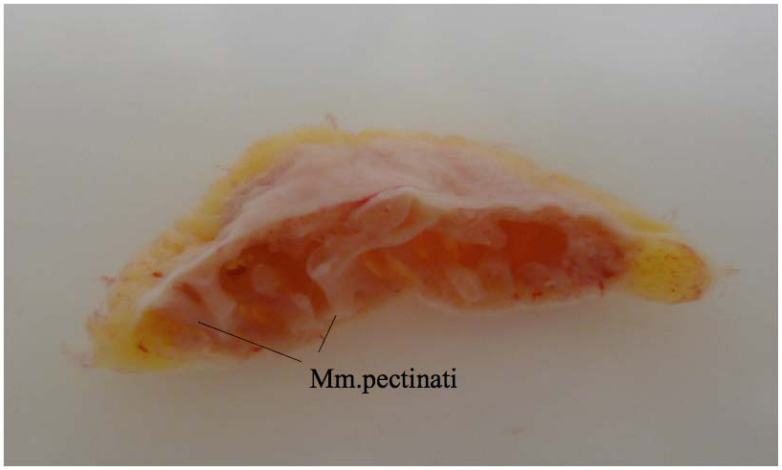


Abbildung 2.1 Herzohr des rechten Vorhofes.

Die Operationen wurden an der klinischen Abteilung für Herzchirurgie-Universitätsklinik Graz und an der Abteilung für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie des Herzzentrums der Universität Göttingen durchgeführt. Alle Patienten gaben ihre Einwilligung zur Entnahme und Verwendung von Myokardproben für wissenschaftliche Zwecke. Die Untersuchungen wurden von der Ethikkommission der Medizinischen Universität Graz und der Georg-August-Universität Göttingen geprüft und genehmigt. Tabelle 2.1 zeigt einen Überblick über die Daten aller Patienten, denen Vorhofgewebe entnommen wurde. Die ausführlichen Angaben zu den Patienten finden sich im Tabellenanhang (siehe Seite 55-57).

| Operativer Eingriff | Anzahl | mittleres Alter ± STAB | W | M | EF in % ±STAB | SR | kein SR |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | | | |
| CABG | 40 | 68,5 ± 8,1 | 7 | 33 | 57,1 ±12,5 | 36 | 4 |
| AKE | 22 | 68,4 ± 10,9 | 9 | 13 | 54,3 ± 14,7 | 21 | 1 |
| MKE | 2 | 62,0± 12,1 | 1 | 1 | 65,0 ± 7,1 | 2 | |
| CABG+KE | 7 | 65,7 ±12,3 | 4 | 3 | 56,4± 12,2 | 7 | |
| | | | | | | | |
| SUMME | 71 | 66,9±10,1 | 21 | 50 | 56,5± 12,9 | 66 | 5 |

Tabelle 2.1 Überblick Patientendaten.CABG...Coronary artery bypass graft; AKE…Aortenklappenersatz;MKE...Mitralklappenersatz; EF...Ejektionsfraktion; SR...Sinusrhythmus.

## 2.2 Transport und Präparation

Verwendete Materialien: Einwegbecher, Schere, Pinzette, Mikro-Schere, Mikro-Pinzette, Einwegpipette, Stereomikroskop.

### 2.2.1 Kardioplegie

Um das Gewebe vor hohen Energieverlusten während des Transportes ins Labor und der Präparation zu schützen, wurde es nach der Entnahme sofort in eine kardioplege Lösung gelegt. Zur Herstellung dieser Lösung wurde Tyrode mit 2,3-Butanedione-Monoxime (BDM) versetzt. Die BDM-Konzentration betrug 30 mM (entsprechend 3,0 g/l).

BDM ist eine Phosphatase, die die Querbrückeninteraktionen zwischen Aktin und Myosin reversibel hemmt (63-64) und die Ansprechbarkeit der kontraktilen Proteine für Kalzium herabsetzt (65). Desweiteren wird durch BDM in höheren Konzentrationen (> 5 mM) der $[Ca^{2+}]_i$-Transient reduziert (65-66). Die Sensitivität von Troponin C für Kalzium wird dagegen nicht vermindert (65). Auch die Aufnahme von $Ca^{2+}$ ins sarkoplasmatische Retikulum (SR) wird durch BDM nicht reduziert (67). Ebenfalls unbeeinflusst bleiben Membranpotential und der Verlauf von Aktionspotentialen (66).

BDM wirkt während Transport, Präparation und Lagerung des Myokards kardioprotektiv. Bei der Präparation von Myokardgewebe kommt es aufgrund des mechanischen Stresses z.T. zu einem hohen $Ca^{2+}$-Einstrom in das Gewebe. BDM verhindert hier die Entstehung einer Kontraktur (68). Außerdem wird durch die Hemmung der Querbrückeninteraktion der ATP-Verbrauch durch Myosin reduziert. Die Inhibition der Querbrückeninteraktion durch BDM ist konzentrationsabhängig.

Die myokardiale Kraftentwicklung wird bei einer BDM-Konzentration von 30 mM vollständig blockiert (64). Somit kann eine kardioplege BDM-Lösung die Funktion der Muskelstreifenpräparate insbesondere bei zusätzlicher Kühlung schützen (69). Die mit BDM versetzte Tyrodelösung wurde zur Oxygenierung und pH-Wert-Einstellung auf pH 7,4 mit Carbogen (Oxymix) (95% $O_2$, 5% $CO_2$) begast.

### 2.2.2 Transport

Der Transport des Vorhofgewebes ins Labor erfolgte unmittelbar nach der Entnahme in einem sterilen Einwegbecher. Dieser enthielt mit Carbogen präoxygenierte, BDM-haltige Tyrode. Die Zeitspanne von der Entnahme bis zum Eintreffen im Labor betrug ca. 5 Minuten.

### 2.2.3 Präparation der Muskelstreifen

Die Isolierung der Muskelstreifen aus dem rechten Herzohr erfolgte durch vorsichtige Präparation mit mikrochirurgischen Pinzetten und Scheren in kardiopleger Lösung. Unter Verwendung eines Stereomikroskopes mit zehnfacher Vergrößerung wurde das Gewebe nach möglichst langen und unverzweigten Trabeculae carneae durchsucht. Es wurden insbesondere Trabekel mit einer Querschnittsfläche < 0,8 $mm^2$ gesucht (das bedeutet bei rundem Querschnitt einen Durchmesser unter 1mm). Bei einer Querschnittsfläche von mehr als 0,8 $mm^2$ besteht die Gefahr, dass die Trabekel im Inneren hypoxisch werden (70-71). Die Trabekel wurden mit mikrochirurgischen Scheren frei präpariert und mittels einer Transferpipette aus der Präparationsschale in einen sterilen Einwegbecher mit präoxygenierter BDM-haltiger Tyrodelösung überführt. Bei der Isolation wurde stets darauf geachtet, die Muskelstreifenpräparate nicht zu dehnen oder anderweitig zu traumatisieren. Trotz erschwerter Präparationsbedingungen am unfixierten Präparat, wurde daher auf eine Fixierung des Gewebestückes mit Nadeln am Grund der Präparierschale verzichtet. Danach wurden Muskelstreifen mindestens 10 Minuten in BDM-haltiger Tyrodelösung gekühlt gelagert, damit sie sich von dem mechanischen Stress der Präparation erholen konnten.

## 2.3 Anlage zur Messung der isometrischen Kontraktionen

### 2.3.1 Beschreibung des Messstandes

Abbildung 2.3 zeigt die wichtigsten Komponenten der Anlage zur Messung der kontraktilen Funktion von Trabekeln, Abbildung 2.2 zeigt das Organbad im Detail. Die Anlage ermöglicht die simultane Messung der isometrischen Kontraktion von vier Herzmuskelstreifenpräparaten. Sie wurde in Kooperation mit der Fa. Scientific Instruments, Heidelberg, aufgebaut. Die wichtigsten Bestandteile der Anlage sind in Tabelle 2.2 aufgelistet.

| **Bestandteil** | **Herstellungsfirma** |
|---|---|
| | |
| Peristaltische Rollenpumpe | Fa. Ismatec, Typ ISM853 |
| Mikrometerschraube | Fa. Mituyo, Japan |
| 4-Kanal-Thermoschreiber | Fa. Graphtec, Mark VII WR3320 |
| Basisgerät zur Messung der Kraft | Fa. Graphtec, Mark VII WR3320 |
| Kraftaufnehmer | Fa. SI Heidelberg, Typ OPT1L |
| Stereomikroskop | Fa. SI Heidelberg, Typ KG3 |
| Stimulationseinheit | Fa. Olympus, Taiwan, Typ SD30 |
| Umwälzthermostat | Fa. SI, Heidelberg, Typ STM1 |
| Thermometer | Fa. Conrad Electronic, Typ Voltcraft 302 K/J |

Tabelle 2.2 Aufllistung der Bestandteile des Messstandes.

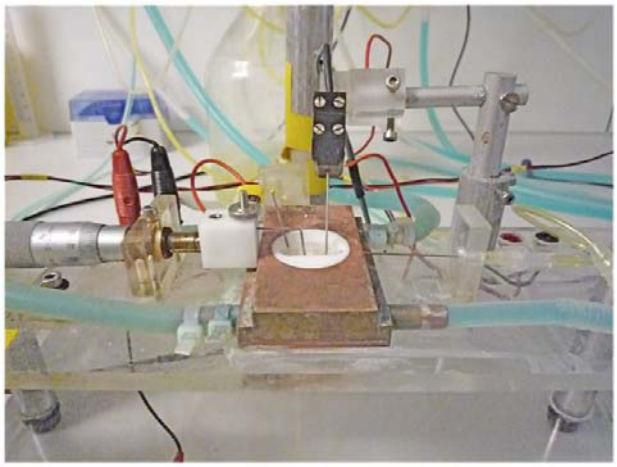

Abbildung 2.2 Organbad des Messstandes.

Abbildung 2.3 Anlage zur Messung der isometrischen Kontraktionen: (1) Rollenpumpen, (2) Stimulationseinheit, (3) Vorratsgefäße, (4) Computerkontrolleinheit, (5) Organbäder, (6) Thermoschreiber, (7) Heizung und Thermostat.

Abbildung 2.4 zeigt schematisch und exemplarisch einen der vier Kreisläufe der Anlage. Das Organbad aus Teflon (Länge x Breite x Tiefe = 21 mm x 8 mm x 3 mm) stellte das zentrale Element der Versuchsanordnung dar. Durch peristaltische Rollenpumpen angetrieben wurde Tyrodelösung über Schläuche von einem Vorratsgefäß zum Organbad geleitet und von hier aus zurück ins Vorratsgefäß gepumpt. Bei einer Förderleistung der Pumpe von 5,7 ml/min wurde das Organbadvolumen (0,5 ml) so etwa alle 5 Sekunden ausgetauscht. Das Vorratsgefäß sowie die Schläuche waren doppelwandig und wurden im äußeren Lumen im Gegenstromprinzip mit Wasser auf 37°C erwärmt. Die Tyrodelösung wurde über eine Fritte im Vorratsgefäß ständig mit Carbogen begast. Zur Reduktion der wärmebedingten Flüssigkeitsverdunstung wurde das Vorratsgefäß abgedeckt. Links neben dem Organbad war eine Mikrometerschraube und rechts ein optomechanischer Kraftaufnehmer installiert. Dieser erlaubte bei einem Wegbedarf von maximal 30 µm annähernd isometrische Versuchsbedingungen.

Kraftaufnehmer und Mikrometerschraube reichten über eine Kanülenverlängerung bis ins Organbad. An beiden Kanülen war je eine 0,1 mm dünne Platinnadel angebracht. Auf diesen feinen Nadeln wurde der Muskelstreifen fixiert.

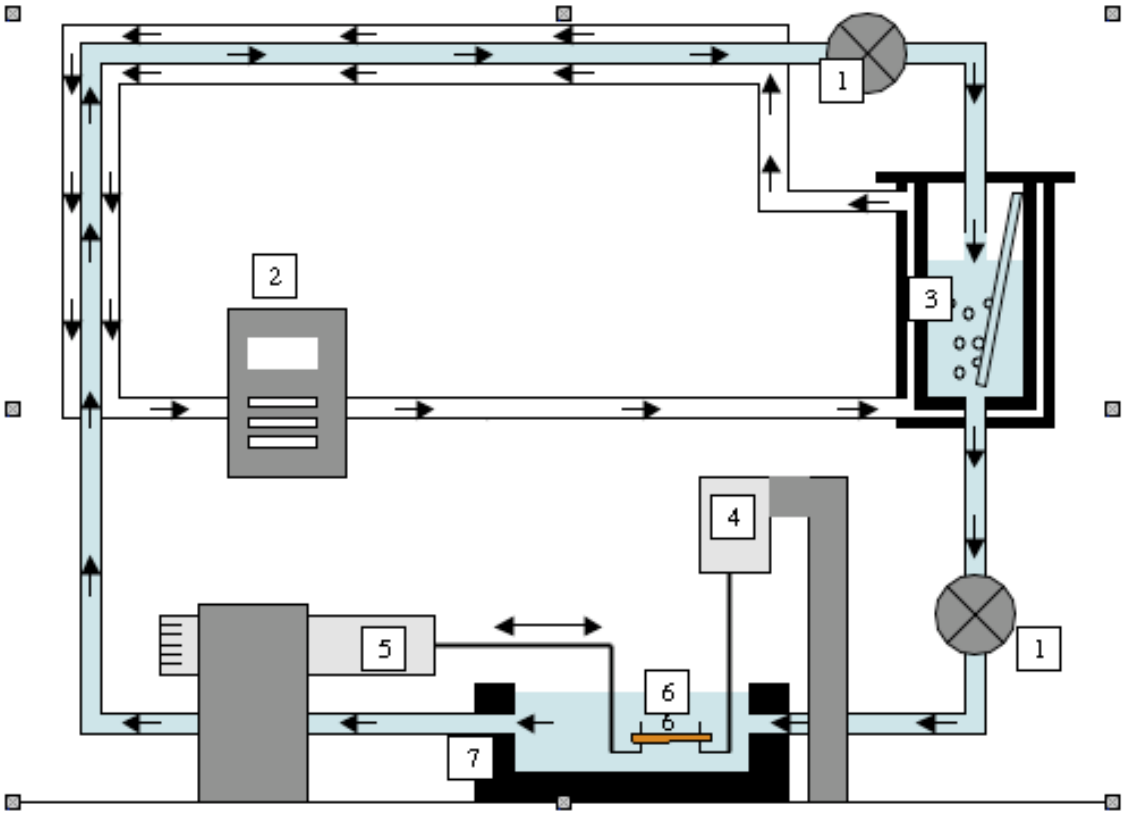


Abbildung 2.4 Schematische Darstellung des Kreislaufs der Anlage zur Messung der isometrischen Kontraktionen: (1) Rollenpumpen, (2) Heizung und Thermostat, (3) Doppelwandiges Vorratsgefäß mit Gasfritte, (4) Mechanischer Kraftaufnehmer, (5) Verstellbare Mikrometerschraube zur Abstandsregulierung der beiden Platinnadeln, (6) Herzmuskelstreifen, (7) Organbad.

Der Kraftaufnehmer war mit der Stimulationseinheit elektrisch verbunden und bildete zusammen mit der linken Aufhängung die Elektroden zur Stimulation der Muskelstreifen. Die vom Kraftaufnehmer ausgehenden Signale wurden sowohl auf einem 4-Kanal-Thermoschreiber als auch auf einem Personal Computer mit einem dafür entwickelten Modul der Software Labview® erfasst.

### 2.3.2 Versuchsablauf

Vor Beginn des Versuches wurde das System des Pumpkreislaufs mehrfach mit Aqua dest. gespült. Zunächst wurden die auf 37°C erwärmten Reservoirgefäße mit jeweils 100 ml Tyrode-Lösung gefüllt. Die Pumpen wurden eingeschaltet, bis alle zu den Organbädern führenden Schläuche entlüftet waren. Die Trabekel wurden mit einer Transferpipette ohne Mitnahme von BDM-haltiger Tyrode-Lösung in die Organbäder überführt. Dort wurden sie unter Sicht durch ein Stereomikroskop mit zehnfacher Vergrößerung mit zwei mikrochirurgischen Pinzetten möglichst spannungsfrei („slack length“) an den Platinnadeln befestigt. Während dieses Vorgangs war die Zirkulation unterbrochen. Anschließend wurden die Pumpen wieder eingeschaltet. Die nach dem Einhängen ins Organbad von den Muskelstreifen ausgehende Spannung wurde als diastolischer Nullpunkt festgelegt.

