

Diplomarbeit

**Unmittelbare Effekte von Polyaminen
auf humanes kardiales Gewebe**

eingereicht von

Stefan Kapeller

zur Erlangung des akademischen Grades

**Doktor(in) der gesamten Heilkunde
(Dr. med. univ.)**

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt an der

Klinische Abteilung für Kardiologie

unter der Anleitung von

Assoz. Prof. PD Dr. Dirk von Lewinski

und

Assoz.- Prof. Dipl. -Biol. Dr. rer. Nat. Simon Sedej

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 09. März 2017

Stefan Kapeller eh.

Danksagungen

Für die Erstellung dieser Arbeit war viel Geduld, Zeit und Energie nötig. An dieser Stelle möchte ich mich bei jenen Personen bedanken, die mich beim Erstellen der Arbeit unterstützten und mit fachlichen Ratschlägen zur Seite standen. Ohne diese hätte ich das Thema nicht so ausführlich in der Zeit behandeln können. Ein großer Dank gilt meinen Betreuern Assoz. Prof. PD Dr. Dirk von Lewinski und Ass.- Prof. Priv.- Doz. Dr. rer. Nat. Simon Sedej, an denen ich mich bei Fragen wenden konnte und die es mir möglich machten einen Einblick in die Forschungsarbeit zu erlangen. Weiters gilt mein Dank Dr. Ewald Kolesnik, der mich nicht nur in die Laborarbeit einführte, sondern auch bei Fragen und Problemen stets geduldig zur Stelle war und mich bei kleinen Rückschlägen immer wieder aufs Neue motivieren konnte. Auch bei allen im Labor tätigen Personen, Dr. Mounir Khafaga, Thomas Krainer und Natasa Dalinac möchte ich mich für die reibungslose Zusammenarbeit bedanken. Zusätzlich möchte ich mich bei der klinischen Abteilung der Herzchirurgie für die gute Zusammenarbeit bedanken. Zuletzt gilt mein Dank den PatientInnen, die sich bereit erklärten ein Stück ihres Herzens für diese Forschung zur Verfügung zu stellen.

Abschließend möchte ich mich noch bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken. Einen besonderen Dank möchte ich an dieser Stelle meinen Eltern aussprechen, die mich während der gesamten Studienzeit stets unterstützten.

Inhaltsverzeichnis

Danksagungen	II
Inhaltsverzeichnis	III
Abkürzungsverzeichnis	V
Abbildungsverzeichnis.....	VIII
Tabellenverzeichnis.....	X
Zusammenfassung	11
Abstract	12
1 Einleitung.....	13
1.1 Substanzgruppe Polyamine	13
1.1.1 Struktur	13
1.1.2 Synthese und Metabolismus.....	14
1.1.3 Transport	16
1.1.4 Funktion.....	17
1.2 Einfluss der Polyamine auf Ca ²⁺ Kanäle und Homöostase	20
1.3 Kardiale Physiologie.....	21
1.3.1 Physiologie des Aktionspotentials.....	21
1.3.2 Mechanische Kontraktion und Inotropie.....	22
1.4 Beeinflussung der Ca ²⁺ Homöostase durch die PI3K Signaltransduktionskaskade	23
1.5 Funktion der Polyamine im kardiovaskulären System.....	24
1.6 Fragestellung und Ziele.....	25
2 Material und Methoden	26
2.1 Materialien.....	26
2.1.1 Atriales Gewebe	26
2.1.2 Ventrikuläres Gewebe	27
2.1.3 Pufferlösungen.....	28
2.1.4 Substanzen.....	28
2.1.5 Streifenanlage.....	29
2.2 Methoden	31
2.2.1 Vorbereitung	31
2.2.2 Dosis- Wirkungskurve.....	32

2.2.3	Inhibitorversuche	32
2.3	Auswertung und Statistik.....	33
3	Ergebnisse	34
3.1	Systolische Kraft und diastolische Spannung.....	34
3.2	Inotrope Effekte.....	35
3.3	Atrium- Kontrolle (NaCl)	36
3.4	Atrium- Spermidin.....	37
3.5	Atrium- Spermin	39
3.6	Atrium- Putrescin.....	40
3.7	Ventrikel- Spermidin.....	41
3.8	Inhibitoren	42
4	Diskussion	46
4.1	Kalzium- abhängige Signalkaskaden als möglicher Angriffspunkt	46
4.2	Polyaminwirkung auf den PI3K Signalweg	48
4.3	Limitationen der Arbeit	50
4.4	Ausblick.....	52
5	Literaturverzeichnis	53

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
♀	weiblich
♂	männlich
AC	Adenylatcyclase
ACE	angiotensin- converting- enzyme (engl.)
AdoMetDC	Adenosylmethionindecaboxylase
AKE	Aortenklappenersatz
AMP	Adenosinmonophosphat
ASS	Acetylsalicylsäure
AT-II	Angiotensin-II
ATP	Adenosintriphosphat
β-AR	beta- Arrestin
BDM	2-3 Butandion- monoxim
BL	Baseline (engl.)
BMI	body- mass- index (engl.)
bzw.	beziehungsweise
Ca ²⁺	Kalzium- Ion
CABG	coronary artery bypass graft (engl.), koronararterielle Bypassoperation
CaCaM	Ca ²⁺ - Calmodulin- Komplex
CaCl ₂ -2H ₂ O	Kalziumchlorid
CaM	Calmodulin
CaMKII	Calmodulinkinase II
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CaR	calciumsensitiver Rezeptor
Cav. 1	Caveolin 1
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CMP	Kardiomyopathie
CO ₂	Kohlendioxid
DFMO	Difluormethyl- Ornithin
DNA	Desoxyribonukleinsäure

<i>g</i>	<i>Gramm</i>
<i>GPCR</i>	<i>G- Protein gekoppelter Rezeptor</i>
<i>H₂O₂</i>	<i>Wasserstoffperoxid</i>
<i>HCl</i>	<i>Salzsäure</i>
<i>HCN</i>	<i>hyperpolarization- activated cyclic nucleotide-gated (engl.)</i>
<i>Hz</i>	<i>Hertz</i>
<i>I.E.</i>	<i>Internationale Einheiten</i>
<i>IP3</i>	<i>Inositol (1,4,5) - Triphosphat</i>
<i>K⁺</i>	<i>Kalium- Ion</i>
<i>KCl</i>	<i>Kaliumchlorid</i>
<i>kg</i>	<i>Kilogramm</i>
<i>KH₂PO₄</i>	<i>Kaliumdihydrogenphosphat</i>
<i>Kir</i>	<i>einwärtsgerichteter Kaliumkanal</i>
<i>L</i>	<i>Liter</i>
<i>LD₅₀</i>	<i>Letale Dosis von 50% der Probanden</i>
<i>LPS</i>	<i>Lipopolysaccharid</i>
<i>LVEF</i>	<i>linksventrikuläre Ejektionsfraktion</i>
<i>M</i>	<i>Molar</i>
<i>mg</i>	<i>Milligramm</i>
<i>MgSO₄-7H₂O</i>	<i>Magnesiumsulfat</i>
<i>min</i>	<i>Minuten</i>
<i>mL</i>	<i>Milliliter</i>
<i>μM</i>	<i>Mikromolar</i>
<i>mm</i>	<i>Millimeter</i>
<i>mM</i>	<i>Millimolar</i>
<i>mm²</i>	<i>Quadratmillimeter</i>
<i>mN</i>	<i>Millinewton</i>
<i>mV</i>	<i>Millivolt</i>
<i>n.s.</i>	<i>nicht signifikant</i>
<i>Na⁺</i>	<i>Natrium- Ion</i>
<i>Na⁺/K⁺- ATPase</i>	<i>Natrium- Kalium- ATPase</i>
<i>NaCl</i>	<i>Natriumchlorid</i>
<i>NaHCO₃</i>	<i>Natriumhydrogenkarbonat</i>

<i>NCX</i>	<i>Natrium- Kalzium Austausch</i>
<i>nM</i>	<i>Nanomolar</i>
<i>NMDA</i>	<i>N- methyl- D- Aspartat</i>
<i>NO</i>	<i>Stickstoffmonoxid</i>
<i>O₂</i>	<i>Sauerstoff</i>
<i>ODC</i>	<i>Ornithindecaboxylase</i>
<i>PAO</i>	<i>Polyaminoxidase</i>
<i>PDE-4</i>	<i>Phosphodiesterase-4</i>
<i>PI3K</i>	<i>Phosphoinositid- 3- Kinase</i>
<i>PKA</i>	<i>Proteinkinase A</i>
<i>PLN</i>	<i>Phospholamban</i>
<i>Put</i>	<i>Putrescin</i>
<i>RNA</i>	<i>Ribonukleinsäure</i>
<i>Rya</i>	<i>Ryanodin</i>
<i>RyR</i>	<i>Ryanodin- Rezeptor</i>
<i>SEM</i>	<i>standard error of the mean (engl.), Standardfehler</i>
<i>SERCA</i>	<i>sarco/endoplasmatic Ca²⁺- ATPase (engl.)</i>
<i>SM</i>	<i>Schrittmacher</i>
<i>SP</i>	<i>Speicherpunkt</i>
<i>Spd</i>	<i>Spermidin</i>
<i>SR</i>	<i>sarkoplasmatisches Retikulum</i>
<i>SSAT</i>	<i>Spermin/ Spermidin- N1- Acetyltransferase</i>
<i>TNFα</i>	<i>Tumornekrosefaktor alpha</i>
<i>vgCaCH</i>	<i>spannungsabhängiger Kalzium- Kanal</i>
<i>VHFA</i>	<i>Vorhofflimmerarrhythmie</i>

Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 1:</i>	S.13
<i>Schematische Darstellung des chemischen Verhaltens von Polyaminen in wässriger Lösung bei physiologischen pH-Verhältnissen</i>	
<i>Abbildung 2:</i>	S.15
<i>Synthese der Polyamine in eukaryotischen Zellen</i>	
<i>Abbildung 3:</i>	S.15
<i>Strukturformeln der Polyamine Putrescin, Spermidin und Spermin</i>	
<i>Abbildung 4:</i>	S.16
<i>Schematische Darstellung der Aufnahme von Polyaminen im Mäusedarm</i>	
<i>Abbildung 5:</i>	S.24
<i>Schematische Darstellung der PI3K Signaltransduktionskaskade und Beeinflussung durch die Inhibitoren A66 und LY294002</i>	
<i>Abbildung 6:</i>	S. 30
<i>Aufbau der Messanlage</i>	
<i>Abbildung 7:</i>	S. 32
<i>Versuchsprotokoll der Dosis Wirkungskurven</i>	
<i>Abbildung 8:</i>	S. 33
<i>Versuchsprotokoll der Inhibitorversuche</i>	
<i>Abbildung 9:</i>	S. 34
<i>Auszug einer Originalregistrierung einer Dosiswirkungskurve mit NaCl und Beschreibung der kinetischen Parameter</i>	
<i>Abbildung 10:</i>	S. 35
<i>Originalregistrierung eines Rundown- Experimentes</i>	

<i>Abbildung 11:</i> <i>Originalregistrierung eines Inhibitorexperimentes</i>	S.35
<i>Abbildung 12:</i> <i>Dosis Wirkungskurve der Kontrollsubstanz NaCl an humanen atrialem Myokard</i>	S.36
<i>Abbildung 13:</i> <i>Inotrope Effekte von Spermidin auf humanes atriales Myokard</i>	S. 37
<i>Abbildung 14:</i> <i>Proarrhythmogener Effekt von Spermidin auf humanes atriales Myokard</i>	S. 38
<i>Abbildung 15:</i> <i>Inotrope Effekte von Spermin auf humanes atriales Myokard</i>	S. 39
<i>Abbildung 16:</i> <i>Inotrope Effekte von Putrescin auf humanes atriales Myokard</i>	S. 40
<i>Abbildung 17:</i> <i>Inotrope Effekte von Spermidin auf humanes ventrikuläres Myokard</i>	S. 41
<i>Abbildung 18:</i> <i>Inotrope Effekte der Inhibitoren Ryanodin, A66 und LY294002 auf humanes atriales Myokard</i>	S. 43
<i>Abbildung 19:</i> <i>Inotrope Effekte von Spermidin auf mit Inhibitoren vorbehandelte Muskelstreifen von humanem atrialen Myokard</i>	S. 44
<i>Abbildung 20:</i> <i>Beeinflussung Spermidin- induzierter Arrhythmien durch Inhibitor- präinkubierte Muskelstreifen im humanen atrialen Myokard</i>	S. 45

Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1:</i>	S.27
<i>PatientInnen Daten der gemessenen atrialen Muskelstreifen</i>	
<i>Tabelle 2:</i>	S.28
<i>Zusammensetzung der verwendeten Pufferlösungen</i>	