Die $Ca^{2+}$-Konzentration der Tyrode-Lösung ($[Ca^{2+}]_o$) betrug initial 0,2 mM. Sie wurde schrittweise auf 2,5 mM erhöht. Durch die langsame Erhöhung der $[Ca^{2+}]$ wurde einer Kontraktur des Muskels vorgebeugt. Unterdessen wurde mit der elektrischen Stimulation der Muskelstreifen begonnen. Bei einem Rechtecksignal von 5 ms und einer Frequenz von 1 Hz wurde die elektrische Spannung solange gesteigert, bis der Muskel erstmalig sichtbar kontrahierte (ca. 2-5 V). Dann wurde die Spannung um 20% dieser Schwellenspannung erhöht und für den gesamten Versuchsablauf bei diesem Wert belassen. Nach der Stabilisierung der Kontraktionskraft wurden die Trabekel schrittweise bis zur Länge mit der maximalen Kraftentwicklung ($L_{max}$) vorgedehnt. Mit Erreichen der maximalen Kraftentwicklung ($L_{max}$) begann das Messprotokoll. Abbildung 2.5 zeigt eine Originalregistrierung bis zum Erreichen der maximalen Kraftentwicklung.

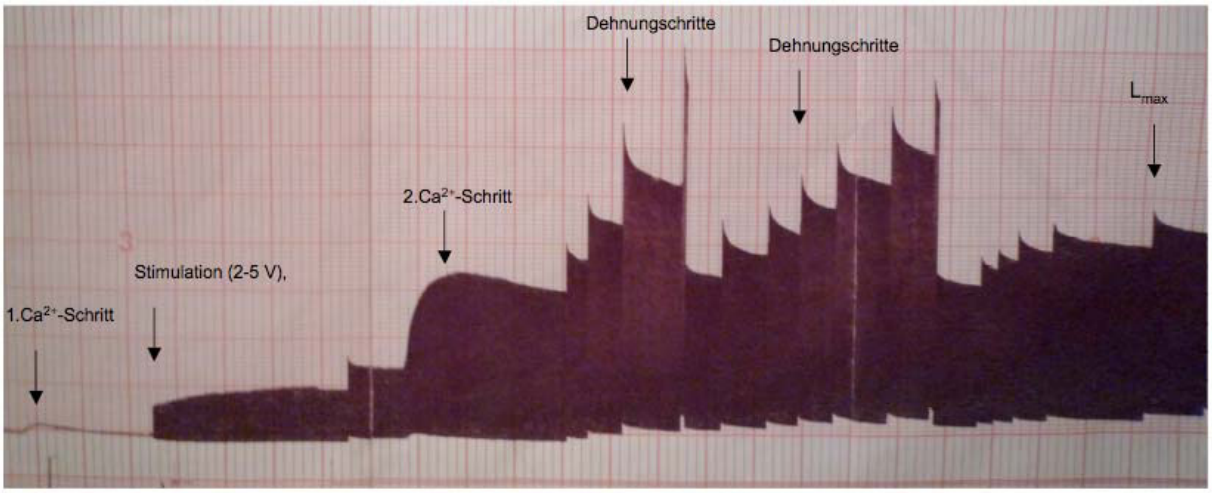


Abbildung 2.5 Originalregistrierung v. 28.03.2009 (1 Trabekel, Kanal 3). Darstellung der Kraftzunahme bis zum Erreichen von $L_{max}$.

## 2.4 Lösungen und Substanzen

### 2.4.1 Tyrodelösung

Der Name der Lösung geht auf den amerikanischen Pharmakologen Maurice Vejux Tyrode zurück. Im Rahmen dieser Arbeit entsprach die Tyrodelösung einer modifizierten Krebs-Henseleit-Lösung. Als energetisches Substrat in der Tyrodelösung wurde entweder Glukose in einer Konzentration von 11,2mM bzw. 2,8mM oder Pyruvat in einer Konzentration von 22,4mM verwendet. Tabellen 2.3 - 2.5 zeigen die Zusammensetzungen der Tyrodelösungen.

| NaCl | KCl | $NaHCO_3$ | $MgSO_4$ | $KH_2PO_4$ | $CaCl_2$ | Glukose |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 127 mM | 2,3 mM | 25 mM | 0,6 mM | 1,3 mM | 0,2 mM | 11,2 mM |

Tabelle 2.3 Glukosetyrode standard.

| NaCl | KCl | $NaHCO_3$ | $MgSO_4$ | $KH_2PO_4$ | $CaCl_2$ | Glukose |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 127 mM | 2,3 mM | 25 mM | 0,6 mM | 1,3 mM | 0,2 mM | 2,8 mM |

Tabelle 2.4 Tyrode mit minimaler Glukosekonzentration.

| NaCl | KCl | $NaHCO_3$ | $MgSO_4$ | $KH_2PO_4$ | $CaCl_2$ | Pyruvat |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 127 mM | 2,3 mM | 25 mM | 0,6 mM | 1,3 mM | 0,2 mM | 22,4 mM |

Tabelle 2.5 Pyruvattyrode.

### 2.4.2 Pharmakologische Substanzen

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit kamen folgende Substanzen zum Einsatz:

Latrunculin B:

Latrunculin B von Negombata magnifica > 80% (MW 395,51 g/mol) wurde von der Fa. Sigma-Aldrich bezogen. Es wurde eine $10^{-3}$ M Stammlösung in DMSO angesetzt, auf 60µl aliquotiert und bei -21°C gelagert. Durch Pipettieren von 50µl der Stammlösung auf 100ml Tyrode- Lösung wurde eine Konzentration von 0,5 x $10^{-7}$ M erreicht.

Phlorizin:

Phlorizin dehydrate (MW 472,5 g/mol) wurde von der Fa. Sigma-Aldrich bezogen. Es wurde eine $10^{-2}$ M Stammlösung in Ethanol angesetzt, auf 110µl aliquotiert und bei -21°C gelagert. Durch Pipettieren von 100µl der Stammlösung auf 100ml Tyrode- Lösung wurde eine Konzentration von $10^{-5}$ M erreicht.

T-1095A (EMD):

T-1095A (MW 458 g/mol) wurde von der Fa. Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland bezogen. Es wurde eine $10^{-2}$ M Stammlösung in DMSO angesetzt, auf 15µl aliquotiert und bei -21°C gelagert. Durch Pipettieren von 10µl der Stammlösung auf 100ml Tyrode- Lösung wurde eine Konzentration von $10^{-6}$ M erreicht.

Wortmannin:

Wortmannin (MW 428,47 g/mol) wurde von der Fa. Sigma-Aldrich bezogen. Es wurde eine $10^{-3}$ M Stammlösung in DMSO angesetzt, auf 30µl aliquotiert und bei -21°C gelagert. Durch Pipettieren von 10µl der Stammlösung auf 100ml Tyrode-Lösung wurde eine Konzentration von $10^{-7}$ M erreicht.

Insulin sodium salt human:

Insulin sodium salt human (MW 458 g/mol) wurde von der Fa. Sigma-Aldrich bezogen. Es wurde eine $10^{-3}$ M Stammlösung in HCl angesetzt, auf 60µl aliquotiert und bei -21°C gelagert. Vor den Experimenten wurden 50µl zu 450µl Tyrode

gegeben um eine Konzentration von $10^{-4}$ zu erhalten. Durch Pipettieren von 20µl der $10^{-4}$ M Lösung auf 100ml Tyrode- Lösung wurde eine Konzentration von $2 \times 10^{-8}$ M erreicht.

Palmitoyl-L-carnitine hydrochloride (PALC):

Palmitoyl-L-carnitine hydrochloride (MW 436,08 g/mol) wurde von der Fa. Sigma-Aldrich bezogen. Es wurde eine $10^{-2}$ M Stammlösung in Aquabidest angesetzt, auf 320µl aliquotiert und bei -21°C gelagert. Durch Pipettieren von 150µl der $10^{-2}$ M Lösung auf 50ml Tyrode- Lösung wurde eine Konzentration von $3 \times 10^{-5}$ M (entspricht 30µM) erreicht.

Meformin hydrochloride(1,1- Dimethylbiguanide Hydrochloride , 97%):

1,1- Dimethylbiguanide Hydrochloride 97% (MW 165,62 g/mol), wurde von der Fa. Sigma-Aldrich bezogen. Es wurde eine $10^{-1}$ M Stammlösung in Aquabidest angesetzt, auf 110µl aliquotiert und bei -21°C gelagert. Durch Pipettieren von 100µl der $10^{-1}$ M Lösung auf 100ml Tyrode- Lösung wurde eine Konzentration von $10^{-4}$ M erreicht.

## 2.5 Versuchsprotokolle

### 2.5.1 Messsprotokoll 1: Glukosetransporter in Glukose - oder Pyruvattyrode

#### 2.5.1.1 Kontrollmuskel

Die Muskeln wurden zunächst schrittweise gedehnt bis zum Erreichen der Länge, bei der sie ihre maximale Kraftentwicklung zeigten ($L_{max}$). Kontraktionskraft und Kontraktionskinetik von $L_{max}$ wurden gemessen. Anschließend wurden 20µl der $10^{-4}$ M Insulinlösung zugefügt und die Kontraktionskraft und Kontraktionskinetik nach 2 min, 6 min, 10 min ,14 min und 18 min gemessen.

#### 2.5.1.2 Muskel mit pharmakologischer Intervention

Die Muskeln wurden zunächst ebenso schrittweise gedehnt bis zum Erreichen der Länge, bei der sie ihre maximale Kraftentwicklung zeigten ($L_{max}$). Kontraktionskraft und Kontraktionskinetik von $L_{max}$ wurden gemessen. Anschließend wurde die jeweilige Substanz (siehe oben) zugefügt und 20 min gewartet, um eine sichere Wirkung im Präparat zu erhalten. Erneut wurde die Kontraktionskraft und Kontraktionskinetik gemessen. Anschließend wurde wiederum 20µl der $10^{-4}$ M Insulinlösung hinzugefügt und nach 2 min, 6 min, 10 min ,14 min und 18 min die entwickelte Kontraktionskraft und Kontraktionskinetik gemessen.

### 2.5.2 Messprotokoll 2: PALC

Auch hier wurden Kontrollmuskel und Substanzmuskel bis $L_{max}$ gedehnt. Einziger Unterschied im Ablauf bestand darin, dass vor Beginn des Messprotokolls zusätzlich PALC in einer Konzentration von 30µM (3 x $10^{-5}$ M) zugefügt wurde und die Glukosekonzentration nur 2,8mM betrug.

### 2.5.3 Messprotokoll 3: Metformin

Der Ablauf der Kontrollmuskeln entsprach dem Ablauf bei Messprotokoll 1. Der Unterschied bestand bei den Muskeln mit pharmakologischer Intervention. Hier wurde Metformin in einer Konzentration von $10^{-4}$ M 160min vor Zugabe von Insulin beigefügt. Abbildung 2.6 zeigt schematisch den Ablauf des Messprotokolls.

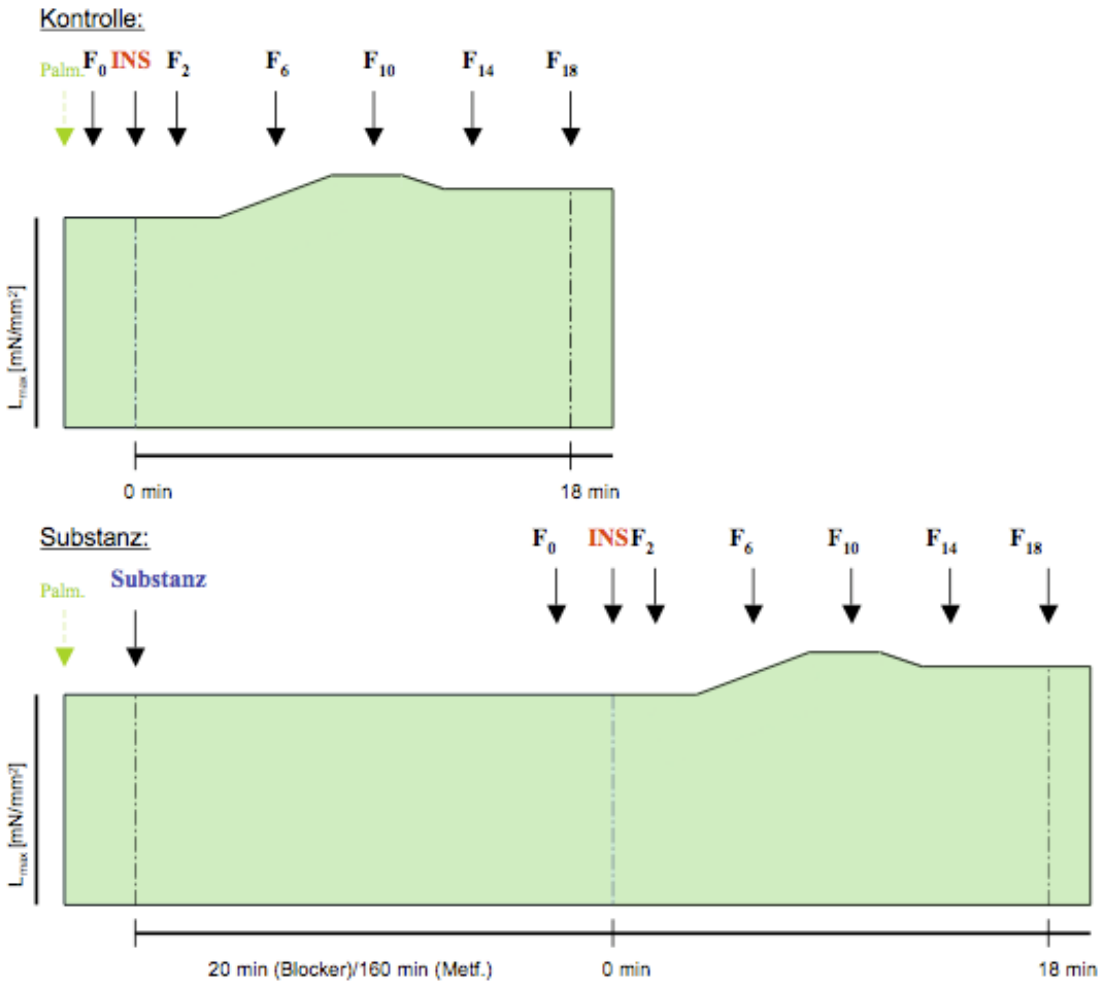


Abbildung 2.6 Schematische Darstellung der Messprotokolle.

Bei Messprotokoll 1 wurde die pharmakologische Intervention 20 min, bei Messprotokoll 2 160 min vor Insulingabe getätigt. Bei Messprotokoll 3 wurde vor Beginn des Protokolls zusätzlich PALC beigefügt. $F_o$...isometrrische Kraft vor Insulingabe. $F_2$- $F_{18}$... isometrische Kraft zu den Zeitpunkten 2min, 6min, 10min, 14min und 18 min nach Insulingabe,

### 2.5.4 Besondere Probleme des Dehnungsprotokolls am Vorhofmyokard

Vorhofgewebe ist im Gegensatz zu Ventrikelgewebe besonders anfällig für Arrhythmien. Während der Vordehnungsschritte auf $L_{max}$ wurden ca. 50% der Trabekel arrhythmisch. Die arrhythmischen Trabekel wurden von den Messungen ausgeschlossen.

## 2.6 Auswertung

### 2.6.1 Computergestützte Datenerhebung

Jeder Versuch wurde mit Hilfe der Software LabView® auf einem PC aufgezeichnet. Dabei wurden für jede Kontraktion folgende Parameter gemessen:

| | | |
|---|---|---|
| F | entwickelte Kraft (Force), (F = ST - DT) | [mN/mm$^2$] |
| DT | diastolische Kraft (diastolic tension) | [mN/mm$^2$] |
| ST | systolische Kraft (systolic tension) | [mN/mm$^2$] |
| TPT | Zeitdauer bis zur maximal entwickelten Kraft (time to peak tension) | [ms] |
| $RT_{50}$ | Zeit vom Kraftmaximum bis zur 50%igen Relaxation (relaxation time) | [ms] |
| $dF/dt_{max}$ | maximale Kraftanstiegsgeschwindigkeit | [mN/mm$^2$/s] |
| $dF/dt_{max}$ | maximale Relaxationsgeschwindigkeit | [mN/mm$^2$/s] |

Zur besseren Vergleichbarkeit von Trabekeln unterschiedlichen Durchmessers wurden alle Daten der Kraft auf die Querschnittsfläche bezogen ([mN/mm$^2$]).

### 2.6.2 Manuelle Auswertung der Originalregistrierung

Zusätzlich zur Computer-gestützten Datenerhebung wurden alle Versuche mit einem analogen Thermoschreiber (Fa. Graphtec) aufgezeichnet. Die Originalregistrierung des Schreibers konnte dann manuell ausgewertet werden. Insbesondere relative Werte im Sinne von Amplitudenverhältnissen wurden durch die manuelle Auswertung am Orginalmitschrieb ermittelt. Definierte Messpunkte waren:

| | |
|---|---|
| $F_{max}$ | Amplitude bei $L_{max}$ |
| $F_0$ | Kraft vor Zugabe von Insulin |
| $F_2$ | Entwickelte Kraft 2 min nach Insulingabe |
| $F_6$ | Entwickelte Kraft 6 min nach Insulingabe |
| $F_{10}$ | Entwickelte Kraft 10 min nach Insulingabe |

$F_{14}$ Entwickelte Kraft 14 min nach Insulingabe

$F_{18}$ Entwickelte Kraft 18 min nach Insulingabe

### 2.6.3 Statistische Auswertung

Alle ermittelten Werte wurden in Mittelwert ± Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Veränderungen wurden mit dem Student-t-Test je nach Protokoll für ungepaarte oder gepaarte Stichproben auf Signifikanz geprüft. Unterschiede mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0.05$ wurden als signifikant angesehen.

# 3 ERGEBNISSE

## 3.1 Positiver inotroper Effekt (PIE) von Insulin am Vorhofmyokard in Glukosetyrode bei Diabetikern und Nicht Diabetikern

Insulin induzierte in einer Konzentration von 2 x $10^{-8}$ M am isolierten, humanen Vorhofmyokard bei 14 Diabetikern und 23 Nichtdiabetikern (insgesamt 40 Trabekel) einen positiven inotropen Effekt (PIE) ohne Veränderung der diastolischen Wandspannung oder der Kinetik der isometrischen Kontraktion. Der Kraftanstieg nach Insulin erreichte nach 10 Minuten sein Maximum und betrug 117.8±2.4% in der Gruppe der Diabetiker und 115.8±1.8% in der Gruppe der Nicht Diabetiker bezogen auf 100% Ausgangskraft (beide Gruppen $p<0.05$ vs Ausgangswert; Diabetiker vs Nicht Diabetiker n.s.- siehe Abbilddung 3.2). Abbildung 3.1 zeigt eine Originalregistrierung mit dem typischen Verlauf der Kraftzunahme. Es ist zu erkennen, dass es ungefähr zwei Minuten nach Insulingabe zu einem Kraftanstieg kommt. Die Kraftzunahme ist zwischen zwei und sechs Minuten nach Insulingabe am stärksten. Der Maximaleffekt ist ungefähr nach zehn Minuten zu beobachten. Im weiteren Verlauf nimmt die Kraft wieder gering ab. Die Pfeile markieren die Messpunkte während des Protokolls.

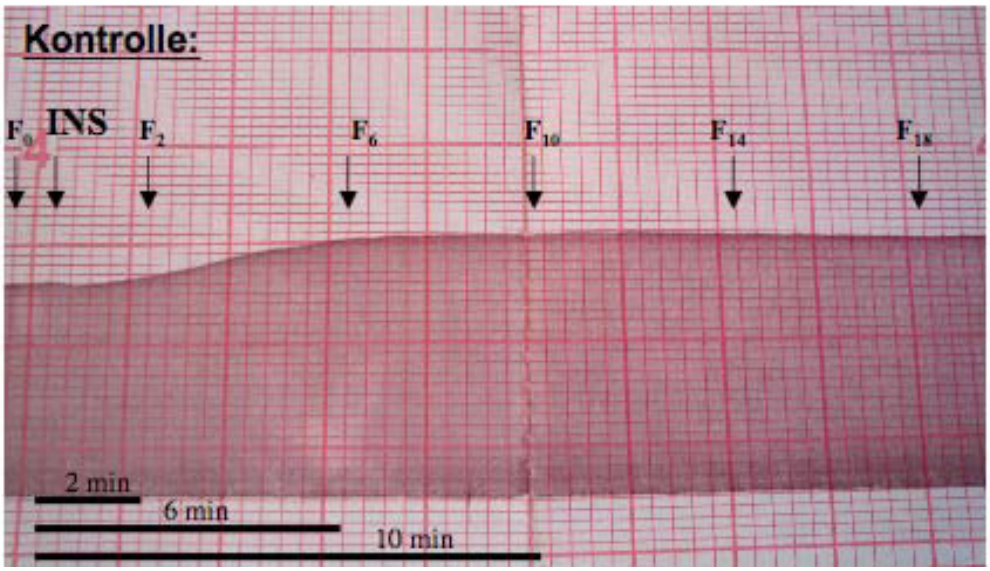


Abbildung 3.1 Originalregistrierung v. 23.10.2008 (1 Trabekel, Kanal 4) - Verlauf der Kraftzunahme durch Insulin in einer Konzentration von 2 x $10^{-8}$ M in Glukosetyrode.

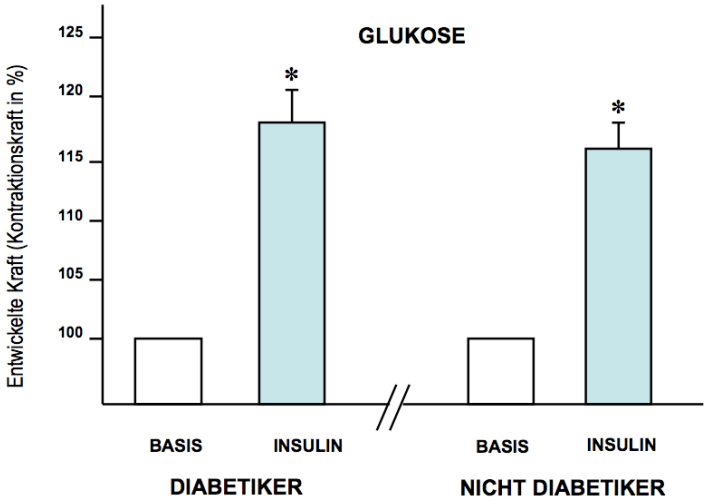


Abbildung 3.2 Ausgangskraft vs Kraftanstieg zehn Minuten nach Insulingabe bei Diabetikern und Nicht Diabetikern in Glukosetyrode. Kein signifikanter Unterschied zwischen Diabetikern und Nicht Diabetikern.

## 3.2 Positiver inotroper Effekt (PIE) von Insulin am Vorhofmyokard in Pyruvattyrode bei Diabetikern und Nicht Diabetikern

In Pyruvattyrode war der PIE von Insulin am isolierten, humanen Vorhofmyokard bei 11 Diabetikern und 11 Nicht Diabetikern (insgesamt 27 Trabekel) von 105±2.% (Diabetikern) und auf 109±1.8% (Nicht Diabetikern) verringert (in Gruppe Nicht Diabetiker $p<0.05$ vs Ausgangswert; Diabetiker vs Nicht Diabetiker n.s.- siehe Abbildung 3.4). Die Originalregistrierung zeigt den Verlauf der Kraftzunahme (Abbildung 3.3). Der Wirkungseintritt und die Wirkungskurve entsprechen den Kurven in Glukosetyrode, nur ist der Kraftanstieg geringern.

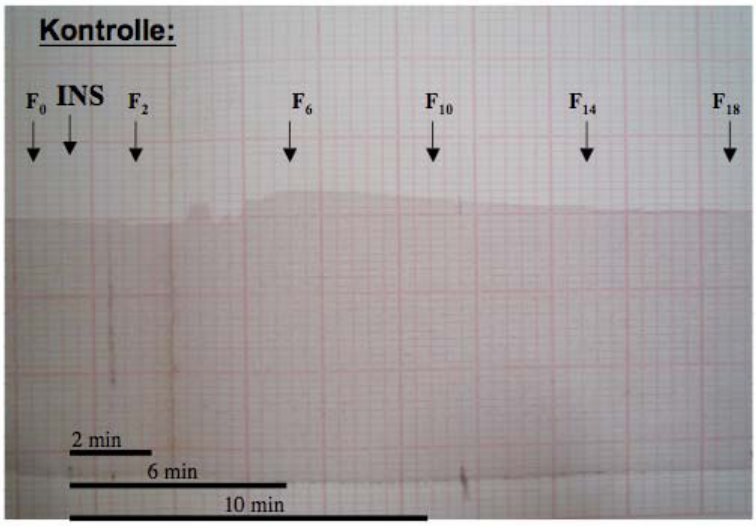


Abbildung 3.3 Originalregistrierung v. 09.10.2008 (1 Trabekel, Kanal 2) - Verlauf der Kraftzunahme durch Insulin in einer Konzentration von $2 \times 10^{-8}$ M in Pyruvattyrode.

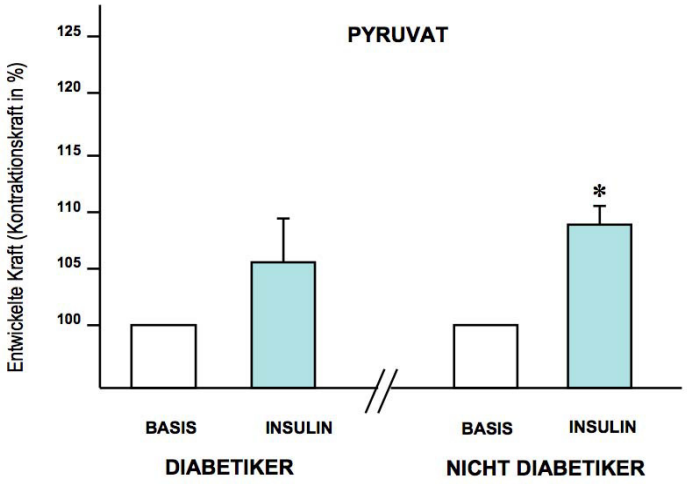


Abbildung 3.4 Vergleich Ausgangskraft vs Kraftanstieg zehn Minuten nach Insulingabe in Pyruvattyrode bei Diabetikern und Nicht Diabetikern.
Kein signifikanter Unterschied zwischen Diabetikern und Nicht Diabetikern.

## 3.3 PIE von Insulin bei gleichzeitiger Inhibition der GLUT4-Translokation bei Diabetikern und Nicht Diabetikern in Glukosetyrode bzw. Pyruvattyrode

Durch Blockade der GLUT4 Translokation mit Latrunculin B in einer Konzentration von 0,5 x $10^{-7}$ M in Glukosetyrode wurde der maximale Kraftanstieg durch Insulin nach zehn Minuten bei 4 Diabetiker und bei 14 Nicht Diabetikern (insgesamt 21 Trabekel) von 118.9± 3.7% und 115.3±2.6% auf 105.7±3.8% und 105.1±2.3% signifikant reduziert (beide Gruppen $p<0.05$ vs Kontrollgruppe; Diabetiker vs Nicht Diabetiker n.s.- siehe Abbildung 3.5). Die Originalregistrierung stellt den Kraftanstieg von zwei Muskelstreifen vom selben Vorhofgewebe dar (Abbildung 3.6).

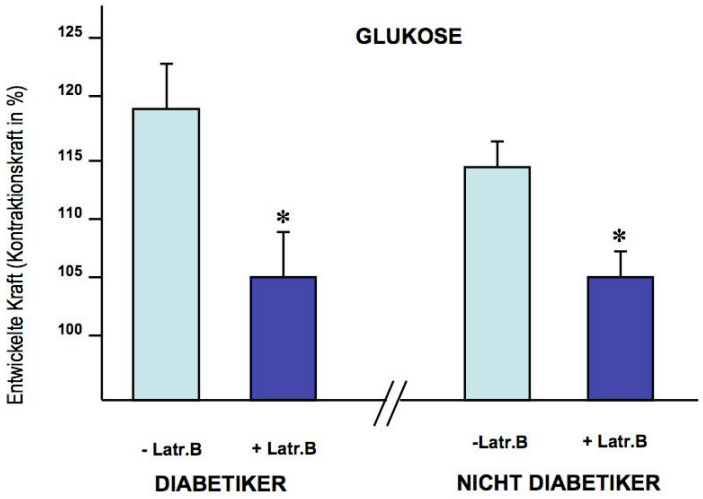


Abbildung 3.5 Vergleich Kraftanstieg Kontrollmuskel vs. Muskel präinkubiert mit Latrunculin B zehn Minuten nach Insulingabe in Glukosetyrode bei Diabetikern und Nicht Diabetikern. Kein signifikanter Unterschied zwischen Diabetikern und Nichtdiabetikern.

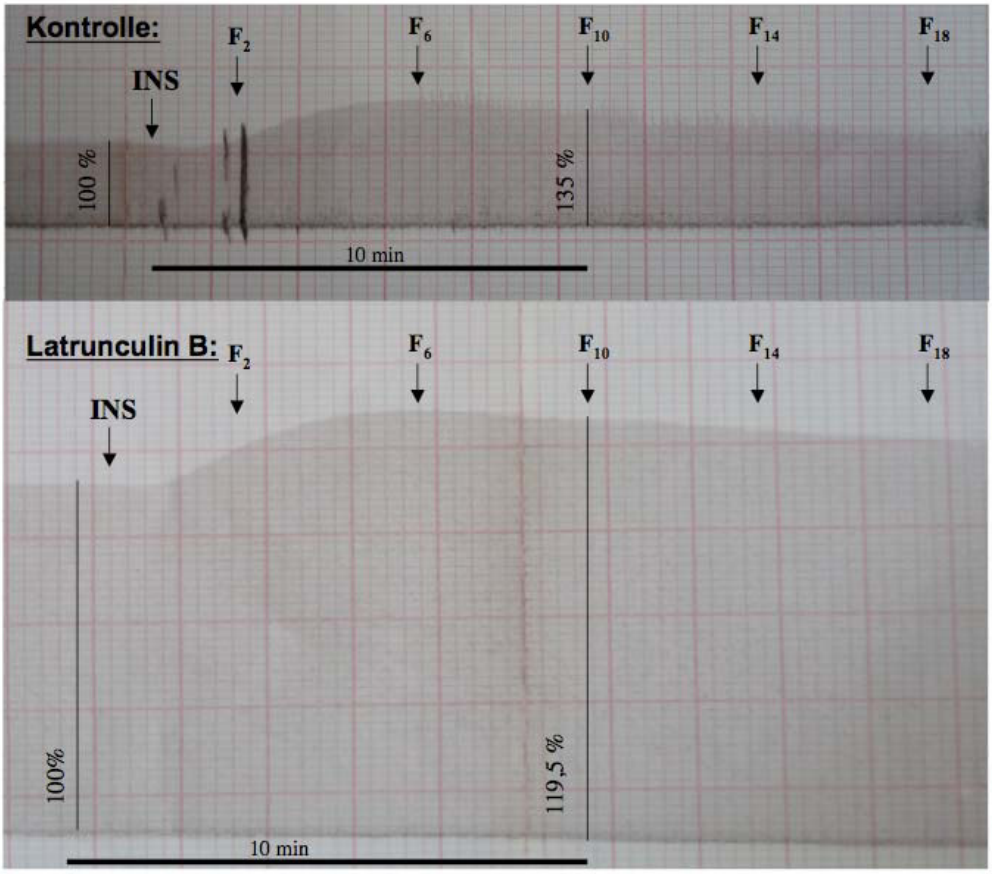


Abbildung 3.6 Originalregistrierung v. 23.10.2008 (2 Trabekel, Kanal 2,4) - Vergleich Kraftzunahme Kontrolle vs Präinkubation mit Latrunculin B.

Durch Blockade der GLUT4- Translokation mit Latrunculin B in einer Konzentration von 0,5 x $10^{-7}$ M in Pyruvattyrode wurde der maximale Kraftanstieg durch Insulin nach zehn Minuten bei 5 Diabetikern und bei 9 Nichtdiabetikern (insgesamt 18 Trabekel) von 106,8± 2,8% und 107 ±1,9% auf 103.8±2.5% und 104.4±1.4% nicht signifikant reduziert (beide Gruppen $p > 0.05$ vs Kontrollgruppe; Diabetiker vs Nicht Diabetiker n.s.– siehe Abbildung 3.7).

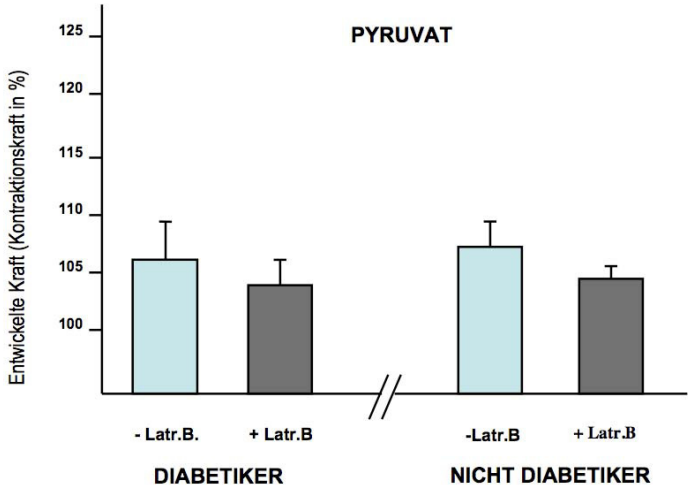


Abbildung 3.7. Vergleich Kraftanstieg Kontrollmuskel vs. Muskell präinkubiert mit Latrunculin B zehn Minuten nach Insulingabe in Pyruvattyrode bei Diabetikern und Nicht Diabetikern. Keine signifikanten Unterschiede.

## 3.4 PIE von Insulin bei Inhibition des SGLT-1 bei Diabetikern und Nicht Diabetikern in Glukosetyrode bzw. Pyruvattyrode

Durch Blockade des SGLT-1 mit T-1095A (EMD) in einer Konzentration von $10^{-6}$ M in Glukosetyrode wurde der maximale Kraftanstieg durch Insulin nach zehn Minuten bei 13 Diabetikern und 7 Nichtdiabetikern (insgesamt 28 Trabekel) von 116.1±2.7% und 118.2±3.3% auf 105.4±2.6% und 102.1±1.9% signifikant reduziert (beide Gruppen $p<0.05$ vs Kontrollgruppe; Diabetiker vs Nicht Diabetiker n.s.- siehe Abbildung 3.8).