Zusammenfassung

Polyamine stellen eine Substanzgruppe dar, die auf Grund der endogenen Synthese in allen eukaryoten Zellen vorhanden sind, aber auch über die Nahrung vermehrt zugeführt werden können. Aufgrund rezenter Entdeckungen im Bereich des Alterungsprozesses von Zellen, rückten polyaminassoziierte Effekte auf verschiedene Organsystem, darunter auch des kardiovaskulären Systems, in den Fokus der Forschung. Da der Großteil der bisherigen Studien an Mäusen oder Ratten durchgeführt wurde, wurden in dieser Arbeit mögliche Effekte auf humanes kardiales Gewebe untersucht. Es wurden elektrisch stimulierte atriale und ventrikuläre humane Muskelstreifen mit den Polyaminen Spermidin, Spermin und Putrescin inkubiert und potentielle Änderungen in der entwickelten Kraft gemessen. Für die Polyamine Spermidin und Spermin konnten negativ inotrope Effekte ab einer Konzentration von jeweils 1mM in atrialem Gewebe verzeichnet werden. Zusätzlich kam es bei zwei von 17 gemessenen atrialen Muskelstreifen ab einer Konzentration von 100 μ M Spermidin zum Auftreten von Arrhythmien. Interessanterweise fanden sich diese arrhythmogenen und negativ inotropen Effekte nur in atrialem nicht aber in ventrikulärem Gewebe. In einem zweiten Versuchsansatz galt es die zu Grunde liegenden Mechanismen dieser Effekte aufzudecken. Da zahlreiche Studien eine Beeinflussung der intrazellulären Kalzium Homöostase durch Polyamine nachwiesen, wurden Inhibitoren verwendet, die verschiedene Kalzium Signaltransduktionskaskaden hemmten. Nach Inkubation mit dem Ryanodin-Rezeptor Agonist Ryanodin bzw. den Phosphoinositid- 3- Kinase (PI3K) Inhibitoren A66 und LY294002 wurden atriale Muskelstreifen mit 1mM Spermidin behandelt. Dabei zeigte sich eine Abschwächung des negativ inotropen Effekts von Spermidin in Ryanodin vorbehandelten Muskelstreifen im Vergleich zur Kontrolle. Die PI3K Inhibitoren zeigte keine Beeinflussung des Spermidin- induzierten negativ inotropen Effekts, jedoch fanden sich in diesen Muskelstreifen weniger Arrhythmien als in der Kontrolle. Die Ergebnisse dieser Arbeit legen eine Interaktion von Spermidin mit dem Ryanodin- Rezeptor nahe. Auf Grund der vielfältigen Beeinflussung anderer Kalzium-vermittelter Prozesse, die in anderen Studien gezeigt wurde, lässt sich jedoch keine exakte Aussage über das Zustandekommen der Effekte treffen. Dazu sind Experimente mit sensitiveren Methoden notwendig.

Abstract

Polyamines are natural compounds, which are either endogenously synthesised or exogenously derived via diet. As these substances are present in every eukaryotic cell, multiple studies were conducted using animal models (mice or rats) with the aim to investigate the different effects of polyamines on different organ systems, including the cardiovascular system. In this study, we aimed to test acute effects of polyamines in human cardiac tissue. For this purpose, electrically stimulated atrial and ventricular muscle strips (trabeculae) were treated with the polyamines spermidine, spermine and putrescine in a dose- dependent manner and developed force and diastolic tension were measured. The polyamines spermidine and spermine (both 1 mM) exerted a negative inotropic effect in atrial tissue. Furthermore, 100 μ M spermidine caused arrhythmic events in two out of 17 tested muscle strips. The negative inotropic and proarrhythmic effects occurred only in atrial but not in ventricular tissue. To elucidate the underlying mechanisms inhibitors of the ryanodine receptor (ryanodine) and the phosphoinositide 3- kinase (PI3K; A66 and LY294002) were used to block intracellular calcium- related signalling pathways before administration of a single dose of 1mM spermidine. Spermidine-induced negative inotropic effect was attenuated in ryanodine-pretreated trabeculae, whereas this effect remained unchanged in muscle strips pretreated with the PI3K inhibitors. These results suggest a possible interaction between spermidine and the ryanodine receptor. Interestingly, less arrhythmic events occurred in the muscle strips pretreated with PI3K inhibitors. Although the exact mechanism underlying the effects of spermidine on human atrial tissue could not be elucidated, our results point out that acute treatment with high dose of polyamines is associated with disturbances in intracellular calcium homeostasis.

1 Einleitung

1.1 Substanzgruppe Polyamine

1.1.1 Struktur

Als Polyamine werden organische Verbindungen mit zwei oder mehreren primären Aminogruppen bezeichnet. Zu den bekanntesten Vertretern gehören Spermidin, Spermin und Putrescin. Diese Polyamine liegen bei einem physiologischen pH- Wert von 7,4 in wässriger Lösung als Polykationen vor (Abb.1). Die hohe Anzahl an positiven Ladungen ist wichtig für die zelluläre Funktion wie beispielsweise für die Bindung an anionische Komponenten der Zellmembran. Polyamine sind im menschlichen Körper in unterschiedlicher Konzentration im mikromolaren Bereich in allen Zellen vorhanden¹⁻³. Daneben gibt es interindividuell eine hohe Schwankungsbreite der Polyaminkonzentrationen vor allem im Blut. Ein möglicher Grund dafür dürfte die Ernährung sein. Es zeigte sich, dass bei Langzeiteinnahme von Nahrung hoher Polyaminkonzentrationen wie etwa Sojabohnen auch die Polyaminkonzentration im Blut ansteigt. Darüber hinaus dürfte auch die Zusammensetzung der Darmflora eine Rolle spielen, da einige Bakterien zur Synthese von Polyaminen befähigt sind. Bei geringer Zufuhr an Polyaminen über die Nahrung sowie die Einnahme von Antibiotika, welche auch die natürliche Darmflora angreifen, konnte eine Verminderung der Polyaminkonzentrationen im Blut gezeigt werden. Neben der exogenen Zufuhr über die Nahrung und der Polyaminsynthese durch Darmbakterien besteht auch noch die Möglichkeit der endogenen Polyaminsynthese über die Körperzellen selbst und deren Transport zwischen den Kompartimenten^{1,4,5}

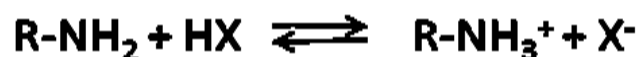


Abb. 1: Schematische Darstellung des chemischen Verhaltens von Polyaminen in wässriger Lösung bei physiologischen pH- Verhältnissen. Die Aminogruppe ist funktionell eine Brönsted- Base.

1.1.2 Synthese und Metabolismus

Neben dem Vorhandensein von Polyaminen in allen humanen Zellen sind sämtliche Zellen zur eigenständigen Biosynthese befähigt. Diese läuft dabei nach einem einheitlichen Synthesepfad ab (Abb.2):

Als Ausgangssubstrat dient die Aminosäure Arginin. Arginin wird über Abspaltung von Harnstoff durch das Enzym Arginase zu Ornithin umgewandelt. Ornithin wiederum wird unter Abspaltung von Kohlendioxid durch das Enzym Ornithindecaboxylase (ODC) zum Polyamin Putrescin umgewandelt. Durch das Enzym Spermidinsynthase wird Putrescin unter Übertragung eines Propylaminrests in Spermidin umgewandelt. Das benötigte Propylamin wird von einem zweiten Syntheseprozess bezogen: Ausgehend von S- Adenosylmethionin wird über die Adenosylmethionindecaboxylase (AdoMetDC) decarboxyliertes S- Adenosylmethionin hergestellt. Von dieser Substanz wird Propylamin abgespalten und von der Spermidinsynthase zur Synthese von Spermidin herangezogen. Analog dazu wird über die Sperminsynthase Propylamin zur Herstellung von Spermin aus Spermidin verwendet. Sowohl Spermin als auch Spermidin können über eine Zwischenstufe in Spermidin bzw. Putrescin rücküberführt werden. Dabei wird jeweils über das Enzym Spermin/ Spermidin- N1- Acetyltransferase (SSAT) ein Acetylrest von Acetyl Coenzym A übertragen. Auf diese Weise wird Spermin zu N-Acetylspermin und Spermidin zu N-Acetylspermidin umgewandelt⁶. Die Polyaminoxidase kann anschließend N-Acetylspermin zu Spermidin und N-Acetylspermidin zu Putrescin oxidieren. Daneben kann Spermin direkt über die Sperminoxidase in Spermidin rücküberführt werden. Es sei erwähnt, dass der Großteil der an der Synthese beteiligten Enzyme induzierbar ist, während beispielsweise die Polyaminoxidase ständig aktiv ist ^{4,7,8}. Eine erhöhte Aktivität des Enzyms SSAT kann beispielsweise durch Stress, hohe Polyaminkonzentrationen und inflammatorische Signale induziert werden. Diese Abbauvorgänge dienen nicht nur der Regulation der Polyaminkonzentration in der Zelle, sondern führen auch zur Produktion von H₂O₂ und Acrolein^{7,9}.

Für die Synthese am bedeutendsten sind die Enzyme ODC und AdoMetDC, da diese den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Synthese darstellen und am besten reguliert werden. Die Aktivität dieser Enzyme und auch die Polyaminkonzentration in den Zellen nehmen mit dem Alter ab, während die Blutpolyaminkonzentration annähernd gleich bleibt^{4,5}.