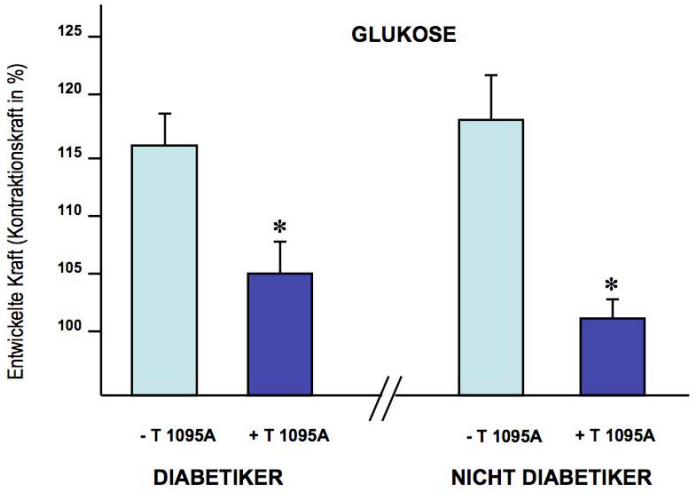


Abbildung 3.8 Vergleich Kraftanstieg Kontrollmuskel vs. Muskel präinkubiert mit T-1095A zehn Minuten nach Insulingabe bei Diabetikern und Nicht Diabetikern. Signifikante Reduktion durch Blockade des SGLT-1.

Durch Blockade des SGLT-1 mit Phlorizin in einer Konzentration$10^{-5}$ M in Glukosetyrode wurde der maximale Kraftanstieg durch Insulin nach zehn Minuten bei 11 Diabetikern und 8 Nicht Diabetikern (insgesamt 22 Trabekel) von 119±3% und 114.8±2.2% auf 106.8±4.4% und 105.9±2.7% reduziert (beide Gruppen $p<0.05$ vs Kontrollgruppe; Diabetiker vs Nicht Diabetiker n.s.- siehe Abbildung 3.9). Die Originalregistrierung stellt den Kraftanstieg von zwei Muskelstreifen vom selben Vorhofgewebe dar (Abbildung 3.10).

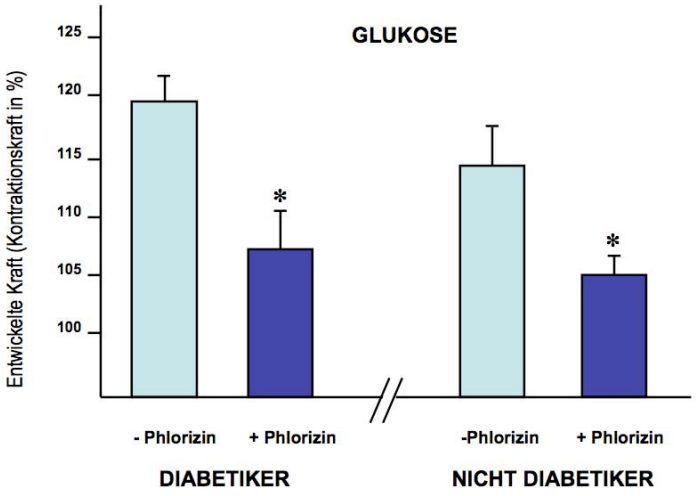


Abbildung3.9 Vergleich Kraftanstieg Kontrollmuskel vs. Muskel präinkubiert mit Phlorizin zehn Minuten nach Insulingabe bei Diabetikern und Nicht Diabetikern. Signifikante Reduktion durch Blockade des SGLT-1.

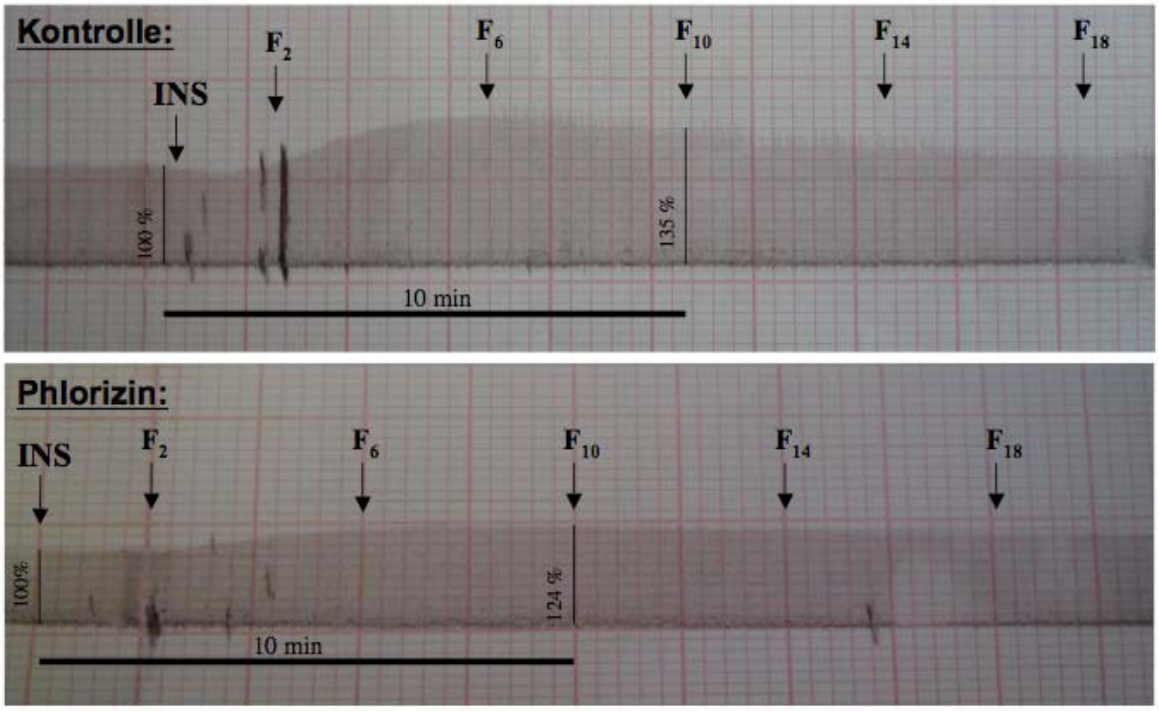


Abbildung 3.10 Originalregistrierung v. 23.10.2008 (2 Trabekel, Kanal 2,3) - Vergleich Kraftzunahme Kontrolle vs Präinkubation mit Phlorizin. Signifikante Reduktion durch Blockade des SGLT-1.

Durch Blockade des SGLT-1 mit T-1095A (EMD) in einer Konzentration von $10^{-5}$ M in Pyruvattyrode wurde der maximale Kraftanstieg durch Insulin nach zehn Minuten bei 6 Diabetikern und 10 Nicht Diabetikern (insgesamt 20 Trabekel) von 104,5± 2.3% und 107,5 ±1,6% auf 102,5± 2,3% und 104,3±1,1% reduziert (beide Gruppen vs Kontrollgruppe n.s.- siehe Abbildung 3.11) .

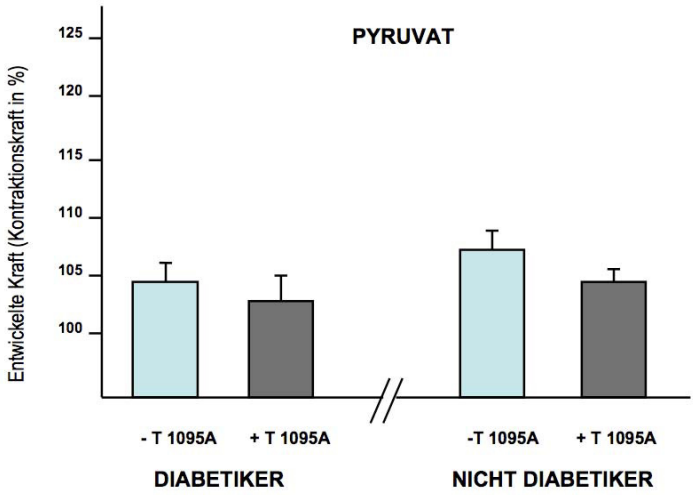


Abbildung 3.11 Vergleich Kraftanstieg Kontrollmuskel vs. Muskel präinkubiert mit T-1095A zehn Minuten nach Insulingabe in Pyruvattyrode bei Diabetikern und Nicht Diabetikern. Keine signifikanten Unterschiede.

## 3.5 PIE von Insulin bei Inhibition der PI3-Kinase bei Diabetikern und Nicht Diabetikern in Glukosetyrode

Durch Blockade der PI-3 Kinase mit Wortmannin in einer Konzentration von $10^{-7}$ M in Glukosetyrode wurde der maximale Kraftanstieg durch Insulin nach zehn Minuten bei 9 Diabetikern und bei 11 Nichtdiabetikern (insgesamt 28 Trabekel) von 121.7±4.3% und 114.8±39.1% auf 105.1±3.5% und 101±1.6% signifikant verringert (beide Gruppen $p<0.05$ vs Kontrollgruppe; Diabetiker vs Nicht Diabetiker n.s.- siehe Abbildung 3.12). Die Originalregistrierung stellt den Kraftanstieg von zwei Muskelstreifen vom selben Vorhofgewebe dar (Abbildung 3.13). In diesem Experiment war der Kraftanstieg durch Präinkubation mit Wortmannin vollständig aufgehoben.

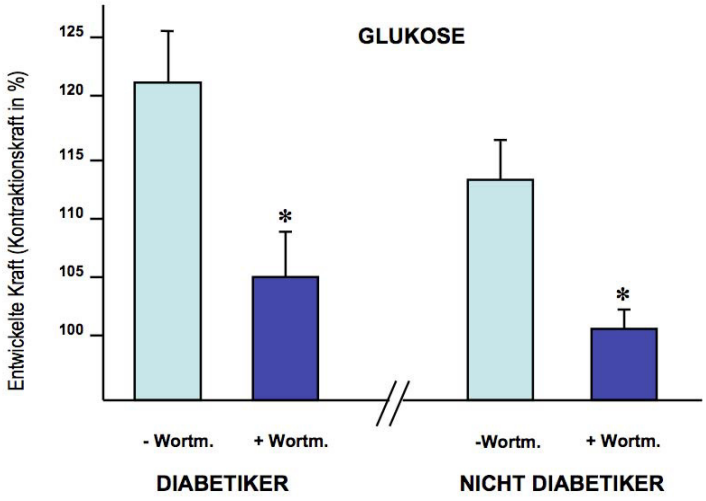


Abbildung 3.12 Vergleich Kontrollmuskel vs Muskel präinkubiert mit Wortmannin zehn Minuten nach Insulingabe. Kein signifikanter Unterschied zwischen Diabetikern und Nicht Diabetikern.

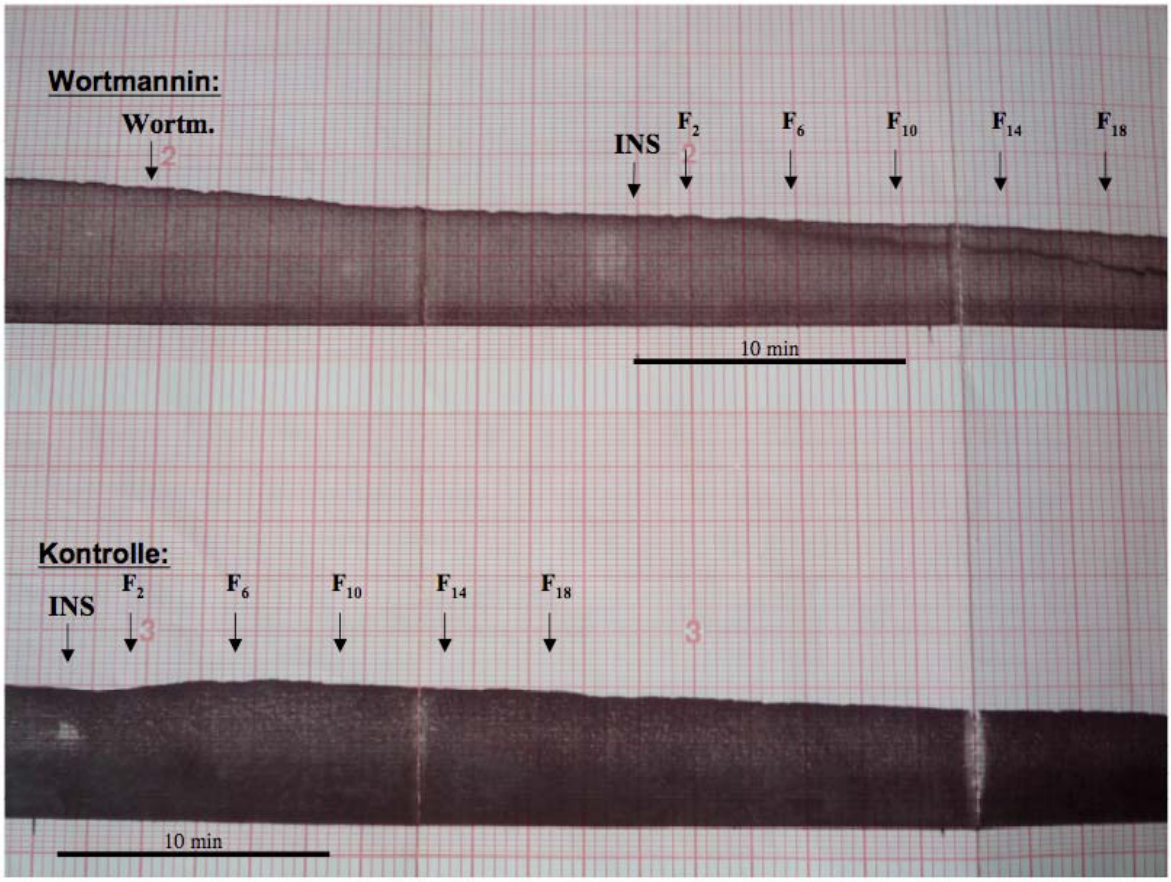

Abbildung 3.13 Originalregistrierung v. 09.10.2008 (2 Trabekel, Kanal 2,3) - Vergleich Kraftzunahme Kontrolle vs Präinkubation mit Wortmannin.

Durch Blockade der PI-3 Kinase mit Wortmannin in einer Konzentration von $10^{-7}$ M in Pyruvattyrode wurde der maximale Kraftanstieg durch Insulin nach zehn Minuten bei 6 Diabetikern und bei 10 Nicht Diabetikern (insgesamt 20 Trabekel) von 106.7±2.6% und 109.9±3% auf 100.1±2.6% und 97,1±1,3% signifikant verringert (beide Gruppen $p<0.05$ vs Kontrollgruppe; Diabetiker vs Nicht Diabetiker n.s. - siehe Abbildung 3.14). Abbildung 3.15 zeigt eine Originalregistrierungen von drei Muskelstreifen vom selben Vorhofgewebe. Der Inuslineffekt wird durch Präinkubation mit Wortmannin, T-1095A oder Latrunculin B in Pyruvattyrode fast vollständig aufgehoben. In allen drei Trabekeln ist die Kraftzunahme durch Insulin minimal.

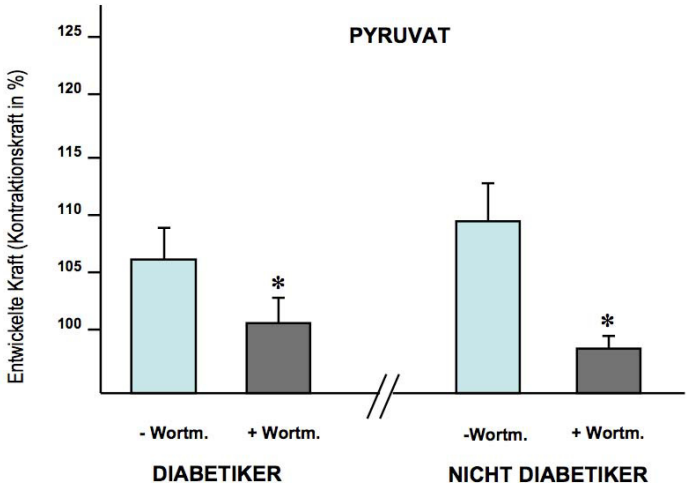


Abbildung 3.14 Vergleich Kraftanstieg Kontrollmuskel vs. Muskel präinkubiert mit Wortmannin zehn Minuten nach Insulingabe in Pyruvattyrode bei Diabetikern und Nicht Diabetikern. Signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe.