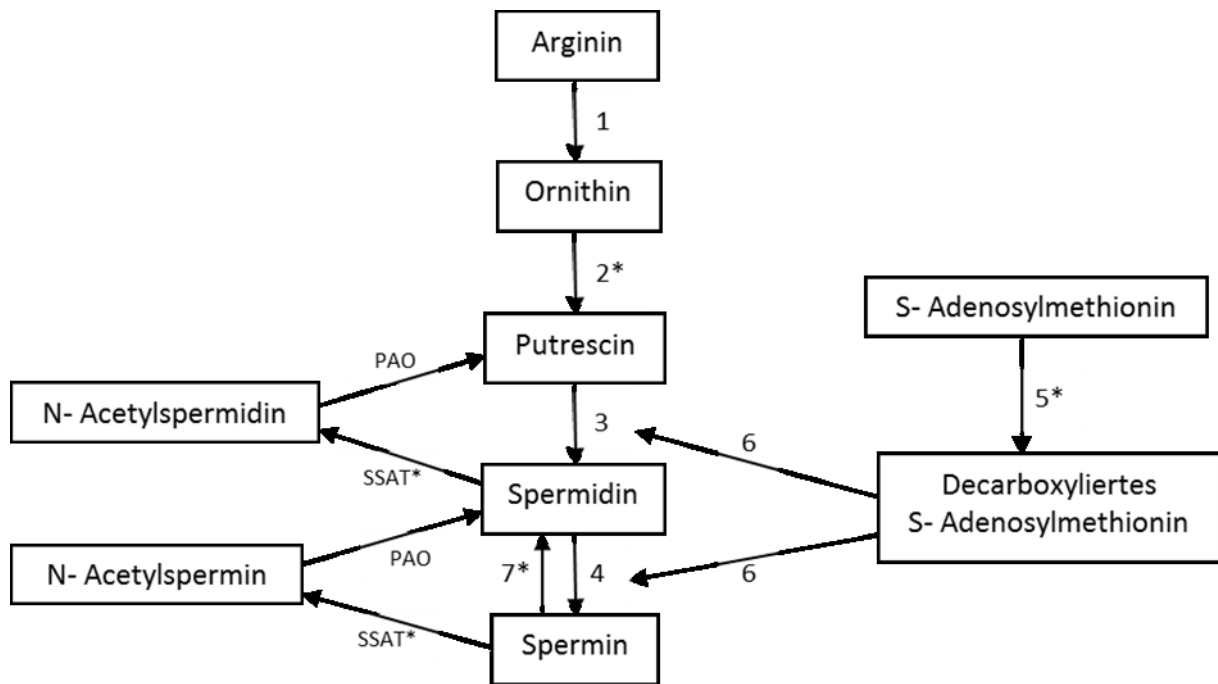


Abb. 2.: Synthese der Polyamine in eukaryotischen Zellen(*bezeichnet induzierbare Enzyme)
 1: Arginase, 2: Ornithindecarboxylase (ODC), 3: Spermidinsynthase, 4: Sperminsynthase,
 5: S- Adenosylmethionin Decarboxylase (AdoMetDC), 6: Propylamin, 7: Sperminoxidase,
 PAO: Polyaminoxidase, SSAT: Spermin/ Spermidin- N1- Acetyltransferase

In dieser Arbeit wurden die Eigenschaften der Polyamine Spermidin, Spermin und Putrescin untersucht. Betrachtet man die Strukturformeln so fällt auf, dass sich die Substanzen im Wesentlichen in der Anzahl ihrer Aminogruppen unterscheiden. Putrescin besitzt zwei ausschließlich primäre, Spermidin drei und Spermin vier jeweils primäre und sekundäre Aminogruppen. (Abb. 3).

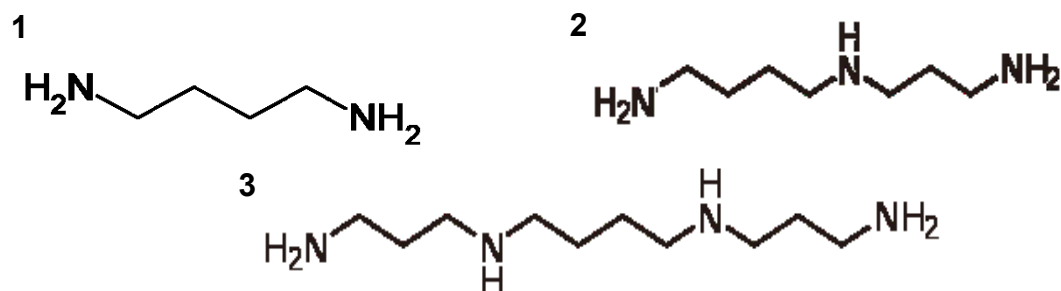


Abb.3: Strukturformeln von Putrescin (1), Spermidin (2), und Spermin (3). Entsprechend des endogenen Syntheseprozesses steigt die Anzahl der Aminogruppen.

Die Strukturformeln wurden von folgenden Websites übernommen (Stand 17.02.2017):

(1) <https://de.wikipedia.org/wiki/Putrescin>

(2) <https://de.wikipedia.org/wiki/Spermidin>

(3) <https://de.wikipedia.org/wiki/Spermin>

1.1.3 Transport

Über den Transport der Polyamine zwischen den menschlichen Zellen ist bisher nur sehr wenig bekannt. Lediglich bei *Escherichia coli* und *Saccharomyces cerevisiae* wurden eigene Polyamintransporter entdeckt. Bei Mäusen konnte eine Aufnahme von Polyaminen im Darm über Caveolin-vermittelte Endozytose nachgewiesen werden. Nach Bindung von Polyaminen an Polyamin-bindendes Protein erfolgt die Caveolin-vermittelte Aufnahme dieses Komplexes in die Zelle. Stickstoffmonoxid (NO) bewirkt anschließend das Freisetzen des Polyamins vom Polyamin-bindenden Protein. In der gleichen Studie wurde auch der Transporter SLC3A2, welcher die Abgabe von Putrescin, N-Acetylspermin und N-Acetylspermidin steuert, beschrieben¹⁰

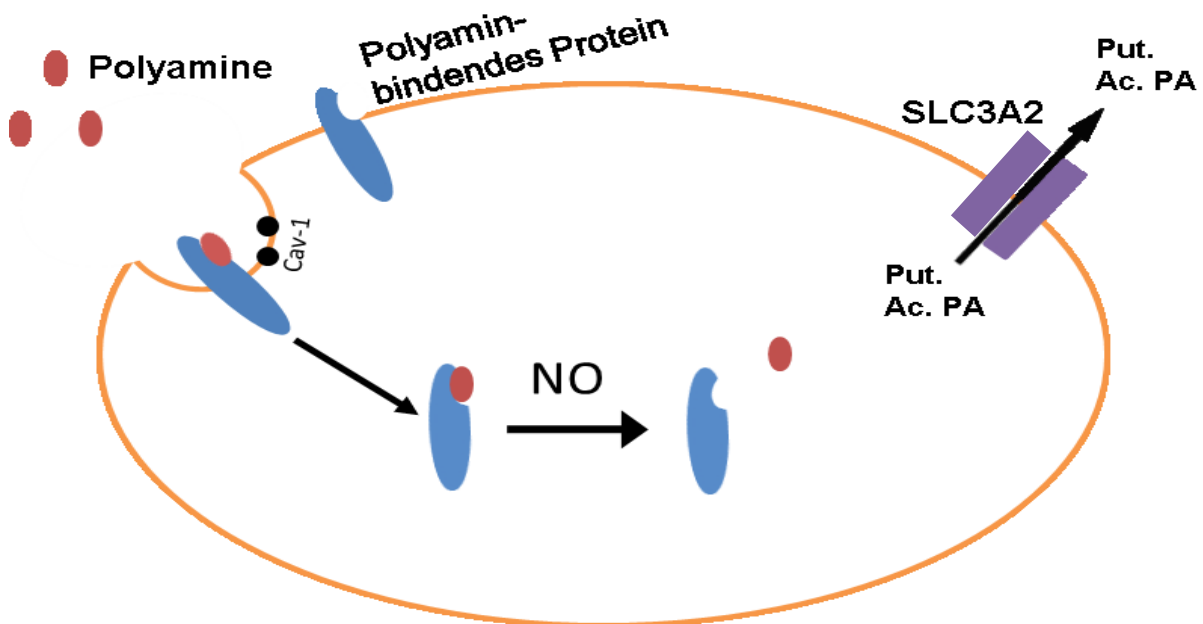


Abb. 4: Schematische Darstellung der Polyaminaufnahme im Darm bei Mäusen.

Put. = Putrescin, Ac. PA = Acetylierte Polyamine (N-Acetylspermidin, N-Acetylspermin), Cav.-1 = Caveolin-1.

Daneben sei noch erwähnt, dass es einen engen Zusammenhang zwischen dem Polyamin- und NO-Metabolismus gibt. So kann NO das Schlüsselenzym der Polyaminsynthese ODC hemmen, während Polyamine ihrerseits die NO-Synthese hemmen können⁷. Außerdem stellt die Aminosäure Arginin das Ausgangssubstrat beider Synthesewege dar⁴.