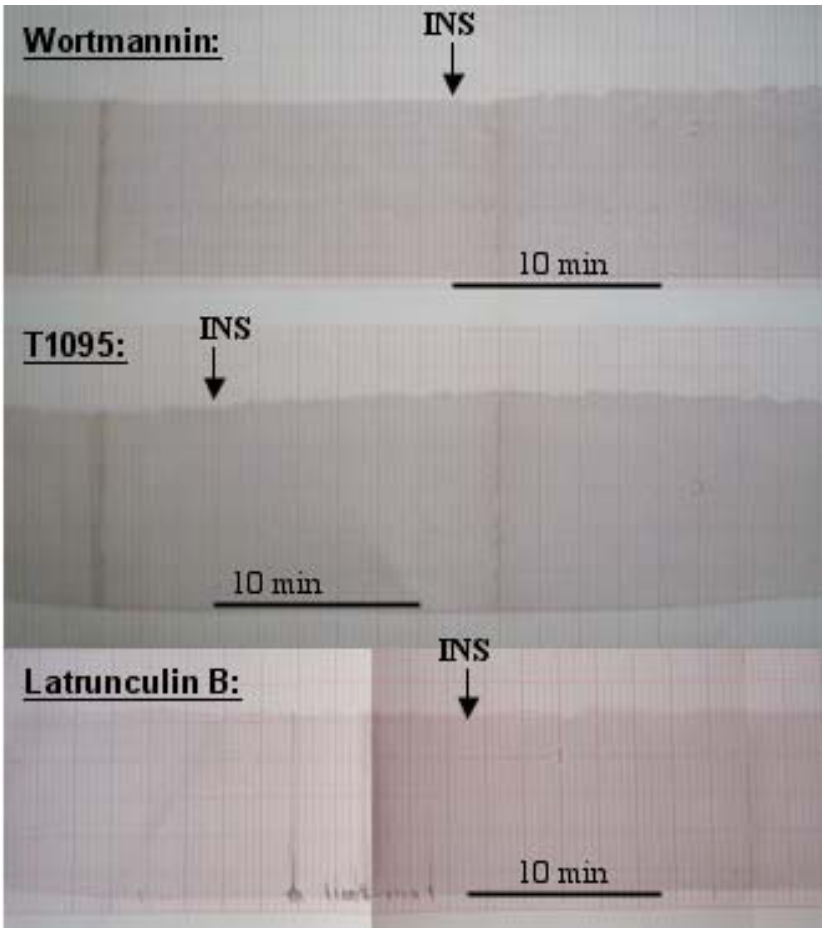


Abbildung 3.15 Originalregistrierung v. 09.10.2008 (3 Trabekel, Kanal 2,3,4) - Darstellung der Kraftzunahme der präinkubierten Muskeln mit Wortmannin, T-1095A oder Latrunculin B von Insulin in Pyruvattyrode.

## 3.6 Positiver inotroper Effekt (PIE) von Insulin am Vorhofmyokard in Tyrode mit Palmitoyl-L-Carnitin und verminderter Glukosekonzentration

Durch Zugabe von Palmitoyl-L-Carnitin (PALC) in einer Konzentration von 3 x $10^{-5}$ M vor Beginn des Messprotokolls induzierte Insulin in einer Konzentration von 2 x $10^{-8}$ M am isolierten, humanen Vorhofmyokard bei 8 Patienten (insgesamt 11 Trabekel) einen positiven inotropen Effekt (PIE) ohne Veränderung der diastolischen Wandspannung oder der Kinetik der isometrischen Kontraktion. Der Kraftanstieg betrug 10 Minuten nach Insulingabe 104,26±4,8% bezogen auf 100% Ausgangskraft ($p<0.05$ vs Ausgangswert - siehe Abbildung.3.16). Abbildung 3.17 zeigt eine Originalregistrierung mit dem typischen Verlauf der Kraftzunahme. Der maximale Kraftanstieg in der OR ist ungefähr nach 8 Minuten zu erkennen.

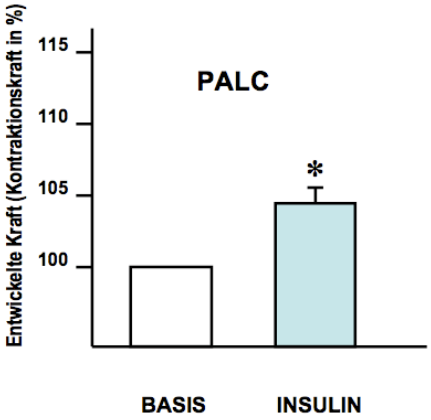


Abbildung 3.16 Vergleich Ausgangskraft vs Kraftanstieg zehn Minuten nach Insulinhabe in Tyrode mit PALC.

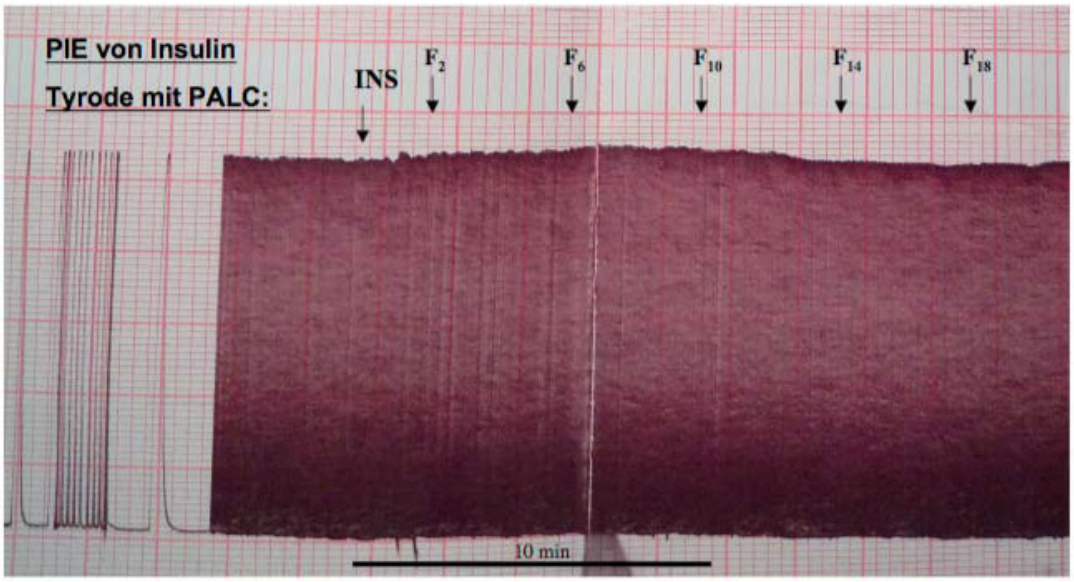


Abbildung 3.17 Originalregistrierung v. 14.05.2009 (1 Trabekel, Kanal 3) - Darstellung der Kraftzunahme der Muskelstreifen auf Insulingabe in PALC.

## 3.7 PIE von Insulin bei Präinkubation mit Metformin

Insulin induzierte in einer Konzentration von 2 x $10^{-8}$ M am isolierten, humanen Vorhofmyokard bei 4 Patienten (insgesamt 8 Trabekel) einen positiven inotropen Effekt (PIE) ohne Veränderung der diastolischen Wandspannung oder der Kinetik der isometrischen Kontraktion. Der Kraftanstieg betrug 10 Minuten nach Insulingabe 135.9±12.6% in der Kontrollgruppe und 121.6±7.7% in der Metformingruppe, bei der die Trabekel vor Insulingabe 160min mit Metformin in einer Konzentration von $10^{-4}$ M präinkubiert wurden (beide Gruppen $p<0.05$ vs Ausgangswert; Kontrollgruppe vs Metformingruppe n.s. - siehe Abbildung 3.18).

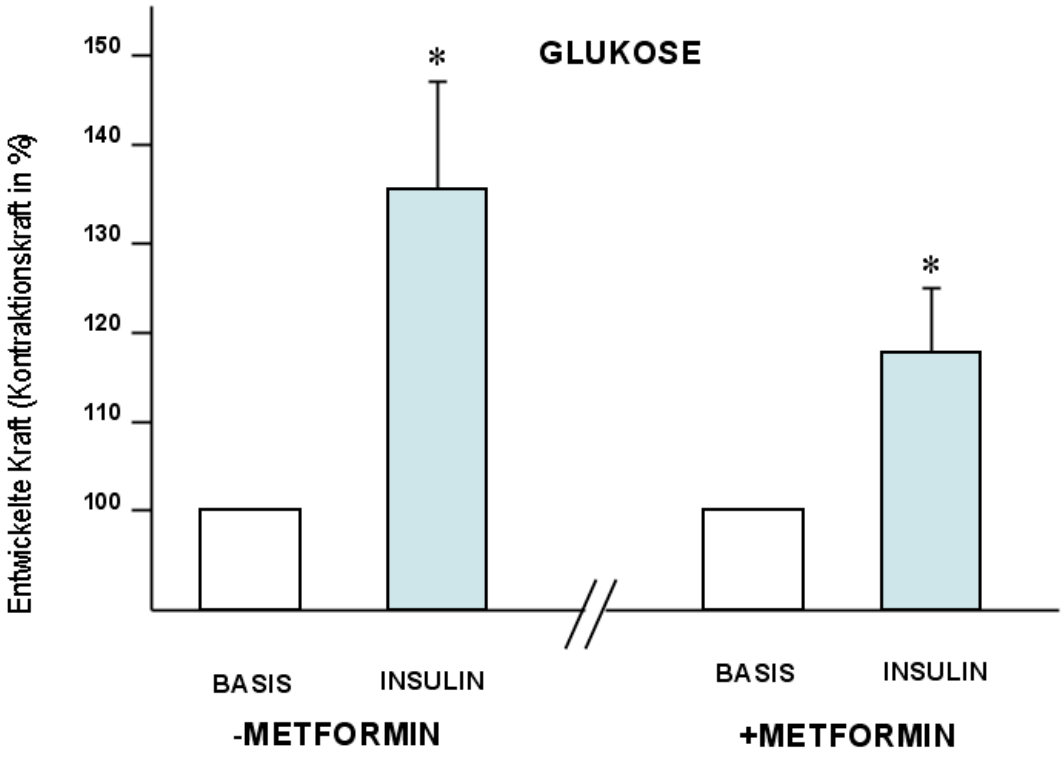


Abbildung 3.18 Vergleich Ausgangskraft vs Kraftanstieg zehn Minuten nach Insulingabe in Kontrollgruppe und Metformingruppe.

# 4 DISKUSSION

Die Resultate dieser Arbeit zeigen, dass Insulin am isolierten, humanen Vorhofmyokard einen akuten positiven inotropen Effekt erzeugt, welcher zum Teil substratabhängig ist. Mediiert wird dieser Effekt durch die PI3-Kinase und den Glukosetransportern GLUT4 und SGLT-1. Es konnte kein signifikanter Unterschied des Ausmaßes dieses funktionellen Effektes zwischen Diabetikern und Nichtdiabetikern festgestellt werden. Pyruvat bzw. PALC als energetische Substrate reduzierten den positiven inotropen Effekt von Insulin. Präinkubation mit Metformin führte zu keiner Zunahme des positiven inotropen Effektes von Insulin am isolierten Vorhofmyokard.

## 4.1 Hämodynamische Effekte von Insulin

Die Gabe von Insulin-Glukose-Infusion führt zu hämodynamischen Veränderungen am kardiovaskulären System.

In vivo konnte gezeigt werden, dass Insulin sowohl bei gesunden Probanden als auch bei Diabetikern einen akuten signifikanten Anstieg der LVEF (left ventricular ejection fraction) bei submaximaler Arbeit induziert (72). Der zugrunde liegende Mechanismus ist nicht endgültig geklärt, beruht aber wahrscheinlich auf einer Zunahme der Muskelkontraktilität des Herzens oder einer peripheren und koronaren Vasodilatation mit Senkung der Nachlast und verbesserter myokardialer Durchblutung. Die Zunahme der LVEF war in der Gruppe der Diabetiker geringer. Der Grund dafür könnte einerseits darin liegen, dass der koronare Blutstrom in dieser Gruppe verändert ist. Bei NIDDM wurde diesbezüglich demonstriert, dass im Vergleich zu Gesunden der koronare Blutfluss durch Insulin nicht erhöht werden konnte (73). Im Gegenzug wird jedoch auch beschrieben, dass die Gabe von Insulin-Infusion den myokardialen Blutfluss bei TypII Diabetikern mit koronarer Herzerkrankung verbessert. Mechanistisch könnte dem zu Grunde liegen, dass Insulin neben seinen metabolischen Effekten Vasodilatation induziert und die endotheliale Funktion verbessert (74).

Andererseits könnte auch eine Veränderung der Muskelkontraktilität bei Diabetikern, die auf einer Veränderung der Genexpression, der für die Muskelkontraktilität verantwortlichen Proteine beruht, dazu führen.
Die klinische Relevanz von Glukose-Insulin-Kalium Infusion (GIK-Infusion) bei akutem Myokardinfarkt wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Die CREATE-ECLA Studie, die bisher in dem Zusammenhang größte durchgeführte Studie mit Patientengruppen aus China, Indien, Pakistan und Lateinamerika, ergab neutrale Effekte bezüglich der Mortalität und der Herzfunktion nach STEMI durch Gabe einer hochdosierten GIK-Infusion für 24 Stunden (75).
Eine andere Studie ergab, dass die Gabe von GIK-Infusion in Kombination mit Dipyridamol nach Mykardinfarkt zu einer verbesserten linksventrikulären Funktion führt (76). Auch bei hirntoten Patienten konnte eine Verbesserung der linksventrikulären Funktion nach Gabe von GIK-Infusion gezeigt werden (77). Außerdem wurde in einer doppelblinden Studie gezeigt, dass die Therapie mit GIK-Infusion mit der Zunahme der mRNA Genexpression von ADRB1 und SERCA2a assoziiert ist (78).
Die unterschiedlichen Ergebnisse dieser Studien könnten auch auf den unterschiedlichen Einschlusskriterien bzw. dem unterschiedlichen therapeutischen Regime beruhen. So war die Rate der Koronarinterventionen in den Studien mit positivem Ergebnis deutlich höher als in der großen CREATE-ECLA Studie. Sie kamen somit dem westeuropäischen Standard der Therapie deutlich näher.

## 4.2 Unterschied zwischen Glukose und Pyruvat als energetischem Substrat

Die Kraftzunahme am isolierten Myokard durch Insulin war in der Gruppe mit Glukose als energetischem Substrat sowohl am Vorhofmyokard als auch am Ventrikelmyokard (39) um ≈ 50% höher als in Pyruvattyrode. Dies spricht dafür, dass ca. die Hälfte des Insulineffektes über vermehrte Glukoseaufnahme zustande kommt und Insulin neben der Translokation und Aktivierung von Glukosetransportern andere Mechanismen induziert, die ebenso zur Inotropie führen.

Im Unterschied zu Glukose führte Pyruvat vor Zugabe von Insulin zu einer höheren entwickelten Ausgangskraft. Es wurde beschrieben, dass Pyruvat, in vitro, sowohl den intrazellulären $Ca^{2+}$ - Transienten als auch die myofilamentäre $Ca^{2+}$-Sensitivität erhöht (79) und in vivo, eine positive inotrope Wirkung hat (80). Dies erklärt die höhere Ausgangskraft am Anfang des Experimentes. Man könnte auch den Schluss daraus ziehen, dass die höhere Ausgangskraft eine weitere prozentuelle Kraftzunahme mindert.

## 4.3 Kein Unterschied des direkten Effektes des Gukosetransporters GLUT4 am isolierten Vorhofmyocard bei Diabetikern und Nicht Diabetikern

Die Resultate zeigen, dass durch Blockade der GLUT4- Translokation mit Latrunculin B die Wirkung von Insulin bei Diabetikern und Nichtdiabetikern in gleichem Maße gehemmt wird. Das spricht dafür, dass, in vivo, der insulininduzierte Glukosetransport über GLUT4 am diabetischen Herzen dem nicht diabetischen Herzen entspricht. Dies geht mit dem Ergebnis einher, dass Diabetiker keine veränderte Expression der GLUT4 mRNA am menschlichen Vorhofmyokard aufweisen, wie von von Lewinski et al. gezeigt wurde. Im Gegenzug kam es bei Mäusen mit D.m. TypII zu einer Abnahme der totalen Konzentration von GLUT4 um 56% im Vergleich zur Kontrollgruppe (81). Weiters kam es auch bei Ratten mit Streptozotocin(STZ)- induziertem, insulinabhängigen D.m. zu einer Abnahme der Transkription von GLUT1 und GLUT4 um 55-70% am Herzen (55). Ein weiteres Modell an adipösen Zucker-Ratten zeigte, dass bei normalen Insulinkonzentrationen in vivo, eine defekte Insulinantwort besteht, jedoch der GLUT4-Transport durch erhöhte Insulinkonzentrationen nicht beeinträchtigt ist (82). Außerdem wurde anhand von PCR-Analysen demonstriert, dass bei Herzinsuffizienz die Genexpression die der fetalen Genexpression ähnelt und dass es in diesem Rahmen auch zu einer verminderten Expression der GLUT4- mRNA kommt (83). Eine weitere Studie ergab, dass ein direkter Zusammenhang zwischen GLUT4- Mangel, Herzhypertrophie und kardialer Dysfunktion besteht (84).

In Pyruvattyrode kam es weder in der Gruppe der Diabetiker noch in der Gruppe der Nichtdiabetiker zu einer signifikanten Hemmung durch Latrunculin B. Damit bestätigt sich der Mechanismus, dass Insulin auch durch Translokation der GLUT4 beinhaltenden Vesikel einen Glukose- vermittelten PIE bewirkt.

## 4.4 Kein Unterschied des direkten Effektes des SGLT-1 am isolierten Vorhofmyokard bei Diabetikern und Nicht Diabetikern

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass SGLT-1 am menschlichen Herzen die Funktion eines Glukosetransporters einnimmt. Ähnlich der Hemmung der GLUT4– Translokation kommt es auch nach Hemmung des SGLT-1 mit T-1095A bzw. Phlorizin zu einer deutlichen Abnahme der insulininduzierten Wirkung in Glukosetyrode. In Pyruvattyrode konnte keine weitere Verminderung des PIE festgestellt werden. Dies bestätigt die These, dass SGLT-1 einen wichtigen Teil des Glukosetransportes am Myokard übernimmt. Der Anteil der Hemmung entspricht ungefähr der der Hemmung der GLUT4-Translokation, sowohl in der Gruppe der Diabetiker als auch in der Gruppe der Nichtdiabetiker. Dies spricht dafür, dass Insulin einerseits unspezifisch die Rezeptoren aktiviert und diese nicht additiv, möglicherweise abhängig voneinander, den Glukosetransport an der Zellmembran herbeiführen.

Bisher existieren keine weiteren Daten bezüglich der metabolischen Regulation des SGLT-1 am diabetischen Herzen. Jedoch wurde beschrieben, dass Patienten mit Diabetes mellitus eine erhöhte intestinale SGLT1- Expression aufweisen (85) und bei Streptozotocin(STZ)- induzierten diabetischen Ratten die renale SGLT-1 Expression um das vierfache erhöht ist (86). Möglicherweise kommt es auch beim menschlichen Myokard zu einer Up-Regulation des SGLT-1 beim Diabetiker.

In Pyruvattyrode kam es weder in der Gruppe der Diabetiker noch in der Gruppe der Nichtdiabetiker zu einer signifikanten Hemmung durch T-1095A. Somit liegt es nahe, dass Insulin ähnlich der GLUT4-Translokation auch die SGTL-1 Funktion aktiviert.

## 4.5 Kein Unterschied der PI3-Kinase Aktivität am isolierten Vorhofmyokard bei Diabetikern und Nicht Diabetikern

Durch Hemmung der PI3-Kinase mit Wortmannin kam es bei Diabetikern und Nicht Diabetikern in gleichem Ausmaß zur Reduktion des PIE von Insulin. Somit ist die PI3-Kinase Aktivität am isolierten Vorhofmyokard bei Diabetikern unverändert.

Anders als bei den Glukosetransport- Blockern kam es in Pyruvattyrode durch Wortmannin zu einer signifikanten und vollständigen Reduktion der insulininduzierten Inotropie. Das zeigt, dass Insulin, unabhängig vom Myokardmetabolismus, die Proteinkinaseaktivität direkt aktiviert. Der dafür verantwortliche Mechanismus wurde in dieser Arbeit nicht weiter untersucht, jedoch in einer Vorarbeit dieser Arbeitsgruppe (39). Diese untersuchten den direkten Effekt von Insulin auf die sarkoplasmatische $Ca^{2+}$-Konzentration. Durch Hemmung der sarkoplasmatischen Funktion mit Cyclopiazon-Säure (CPA) und Ryanodin wurde der Insulineffekt um 47% gemindert. Ebenso wurde durch Zugabe des reversen $Na^{+}/Ca^{2+}$- Blocker KB-R 7943 der Effekt um 62% verringert. Dies spricht dafür, dass PIK-3 Kinase direkt mit dem reversen $Na^{+}/Ca^{2+}$-Austausch gekoppelt ist. Auch dieser Wirkmechanismus scheint am diabetischen Herzen unverändert zu sein.

## 4.6 Keine erkennbaren Unterschiede des Glukosemetabolismus am isolierten Vorhofmyokard bei Diabetikern im Vergleich zu Nicht Diabetikern

Wie oben beschrieben, führen die Hemmung der GLUT4-Translokation und die Hemmung des SGLT-1 in der Gruppe der Diabetiker und Nichtdiabetiker zur gleichstarken Blockade der insulininduzierten Inotropie. Dies bedeutet, dass der von Glukose abhängige Teil der Inotropie bei Diabetiker unverändert ist. Die Maladaptation des diabetischen Herzen beruht primär auf der bevorzugten Aufnahme von Fettsäuren in die Herzzelle. Dies kommt erstens durch erhöhte Fettsäurenspiegel im Blut, zweitens durch erhöhte FAT/CD36- Konzentrationen an der Zellmembran und drittens durch Aktivierung des Transkriptionsfaktor PPAR$\alpha$

zustande. Randle beschrieb, dass die durch den Fettsäurenabbau produzierten Metabolite die Glukoseverstoffwechslung primär auf Höhe des Pyruvatdehydrogenasekomplexes hemmen und damit weniger die Glukoseaufnahme per se, sondern viel eher die mitochondriale Oxidation geblockt wird.
Man könnte nun den Schluss daraus ziehen, dass der Glukose abhängige Teil der Inotropie bei Diabetikern unabhängig von der vollständigen Oxidation der Glukose auftritt. Jedoch wurde diese Experimentreihe in einer fettsäurenfreien Nährlösung durchgeführt, d.h. dass nur der Insulineffekt auf Glukose getestet worden ist.

## 4.7 Einfluss von PALC am isolierten, humanen Vorhofmyokard

Wie oben beschrieben und in den Ergebnissen eindeutig erkennbar, beruht die substratabhängige positive Inotropie von Insulin auf vermehrte Glukoseaufnahme in die Kardiomyozyten über die Glukosetransporter GLUT4 und SGLT-1. Um die Bedeutung dieser noch eindeutiger darzustellen, ersetzten wir das energetische Substrat Glukose nicht nur mit Pyruvat, dem Endprodukt der Glykolyse, sondern auch mit PALC. Wie in der Einleitung beschrieben, sind Acylcarnitine Intermediärprodukte der Fettsäureutilisation. Der genaue Mechanismus der Aufnahme von PALC in die Kardiomyozyten ist nicht bis ins Detail geklärt, aber, dass dies der Fall ist, wurde bereits in einigen Arbeiten demonstriert (88-89). Die Wahl von PALC beruhte darauf, dass es im Vergleich zur physiologisch vorkommenden Palmitinsäure (gesättigte organische Fettsäure) wasserlöslich ist und somit methodisch besser einsetzbar. In PALC-hältiger Tyrode ohne Glukose kam es zu zyklischen Schwankungen der Kontraktionsamplitude. Die Orignalregistrierung demonstriert, dass sich der Muskel nach Zugabe von Glukose wieder stabilisierte (Abbilung 4.1).

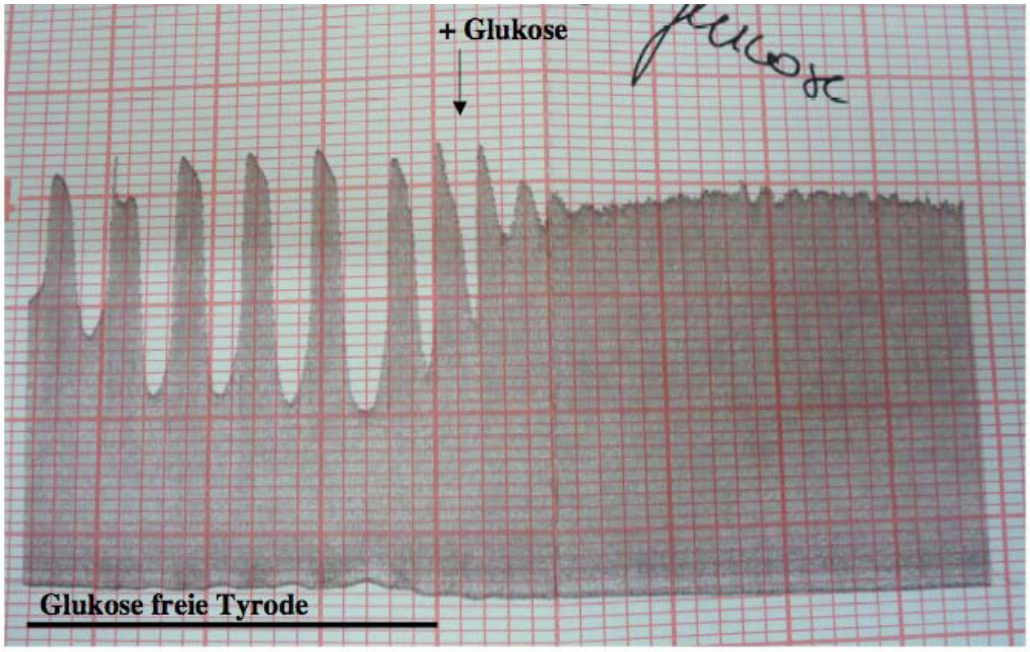


Abbildung 4.1 Originalregistrierung v.13.05.2009 (1 Trabekel, Kanal 1). In Glukose freier Tyrode kam es zu Arrhythmien des Muskelstreifens. Nach Zugabe von Glukose stabilisierte sich der Muskel.

Um diese Arrhythmien zur Durchführung der Experimente zu verhindern, wurde der Tyrode 2,8mM Glukose beigefügt. Die Resultate der PALC-Messungen zeigen, dass der positive inotrope Effekt stark abgeschwächt war. Damit bestätigte sich die Wichtigkeit des Glukosetransportes für den inotropen Mechanismus.

## 4.8 Keine Steigerung der insulininduzierten Inotropie durch Präinkubation mit Metformin am isolierten, humanen Vorhofmyokard

In diesen Experimenten überprüften wir, ob durch zweistündige Präinkubation der Vorhoftrabekel die substratabhängige Insulin induzierte Inotropie zunimmt. Als Hypothese wurde angenommen, dass Metformin zu vermehrter GLUT4-Translokation auf Insulingabe und somit zu stärkeren PIE führen kann. Die Ergebnisse zeigten jedoch, dass es zu keiner Kraftzunahme in der Metformingruppe gekommen ist. Dieses Resultat lässt darauf schließen, dass Metformin, in vitro, innerhalb der Zeitspanne von 160min, die Glukoseaufnahme in die Myokardzelle nicht beeinflusst. Limitiert wird diese Aussage dadurch, dass die Anzahl der durchgeführten Experimente sehr gering war.

## 4.9 Therapeutische Konsequenzen

Therapeutische Konsequenzen, die sich aus der vorgelegten Arbeit ergeben könnten, müssten entweder auf der verbesserten Funktion des Myokards oder aber auf einem veränderten Metabolismus des Herzgewebes beruhen. Spezifisch messen ließ sich mit den genutzten Methoden nur die myokardiale Funktion. Aussagen zu dem myokardialen Metabolismus lassen sich nur indirekt über die Wirkung von Glukosetransporter-hemmenden pharmakologischen Interventionen herleiten.

Aus physiologischer Sicht ist darauf hinzuweisen, dass die verwendete Insulinkonzentration von 20nmol/L zwar niedriger als in den meisten bisher durchgeführten Untersuchungen ist, dennoch aber ca. um das fünffache bis 50zigfache höher als die postprandiale Insulinkonzentration im Blutplasma bei gesunden Menschen. Das heißt, dass ein Effekt auf die myokardiale Funktion nur mit supraphysiologischen Dosierungen möglich ist.

Eine Möglichkeit dem Organismus deutlich höhere Dosen an Insulin zuzuführen, ist die Gabe einer Glukose-Insulin-Kalium (GIK)-Infusion. Durch die Zugabe von Glukose und Kalium verhindert man die bei alleiniger Insulingabe auftretenden Hypoglykämien und Hypokaliämien. Der Nutzen einer solchen Therapie ist aber, wie oben beschrieben, auch für das begrenzte Gebiet des akuten Myokardinfarktes nicht eindeutig (75-78).

Grundlage einer gezielt kardialen Insulintherapie wäre eine topisch wirksame Applikation des Insulins am Myokard, da Insulin neben dem Myokard an der Skelettmuskulatur, im Fettgewebe, in der Leber und am Endothel ebenfalls seine Wirkung entfaltet. Alternativ wäre eine direkte Aktivierung der Glukosetransporter ein möglicher Weg, das intrazelluläre Glukoseangebot zu verbessern. Darüber hinaus wäre erstens ein adäquates Ansprechen der Insulinrezeptoren an der Zelle vorauszusetzen und zweitens eine intakte Wirkung der durch Insulin induzierten Mechanismen. Das Ansprechen auf die Rezeptoren an der Herzzelle scheint zumindest in höheren Insulinkonzentrationen bei Diabetikern, in vitro, der Fall zu sein. Ebenso erscheint die funktionelle Antwort am Myokard von Diabetikern nicht unterschiedlich zu Stoffwechselgesunden. In diesem Zusammenhang sind zwei Studien zu erwähnen, die erst im Frühjahr 2009 publiziert wurden und die die

Wichtigkeit der optimalen Insulinrezeptorfunktion an der Herzzelle am Mausmodell, in vivo, demonstrieren. In beiden Studien führte das Fehlen der optimalen Insulinantwort an der Herzzelle bei CIRKO- Mäusen (Cardiomyocyte Insulin Receptor Knock Out) zur mitochondrialen Dysfunktion. Weiters wies die CIRKO- Gruppe im Vergleich zur WT-Gruppe (wildtype) eine erhöhte Mortalität und eine um 40% reduzierte linksventrikuläre Funktion nach Myokardinfarkt auf. Zusätzlich war die Genexpression von GLUT4, PPAR$\alpha$, und SERCA2a in der CIRKO-Gruppe verringert (87,88).

In vivo, könnte der Glukose abhängige Teil der Inotropie bei Diabetikern verringert sein, da durch die diabetische Maladaption hauptsächlich Fettsäuren aufgenommen und oxidiert werden. Sollte dies so sein, dann wäre eine Modifizierung der Genexpression beteiligter Glucosetransporter (GLUT4 und SGLT-1) prinzipiell zielführend, um diesem Prozess entgegenzusteuern. Die GLUT4 Genexpression wird von verschiedenen Transkriptionsfaktoren im Muskel und im Fettgewebe reguliert. Dazu gehören MyoD, MEF2A, GEF, TNF-$\alpha$, TR-1$\alpha$, KLF15, SREBP-1c, C/EBP-$\alpha$, O/E-1, FFA, PAPR$\gamma$, LXR$\alpha$ und NF-1, die auf die Genregulation sowohl einen positiven als auch negativen Einfluss haben (87). Es wird postuliert, dass PPAR$\gamma$- Agonisten den Glukosemetabolismus am menschlichen Skelettmuskel fördern (88) und SREBP-1c direkt zur Up-Regulation der GLUT4-Gentranskription im Fettgewebe führt (89). Eine weitere Studie an Patienten mit Hyperlipidämie oder D.m. TypII ergab, dass die Genexpression von GLUT4 und PPAR$\gamma$ durch Arachidonsäure gehemmt ist. In dieser Studie waren interessanterweise die mRNA-Levels normal hoch, jedoch die GLUT4-Protein-Levels verringert (90).Gentherapeutische Eingriffe sind jedoch bisher eher spekultativ, kam es zum Beispiel bei PPAR$\gamma$- genveränderten Mäusen zur Schädigung des Mykards (91).

Der Nachweis, dass eine selektive Gentherapie zur Modifizierung der Herzfunktion möglich ist, konnte am Schafmodell mit induzierter Herzerkankung erbracht werden. Durch kardiale Rezirkulation von SERCA2a-transportierendem Adeno - assoziierten Virus2 (AAV2/1SERCA2a) kam es hier zur Verbesserung der myokardialen Funktion (92).

## 4.10 Zusammenfassung

Zusammenfassend muss man festhalten, dass die vorgelegte Arbeit grundlagenwissenschaftliche Aspekte der insulininduzierten Inotropie am multizellulären Streifenpräparat untersucht hat. Es konnte gezeigt werden, dass in diesem humanen Modell mit weitgehend physiologischen Bedingungen, der funktionelle Effekt von Insulin und die zugrunde liegende Signaltransduktion keinen signifikanten Unterschied zwischen Diabetikern und Stoffwechselgesunden aufwies. Erstmals überhaupt konnte die funktionelle Wirkung von Glukosetransportern am menschlichen Vorhofmyokard beschrieben werden. Auch die Bedeutung der glukoseabhängigen Inotropie von Insulin wurde durch Substratersatz mit Pyruvat und Intermediärprodukten der Fettsäureutilisation verdeutlicht.

Ob sich aus diesen Befunden klinisch relevante Konsequenzen ergeben, müssen weitere Untersuchungen zeigen, die auch in in vivo Modellen reproduzierbare Effekte nachweisen.

# 5 LITERATURVERZEICHNIS


1. Fabiato A. Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. Am J Physiol. 1983 Jul;245(1):C1-14.
2. Minamisawa S, Wang Y, Chen J, Ishikawa Y, Chien KR, Matsuoka R. Atrial chamber-specific expression of sarcolipin is regulated during development and hypertrophic remodeling. J Biol Chem. 2003 Mar 14;278(11):9570-5.
3. Konhilas JP, Irving TC, de Tombe PP. Frank-Starling law of the heart and the cellular mechanisms of length-dependent activation. Pflugers Arch. 2002 Dec;445(3):305-10.
4. Böhm M, Schwinger RH, Erdmann E. Adrenergic beta receptors and guanine nucleotide binding proteins (G-proteins) of the failing human heart. Z Kardiol. 1992;81 Suppl 4:23-31. the failing human heart. Z Kardiol. 1992;81 Suppl 4:23-31.
5. Mangoni ME, Fontanaud P, Noble PJ, Noble D, Benkemoun H, Nargeot J, Richard S.Facilitation of the L-type calcium current in rabbit sino-atrial cells: effect on cardiac automaticity.Cardiovasc Res. 2000 Dec;48(3):375-92.
6. Hasenfuss G, Holubarsch C, Hermann H.p, Astheimer K, Pieske B, Just H. Influence of the force-frequency relationship on haemodynamics and left ventricular function in patients with non-failing hearts and in patients with dilated cardiomyopathy. EHJ 1994 15 (29:164-170.
7. Parilak LD, Taylor DG, Song Y, Burkart T, Shryock JC, Curtis AB, Knot HJ. Contribution of frequency-augmented inward Ca2+ current to myocardial contractility. Can J Physiol Pharmacol. 2009 Jan;87(1):69-75.
8. Meyer M, Lehnart S, Pieske B, Schlottauer K, Munk S, Holubarsch C, Just H, Hasenfuss G. Influence of endothelin 1 on human atrial myocardium--myocardial function and subcellular pathways. Basic Res Cardiol. 1996 Jan-Feb;91(1):86-93.
9. Pieske B, Beyermann B, Breu V, Löffler BM, Schlotthauer K, Maier LS, Schmidt-Schweda S, Just H, Hasenfuss G. Functional effects of endothelin and regulation of endothelin receptors in isolated human nonfailing and failing myocardium. Circulation. 1999 Apr 13;99(14):1802-9.
10. Namekata I, Fujiki S, Kawakami Y, Moriwaki R, Takeda K, Kawanishi T, Takahara A, Shigenobu K, Tanaka H. Intracellular mechanisms and receptor types for endothelin-1-induced positive and negative inotropy in mouse ventricular myocardium. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 2008 Feb;376(6):385-95.
11. Bootman MD, Harzheim D, Smyrnias I, Conway SJ, Roderick HL. Temporal changes in atrial EC-coupling during prolonged stimulation with endothelin-1.Cell Calcium. 2007 Oct-Nov;42 (4-5):489-501.
12. Moravec CS, Schluchter MD, Paranandi L, Czerska B, Stewart RW, Rosenkranz E, Bond M. Inotropic effects of angiotensin II on human cardiac muscle in vitro. Circulation. 1990 Dec;82(6):1973-84.
13. Holubarsch C, Schmidt-Schweda S, Knorr A, Duis J, Pieske B, Ruf T, Fasol R, Hasenfuss G, Just H. Functional significance of angiotensin receptors in human myocardium. Significant diffferences between atrial and ventricular myocardium. Eur Heart J. 1994 Dec;15 Suppl D:88-91.
14. Bing RJ: Cardiac metabolism. Physiol Rev 45: 171-213, 1965.
15. Neely JR, Denton RM, England PJ ,Randle PJ (1972). The effects of increaded heart work on the tricarboxylate cycle and ist interaction with glycolysis and lipid metabolism and the energy balance of heart muscle. Annu Rev Physiol. 63, 413- 459.
16. Oram JF, Benetch SL , Neely JR (1973). Regulation of fatty acid utilization in isolated perfused hearts. J Biol Chem 277, 32571- 32577.
17. Neely JR & Morgan HE (1974). Relationship between carbohydrate and lipid metabolism and the energy balance of heart muscle. Annu Rev Physiol 63, 413-459.
18. Williamson JR, Ford C, Illingworth J, Safer B (1974). Coordination of citric acid cycle activity with electron transport flux. Circ Res 38, 139-151.
19. Opie LH (1998). Heart Physiology:Fromm Cell to Circulation, pp. 43-63, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia.
20. Stanley WC, Recchia FA, Lopaschuk GD (2005). Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart. Physiol.Rev 85, 1093-1129.
21. Mueckler M. Facilitative glucose transporters. Eur J Biochem. 1994 Feb 1;219(3):713-25. Review.

22. Fischer Y, Thomas J, Sevilla L, Muñoz P, Becker C, Holman G, Kozka IJ, Palacín M, Testar X, Kammermeier H, Zorzano A. Insulin-induced recruitment of glucose transporter 4 (GLUT4) and GLUT1 in isolated rat cardiac myocytes. Evidence of the existence of different intracellular GLUT4 vesicle populations. J Biol Chem. 1997 Mar 14;272(11):7085-92.
23. Zorzano A, Fandos C, Palaci M. Role of plasma membrane transporters in muscle metabolism. Biochem. J. (2000) 349, 667–688.
24. Russel RR 3rd, Bergeron R, Shulman GI, Young LH.Translocation of myocardial Glut-4 and increased glucose uptake through activation of AMPK by AICAR. Am J Physiol. 1999 Aug;277 (2 Pt 2): H 643-9.
25. Luiken JJ, Vertommen D, Coort SL, Habets DD, El Hasnaoui M, Pelsers MM, Viollet B, Bonen A, Hue L, Rider MH, Glatz JF. Identification of protein kinase D as a novel contraction-activated kinase linked to GLUT4-mediated glucose uptake, independent of AMPK. Cell Signal. 2008 Mar;20(3):543-56.
26. Zhou L, Cryan EV, D'Andrea MR, Belkowski S, Conway BR, Demarest KT. Human cardiomyocytes express high level of Na+/glucose cotransporter 1 (SGLT1). J Cell Biochem. 2003 Oct 1;90(2):339-46.
27. Bøtker HE, Helligsø P, Kimose HH, Thomassen AR, Nielsen TT. Determination og high energy phosphates and glycogen in cardiac and skeletal muscle biopsies, with spezial reference to influence of biopsy technique and delayed freezing. Cardiovasc res.1994 Apr;28 (4):524-7.
28. Gargiulo CE, Stuhlsatz-Krouper SM, Schaffer JE. Localization of adipocyte long-chain fatty acyl-CoA synthetase at the plams membrane. J Lipid Res.1999 May;40(5):881-92.
29. Zhu H, Shi J, de Vries Y, Arvidson DN, Cregg JM, Woldegiorgis G. Functional studies of yeast-expressed human heart muscle carnitine palmitoyltransferase I. Arch Biochem Biophys. 1997 Nov 1;347(1):53-61.
30. Rasmussen BB, Holmbäck UC, Volpi E, Morio-Liondore B, Paddon-Jones D, Wolfe RR.Malonyl coenzyme A and the regulation of functional carnitine palmitoyltransferase-1 activity and fat oxidation in human skeletal musle. J Clin Invest.2002 Dec;110(11):1607-9.
31. Young ME, Goodwin GW, Ying J, Guthrie P, Wilson CR, Laws FA, Taegtmeyer H. Regulation of cardiac and skeletal muscle malonyl-CoA decarboxylase by fatty acids. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2001 Mar;280(3):E471-9.
32. Kerner J, Hoppel C. Fatty acid import into mitochondria. Biochim Biophys Acta.2000 Jun 26;1486(1):1-17.Review.
33. Higgins AJ, Morville M, Burges RA, Gardiner DG, Page MG, Blackburn KJ. Oxfenicine diverts rat muscle metabolism from fatty acid to carbohydrate oxidation and protects the ischaemic rat heart. Life Sci. 1980 Sep 15;27(11):963-70.
34. Huss JM, Kelly DP. Nuclear receptor signaling and cardiac energetics. Circ Res. 2004 Sep 17;95(6):568-78.
35. Gulick T, Cresci S, Caira T, et al. The peroxisome proliferator-activated receptor regulates mitochondrial fatty acid oxidative enzyme gene expression. Proc Natl Acad Sci U S A. 1994; 91: 11012–11016.
36. Randle P, Sugden P, Kerbey A, et al. Regulation of pyruvate oxidation and the conservation of glucose. Biochem Soc Symp. 1978; 43: 47–67.
37. Ren J, Samson WK, Sowers JR. Insulin-like growth factor I as a cardiac hormone: physiological and pathophysiological implications in heart disease. J Mol Cell Cardiol. 1999;31:2049 –2061.
38. von Lewinski D, Voss K, Hülsmann S, Kögler H, Pieske B. Insulin-like growth factor-1 exerts Ca2+-dependent positive inotropic effects in failing human myocardium. Circ Res. 2003 Feb 7;92(2):169-76.
39. von Lewinski D, Sebastian Bruns, Stefanie Walther, Harald Kögler and Burkert Pieske. Insulin causes [Ca2+]i-dependent and [Ca2+]i-independent positive inotropic effects in failing human myocardium. Circulation 2005;111;2588-2595.
40. Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. Diabetes Care. 2004 May;27(5):1047-53.
41. Reiss N, Kleikamp G, Tenderich G, Tschöpe D, Körfer R. Diabetes mellitus and heart failure - incidence and surgical therapy options. Herz. 2008 Apr;33(3):206-10. Review. German.
42. Sowers JR, Epstein M, Frohlich ED. Diabetes, hypertension, and cardiovascular disease: an update. Hypertension. 2001 Sep;38(3):E11.

43. Wilson PW, Meigs JB. Cardiometabolic risk: a Framingham perspective. Int J Obes (Lond). 2008 May;32 Suppl 2:S17-20.
44. Meigs JB, Larson MG, D'Agostino RB, Levy D, Clouse ME, Nathan DM, Wilson PW, O'Donnell CJ. Coronary artery calcification in type 2 diabetes and insulin resistance: the framingham offspring study. Diabetes Care. 2002 Aug;25(8):1313-9.
45. Zhi You Fang, MD, MHSc; Rebecca Schull-Meade, BN; Rodel Leano, BS; Philip M. Mottram, MBBS; Johannes B. Prins, MBBS, PhD; Tho. as H. Marwick, MBBS, PhD. Screening for Heart Disease in Diabetic Subjects . American heart journal posted 22(04/2005.
46. Bertoni AG, Tsai A, Kasper EK, Brancati FL. Diabetes and idiopathic cardiomyopathy: a nationwide case-control study. Diabetes Care. 2003 Oct;26(10):2791-5.
47. Panagia M, Schneider JE, Brown B, Cole MA, Clarke K. Abnormal function and glucose metabolism in the type-2 diabetic db/db mouse heart. Can J Physiol Pharmacol. 2007 Mar-Apr;85(3-4):289-94.
48. Randle PJ. Regulatory interactions between lipids and carbohydrates: the glucose fatty acid cycle after 35 years. Diabetes Metab Rev. 1998 Dec;14(4):263-83.
49. Chen V, Ianuzzo C, Fong B, et al. The effects of acute and chronic diabetes on myocardial metabolism in rats. Diabetes. 1984; 33: 1078–1084.
50. Martin E. Young,Patrick McNulty, Heinrich Taegtmeyer. Adaptation and Maladaptation of the Heart in Diabetes: Part II. Circulation. 2002;105:1861.
51. Luiken JJ, Arumugam Y, Bell RC, Calles-Escandon J, Tandon NN, Glatz JF, Bonen A. Changes in fatty acid transport and transporters are related to the severity of insulin deficiency. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2002 Sep;283(3):E612-21.
52. Glatz JF, Bonen A, Ouwens DM, Luiken JJ.Regulation of Sarcolemmal Transport of Substrates in the Healthy and Diseased Heart. Cardivasc Drugs Ther 2006(20):471-476.
53. Finck BN. The role of the peroxisome proliferator-activated receptor alpha pathway in pathological remodeling of the diabetic heart. Curr Opin Clin Nutr Metab Care. 2004 Jul;7(4):391-6.
54. Depre C, Shipley GL, Chen W, et al. Unloaded heart in vivo replicates fetal gene expression of cardiac hypertrophy. Nature Medicine. 1998; 4: 1269–1275.
55. Depre C, Young ME, Ying J, et al. Streptozotocin-induced changes in cardiac gene expression in the absence of severe contractile dysfunction. J Mol Cell Cardiol. 2000; 32: 985–996.
56. Dillmann W. Diabetes mellitus induces changes in cardiac myosin of the rat. Diabetes. 1980; 29: 579–582.
57. Entman ML, Goldstein MA, Schwartz A. The cardiac sarcoplasmic reticulum - glycogenolytic complex, an internal beta adrenergic receptor. Life Sci. 1976 Dec 1;19(11):1623–1630.
58. Weiss JN, Lamp ST. Glycolysis preferentially inhibits ATP-sensitive K+ channels in isolated guinea pig cardiac myocytes. Science. 1987 Oct 2;238(4823):67-9.
59. Belke DD, Swanson EA, Dillmann WH. Decreased sarcoplasmic reticulum activity and contractility in diabetic db/db mouse heart. Diabetes. 2004 Dec;53(12):3201-8.
60. Zhang L, Cannell MB, Phillips AR, Cooper GJ, Ward ML. Altered calcium homeostasis does not explain the contractile deficit of diabetic cardiomyopathy. Diabetes. 2008 Aug;57(8):2158-66. Epub 2008 May 20.
61. Galuska D, Nolte LA, Zierath JR, Wallberg-Henriksson H. Effect of metformin on insulin-stimulated glucose transport in isolated skeletal muscle obtained from patients with NIDDM. Diabetologia. 1994 Aug;37(8):826-32.
62. van der Meer RW, Rijzewijk LJ, de Jong HW, Lamb HJ, Lubberink M, Romijn JA, Bax JJ, de Roos A, Kamp O, Paulus WJ, Heine RJ, Lammertsma AA, Smit JW, Diamant M. Pioglitazone improves cardiac function and alters myocardial substrate metabolism without affecting cardiac triglyceride accumulation and high-energy phosphate metabolism in patients with well-controlled type 2 diabetes mellitus. Circulation. 2009 Apr 21;119(15):2069-77.
63. Blanchard EM, Smith GL, Allen DG, Alpert NR . The effects of 2,3-butanedione monoxime on initial heat, tension, and aequorin light output of ferret papillary muscles. 1990; Pflügers Arch: 416, 219-221.
64. Perreault CL, Mulieri LA, Alpert NR, Ransil BJ, Allen PD, Morgan JP (1992): Cellular basis of negative inotropic effect of 2,3-butanedione monoxime in human myocardium. 1992; Am J Physiol:263, H503-510.

65. Gwathmey JK, Hajjar RJ, Solaro RJ Contractile deactivation and uncoupling of crossbridges. Effects of 2,3-butanedione monoxime on mammalian myocardium. 1991; Circ Res 69, 1280-1292.
66. Fryer MW, Gage PW, Neering IR, Dulhunty AF, Lamb GD. Paralysis of skeletal muscle by butanedione monoxime, a chemical phosphatase.. 1988;Pflügers Arch 411, 76-79.
67. Phillips RM, Altschuld RA (1996): 2,3-Butanedione 2-monoxime (BDM) induces calcium release from canine cardiac sarcoplasmic reticulum. Biochem Biophys Res Commun 229, 154-157.
68. Mulieri LA, Hasenfuss G, Ittleman F, Blanchard EM. Protection of human left ventricular myocardium from cutting injury with 2,3-butanedione monoxime. 1989; Circ Res 65, 1441-1449.
69. Fagbemi OS, Brack K, Golar S, Crisp D, Economides A. Electrophysiological and biochemical changes in rabbit hearts stored at 4 degrees C for 6 or 24 h.2001;Clin Sci (Lond) 101, 367-376.
70. Koch-Weser J. Effect of rate changes on strength and time course of contraction of papillary muscle. 1963; Am J Physiol 204, 451-457.
71. Paradise NF, Schmitter JL, Surmitis JM. Criteria for adequate oxygenation of isometric kitten papillary muscle. 1981; Am J Physiol 241, H348-353.
72. Sasso FC, Carbonara O, Cozzolino D, Rambaldi P, Mansi L, Torella D, Gentile S, Turco S, Torella R, Salvatore T. Effects of insulin-glucose infusion on left ventricular function at rest and during dynamic exercise in healthy subjects and noninsulin dependent diabetic patients: a radionuclide ventriculographic study. J Am Coll Cardiol. 2000 Jul;36(1):219-26.
73. Jagasia D, Whiting JM, Concato J, Pfau S, McNulty PH. Effect of non-insulin-dependent diabetes mellitus on myocardial insulin responsiveness in patients with ischemic heart disease. Circulation. 2001 Apr 3;103(13):1734-9.
74. Lautamäki R, Airaksinen KE, Seppänen M, Toikka J, Härkönen R, Luotolahti M, Borra R, Sundell J, Knuuti J, Nuutila P. Insulin improves myocardial blood flow in patients with type 2 diabetes and coronary artery disease. Diabetes. 2006 Feb;55(2):511-6.
75. Yang YM, Zhu J, Tan HQ, Liang Y, Zhang Y, Li Y, Li JD, Liu LS; National Coordinator Office of CREATE in China. Effect of high dose glucose-insulin-potassium infusion in patients with acute ST-segment elevation myocardial infarction: analysis of 7510 patients in China as part of CREATE-ECLA study. Zhonghua Yi Xue Za Zhi. 2008 Jul 8;88(26):1806-10.
76. Bedetti G, Pizzi C, Gabrieli L, Varga A, Pasanisi E, Bugiardini R, Picano E. The beneficial effect of insulin, glucose, and dipyridamole on regional left ventricular function early after acute myocardial infarction. Int J Cardiol. 2005 Jul 10;102(2):255-8.
77. Nicolas-Robin A, Amour J, Ibanez-Esteve C, Coriat P, Riou B, Langeron O. Effect of glucose-insulin-potassium in severe acute heart failure after brain death. Crit Care Med. 2008 Oct;36(10):2740-5.
78. Ranasinghe AM, McCabe CJ, Quinn DW, James SR, Pagano D, Franklyn JA, Bonser RS. How does glucose insulin potassium improve hemodynamic performance? Evidence for altered expression of beta-adrenoreceptor and calcium handling genes. Circulation. 2006 Jul 4;114(1 Suppl):I239-44.
79. Hermann HP, Pieske B, Schwarzmüller E, Keul J, Just H, Hasenfuss G. Haemodynamic effects of intracoronary pyruvate in patients with congestive heart failure: an open study. Lancet. 1999 Apr 17;353(9161):1321-3.
80. Hasenfuss G, Maier LS, Hermann HP, Lüers C, Hünlich M, Zeitz O, Janssen PM, Pieske B. Influence of pyruvate on contractile performance and Ca(2+) cycling in isolated failing human myocardium. Circulation. 2002 Jan 15;105(2):140-2.
81. Panagia M, Schneider JE, Brown B, Cole MA, Clarke K. Abnormal function and glucose metabolism in the type-2 diabetic db/db mouse heart. Can J Physiol Pharmacol. 2007 Mar-Apr;85(3-4):289-94.
82. Kolter T, Uphues I, Eckel J: Molecular analysis of insulin resistance in isolated ventricular cardiomyocytes of obese Zucker rats. Am J Physiol 273:E59-67, 1997.
83. Huggins CE, Domenighetti AA, Ritchie ME, Khalil N, Favaloro JM, Proietto J, Smyth GK, Pepe S, Delbridge LM. Functional and metabolic remodelling in GLUT4-deficient hearts confers hy per-responsiveness to substrate intervention. J Mol Cell Cardiol. 2008 Feb;44(2):270-80. Epub 2007 Dec 8.
84. Razeghi P, Young ME, Alcorn JL, Moravec CS, Frazier OH, Taegtmeyer H. Metabolic gene expression in fetal and failing human heart. Circulation. 2001 Dec 11;104(24):2923-31.

85. Dyer J, Wood IS, Palejwala A, Ellis A, Shirazi-Beechey SP: Expression of monosaccharide transporters in intestine of diabetic humans. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 282:G241-248, 2002.
86. Vidotti DB, Arnoni CP, Maquigussa E, Boim MA: Effect of long-term type 1 diabetes on renal sodium and water transporters in rats. Am J Nephrol 28:107-114, 2008.
87. Boudina S, Bugger H, Sena S, O'Neill BT, ZAHA VG; Ilkun O, Weight JJ, Mazumder PK, Palfreyman E, Tidwell TJ, Theobald H, Khalimonchuk O, Wament B, Sheng X, Rodnick KJ, Centini R, Chen D, Litwin SE, Weimer BE; Abel ED. Contribution of impaired myocardial insulin signaling to mitochondrial dysfunction and oxidative stress in the heart. Circulation. 2009 Mar 10;119(9):1272-83.
88. Sena S, Hu P, Zhang D, Wang X, Wayment B, Olsen C, Avelar E, Abel ED, Litwin SE. Impaired insulin signaling accelerates cardiac mitochondrial dysfunction after myocardial infarction. J Mol Cell Cardiol. 2009 Jun;46(6):910-8.
89. Im SS, Kwon SK, Kim TH, Kim HI, Ahn YH. Regulation of glucose transporter type 4 isoform gene expression in muscle and adipocytes.IUBMB Life. 2007 mar;59(3):134-45.Review.
90. Krämer DK, Al-Khalili L, Perrini S, Skogsberg J, Wretenberg P, Kannisto K, Wallberg-Henriksson H, Ehrenborg E, Zierath JR, Krook A. Direct activation of glucose transport in primary human myotubes after activation of peroxisome proliferator-activated receptor delta. Diabetes. 2005 Apr;54(4):1157-63.
91. Im SS, Kwon SK, Kang SY, Kim TH, Kim HI, Hur MW, Kim KS, Ahn YH. Regulation of GLUT4 gene expression by SREBP-1c in adipocytes. Biochem J. 2006 Oct 1;399(1):131-9.
92. Byrne MJ, Power JM, Preovolos A, Mariani JA, Hajjar RJ, Kaye DM. Recirculating cardiac delivery of AAV2/1SERCA2a 1SERCA2a improves myocardial function in an experimental model of heart failure in large animals. Gene Ther. 2008 Dec;15(23):1550-7.

# 6 Tabellenanhang

| Pat. | Messung | | Trabekel | | | | Allgemeine Angaben | | | | | Operation | | | Medikamente | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Nr. | Tyrode | DM | Ko | EMD | Latr. | Wort. | Phlor. | Alter | W | M | EF % | SR | nSR | CABG | CABG/KE | AKE | MKE | DIG | DIU | BB | AAR | Aldo | Stat. | ACE |
| 1 | Gluk | 0 | 1 | | 1 | | 1 | 74 | | 1 | 25 | 1 | | 1 | | | | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| 2 | Gluk | 0 | 3 | | 2 | | 1 | 80 | 1 | | 40 | 1 | | | | 1 | | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| 3 | Gluk | 0 | 1 | | 1 | | 1 | 65 | 1 | | 55 | 1 | | | | 1 | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 4 | Gluk | 0 | 1 | | 1 | 2 | | 53 | | 1 | 60 | 1 | | | | | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 5 | Gluk | 0 | 1 | | | | | 79 | 1 | | 71 | 1 | | | | 1 | | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 6 | Gluk | 0 | 1 | | 1 | | 1 | 84 | 1 | | 45 | 1 | | | | 1 | | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 7 | Gluk | 0 | 1 | | 1 | | 1 | 80 | | 1 | 60 | 1 | | 1 | | | | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 8 | Gluk | 0 | 1 | | 1 | 1 | | 74 | | 1 | 65 | 1 | | 1 | | | | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 9 | Gluk | 0 | 1 | | | 2 | 2 | 56 | 1 | | 60 | 1 | | 1 | | | | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 10 | Gluk | 0 | 1 | | 1 | 1 | | 68 | | 1 | 14 | 1 | | | | 1 | | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 11 | Gluk | 0 | 1 | | 1 | 1 | | 74 | 1 | | 60 | 1 | | 1 | | | | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| 12 | Gluk | 0 | 1 | | 1 | 1 | | 63 | | 1 | 65 | 1 | | 1 | | | | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 13 | Gluk | 0 | 1 | 2 | | | | 79 | | 1 | 35 | 1 | | 1 | | | | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 14 | Gluk | 0 | 1 | 6 | | | | 63 | | 1 | 40 | 1 | | | | 1 | | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| 15 | Gluk | 0 | 1 | 2 | | 1 | | 68 | | 1 | 45 | 1 | | | | 1 | | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| 16 | Gluk | 0 | 1 | 1 | | | | 70 | | 1 | 40 | 1 | | | 1 | | | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| 17 | Gluk | 0 | 1 | 1 | | 3 | | 68 | 1 | | 75 | 1 | | 1 | | | | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| 18 | Gluk | 0 | 1 | 1 | | 1 | | 63 | 1 | | 75 | 1 | | | 1 | | | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 19 | Gluk | 0 | 1 | 1 | | | | 82 | 1 | | 65 | 1 | | | 1 | | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 20 | Gluk | 0 | 1 | | 1 | | 1 | 63 | | 1 | 50 | 1 | | | 1 | | | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 |
| 21 | Gluk | 0 | 1 | | 1 | | 1 | 74 | | 1 | 60 | 1 | | | | 1 | | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 22 | Gluk | 0 | 2 | | 1 | 1 | | 71 | | 1 | 60 | 1 | | | 1 | | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 23 | Gluk | 0 | 1 | | 1 | 1 | | 67 | | 1 | 60 | 1 | | 1 | | | | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 24 | Gluk | 1 | 1 | 1 | 2 | | 1 | 61 | | 1 | 65 | 1 | | 1 | | | | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| 25 | Gluk | 1 | 1 | 1 | 1 | | 1 | 84 | 1 | | 55 | 1 | | | | 1 | | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 26 | Gluk | 1 | 1 | 1 | | 3 | 1 | 82 | | 1 | 63 | 1 | | 1 | | | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 27 | Gluk | 1 | 1 | 1 | | | 1 | 73 | | 1 | 60 | 1 | | 1 | | | | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 28 | Gluk | 1 | 1 | 1 | | | 1 | 68 | | 1 | 60 | 1 | | | | 1 | | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| 29 | Gluk | 1 | 1 | 1 | | 2 | 1 | 69 | | 1 | 65 | 1 | | 1 | | | | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| 30 | Gluk | 1 | 1 | 1 | | 1 | 1 | 79 | | 1 | 60 | | SM | 1 | | | | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 31 | Gluk | 1 | 1 | 1 | | 1 | 1 | 66 | | 1 | 73 | 1 | | 1 | | | | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 32 | Gluk | 1 | 1 | 1 | | 1 | 1 | 70 | | 1 | 60 | 1 | | 1 | | | | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| 33 | Gluk | 1 | 1 | 1 | | 2 | 3 | 85 | 1 | | 50 | | LSB | 1 | | | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| 34 | Gluk | 1 | 1 | 1 | | 1 | | 72 | | 1 | 30 | 1 | | 1 | | | | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| 35 | Gluk | 1 | 1 | 2 | 1 | 1 | | 58 | 1 | | 50 | 1 | | 1 | | | | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 |

| Pat. | Messung | | Trabekel | | | | | Allgemeine Angaben | | | | | | Operation | | | | Medikamente | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Nr. | Tyrode | DM | Ko | EMD | Latr. | Wort. | Phlor. | Alter | W | M | EF % | SR | nSR | CABG | CABG/KE | AKE | MKE | DIG | DIU | BB | AAR | Aldo | Stat. | ACE |
| 36 | Gluk | 1 | 1 | 1 | 2 | | 1 | 62 | 1 | | 60 | 1 | | | | 1 | | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| 37 | Gluk | 1 | 1 | | | 1 | | 61 | 1 | | 60 | 1 | | 1 | | | | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| 38 | Pyr | 0 | 1 | 2 | 1 | 2 | | 46 | | 1 | 55 | 1 | | | | 1 | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 39 | Pyr | 0 | 1 | 1 | 1 | | | 67 | | 1 | 45 | 1 | | | | 1 | | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| 40 | Pyr | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | | 65 | | 1 | 70 | | SB | 1 | | | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| 41 | Pyr | 0 | 4 | 1 | 1 | 1 | | 71 | 1 | | 45 | 1 | | | 1 | | | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 42 | Pyr | 0 | 1 | 1 | | 1 | | 76 | 1 | | 80 | 1 | | | | 1 | | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 43 | Pyr | 0 | 1 | 1 | | 1 | | 65 | | 1 | 68 | 1 | | 1 | | | | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| 44 | Pyr | 0 | 1 | | 1 | | | 63 | | 1 | 64 | 1 | | 1 | | | | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| 45 | Pyr | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | | 62 | | 1 | 80 | 1 | | 1 | | | | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 46 | Pyr | 0 | 1 | 2 | 1 | 1 | | 70 | | 1 | 64 | 1 | | | | 1 | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 47 | Pyr | 0 | 1 | 1 | | 1 | | 80 | | 1 | 55 | | VHF | 1 | | | | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 48 | Pyr | 0 | 1 | 1 | 2 | 2 | | 68 | 1 | | 70 | 1 | | | | | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| 49 | Pyr | 1 | 2 | 2 | 2 | 2 | | 79 | | 1 | 60 | 1 | | | 1 | | | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| 50 | Pyr | 1 | 1 | | | | | 62 | | 1 | 60 | 1 | | 1 | | | | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| 51 | Pyr | 1 | 1 | 1 | | | | 56 | | 1 | 65 | 1 | | | | 1 | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 52 | Pyr | 1 | 1 | 1 | 1 | | | 73 | | 1 | 71 | 1 | | 1 | | | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 53 | Pyr | 1 | 1 | 1 | | 1 | | 66 | | 1 | 46 | 1 | | 1 | | | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| 54 | Pyr | 1 | 1 | | | | | 82 | 1 | | 55 | 1 | | | | 1 | | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 55 | Pyr | 1 | 1 | | 1 | 1 | | 69 | | 1 | 60 | 1 | | 1 | | | | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| 56 | Pyr | 1 | 2 | 2 | 2 | 2 | | 66 | | 1 | 60 | | VHF | | | 1 | | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 57 | Pyr | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | | 66 | | 1 | 50 | 1 | | 1 | | | | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| 58 | Pyr | 1 | 1 | | 0 | 1 | | 67 | | 1 | 60 | 1 | | 1 | | | | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 59 | Pyr | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | | 72 | | 1 | 30 | 1 | | 1 | | | | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 60 | Glu/Pal | 0 | 1 | | | | | 77 | | 1 | 60 | 1 | | 1 | 1 | | | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 61 | Glu/Pal | 0 | 1 | | | | | 80 | 1 | | 55 | 1 | | 1 | | | | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| 62 | Glu/Pal | 0 | 2 | | | | | 68 | | 1 | 70 | 1 | | | | 1 | | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 63 | Glu/Pal | 1 | 1 | | | | | 65 | | 1 | 50 | 1 | | 1 | | | | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| 64 | Glu/Pal | 0 | 1 | | | | | 52 | | 1 | 60 | 1 | | | | 1 | | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 65 | Glu/Pal | 0 | 1 | | | | | 62 | 1 | | 30 | 1 | | 1 | | | | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 66 | Glu/Pal | 0 | 3 | | | | | 45 | | 1 | 60 | 1 | | 1 | | | | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 67 | Glu/Pal | 0 | 1 | | | | | 67 | | 1 | 55 | 1 | | 1 | | | | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 |

| Pat. | Messung | | Trabekel | | | | | Allgemeine Angaben | | | | | | Operation | | | | Medikamente | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Nr. | Tyrode | DM | Ko | EMD | Latr. | Wort. | Metf. | Alter | W | M | EF % | SR | nSR | CABG | CABG/KE | AKE | MKE | DIG | DIU | BB | AAR | Aldo | Stat. | ACE |
| 68 | Gluk | 0 | 1 | | | | 2 | 77 | 1 | | 55 | 1 | | | | 1 | | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| 69 | Gluk | 0 | 1 | | | | 2 | 61 | | 1 | 60 | 1 | | 1 | | | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 70 | Gluk | 0 | 1 | | | | 2 | 35 | | 1 | 60 | 1 | | 1 | | | | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | |
| 71 | Gluk | 0 | 1 | | | | 2 | 51 | 1 | | 70 | 1 | | | | 1 | | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 |

# Lebenslauf

**Persönliche Daten:**

| | |
|---|---|
| Name: | Marie-Sophie Huber |
| Geburtsdatum: | 15.Jänner 1985 |
| Geburtsort: | Graz |
| Staatsbürgerschaft: | Österreich |
| Familienstatus: | ledig |
| Wohnort: | Rechbauerstraße 44/1/8<br>A-8010 Graz |
| Eltern: | DI Huber Franz († 2007)<br>DI Huber Martha, Geschäftsführerin der Fa. J. Dengg GmBH |

**Ausbildung:**

| | |
|---|---|
| 1991/92– 1994/95 | Volksschule Graz-Straßgang |
| 1995/96 – 1998/99 | BG/BRG Oeverseegasse, Graz |
| 1999/00 – 2003/04 | Höhere technische Bundeslehranstalt Ortweingasse, Graz<br>Abteilung für Hochbau; Abgeschlossen mit Matura im Juni 2004. |
| seit Oktober 2004 | Studium der Humanmedizin an der<br>Medizinischen Universität Graz |
| Famulaturerfahrungen : | Kinderchirurgie (Med. Universität Graz)<br>Radiologie (Med. Universität Graz)<br>Innere Medizin (Med. Universität Graz)<br>Innere Medizin (Charité Berlin)<br>Pädiatrie (Fairview Hospital, Minneapolis)<br>Neurolgie (Med.Universität Graz)<br>Allgemeinmedizin (Cuidad Valles, Mexiko) |