Zusammengefasst ist der Stoffwechsel der Polyamine sehr komplex und in eukaryotischen Zellen noch nicht genau erforscht. Als sehr wahrscheinlich gilt aber, dass lokale Veränderungen in den Polyaminkonzentrationen entscheidend für physiologische und pathologische Prozesse sein dürften.

1.1.4 Funktion

Polyamine sind an einer Vielzahl von zellulären Vorgängen beteiligt. Dabei können sie sowohl eine Proliferation von Zellen bewirken, als auch Apoptose induzieren. Die Art der vermittelten Wirkung hängt vor allem vom Zelltyp und von weiteren extrazellulären Signalen ab. Auf diese Weise beeinflussen Polyamine je nach Organsystem verschiedene zelluläre Prozesse^{7,11}.

1.1.4.1 Wirkung auf den Gastrointestinaltrakt

Da neben genannten Synthese- und Abbauprozessen der Polyaminstoffwechsel auch durch exogene Aufnahme aus der Nahrung sowie Synthese durch Darmbakterien beeinflusst wird, kommt dem Gastrointestinaltrakt eine besondere Rolle zu^{1,4,5}. Neben diversen Modellen über die Resorption, sind auch zahlreiche Wirkungen auf die gastrointestinalen Epithelien beschrieben:

Im Magen spielen Polyamine vor allem in der Epithelproliferation und in der Abheilung von Verletzungen wie beispielsweise Ulcera eine bedeutende Rolle, indem sie eine Reorganisation des Zytoskeletts initiieren. So konnte in *Helicobacter pylori* besiedelten Magenepithelien eine Freisetzung von H₂O₂ mit nachfolgender Einleitung der Apoptose beim Abbau von Polyaminen durch die Polyaminoxidase beobachtet werden¹².

In intestinalen Zellen scheint der Einfluss der Polyamine wesentlich komplizierter zu sein. Während für die Proliferation mehrere Gene in Frage kommen, scheint eine Entfernung von Polyaminen durch erhöhten Verbrauch (Depletion) vor Apoptose zu schützen. Außerdem führen verschiedene gastrointestinale Erkrankungen zu Änderungen in den Polyaminkonzentrationen: Ein erhöhter Polyaminkatabolismus mit hohen Putrescinwerten fand sich bei nekrotischen Pankreatitiden, bei Ösophagitis ausgelöst durch biliopankreatischen Reflux hingegen kam es zu einer hohen ODC Aktivität mit hohen Polyaminwerten¹².

1.1.4.2 Wirkung auf Gehirn und Nervensystem

Im Gehirn und dem peripheren Nervensystem dienen neuronale Stützzellen (Gliazellen) als Speicher für Spermidin und Spermin. In diesen Zellen fehlt die Sperminsynthase. Die Aufnahme von Polyaminen in diesen Zellen erfolgt über einen noch nicht geklärten Mechanismus. Die Freisetzung von Spermin und Spermidin hat zur Folge, dass verschiedene neuronale Ionenkanäle wie einwärtsgerichtete Kaliumkanäle (Kir), nicotinsche Acetylcholinrezeptoren und N- methyl- D- Aspartat-Rezeptoren (NMDA), um nur einige zu nennen, aktiviert werden. Die dafür nötige Konzentration reicht von 10 nM- 200 µM. Da Polyamine auf mehrere Rezeptoren wirken können, werden ihnen sowohl neuroprotektive wie auch neuropathologische Eigenschaften zugeschrieben. Polyamine können über eine Blockade des Ca²⁺ Einstroms bei gewissen Kanälen des Gehirns vor einer Reizüberflutung und Ischämie mit nachfolgender Apoptose schützen. Im Gegensatz dazu wird neurologischen und psychiatrischen Krankheiten wie Epilepsie, Insult, Gedächtnisstörungen, Schizophrenie und Depression eine Beeinflussung durch Polyamine nahegelegt. Neben den komplexen Vorgängen auf Rezeptor- und Ionenkanalebene, dürfte vor allem bei ischämischen Ereignissen die neurotoxischen Substanzen H₂O₂ und Acrolein eine Rolle spielen, welche im Rahmen des Polyaminabbaus gebildet werden^{9,13,14}.

1.1.4.3 Tumorgenese

Wegen ihres Einflusses auf die Proliferation konnte in vielen verschiedenen Tumorgeweben ein gestörter Polyaminmetabolismus festgestellt werden. Bei KolonkarzinompatientInnen fanden sich erhöhte Polyaminkonzentrationen im Blut und Harn im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe. Erhöhte Polyaminwerte (vor allem Spermidin und Spermin) im 24 Stunden Harn fanden sich auch bei diversen anderen Tumoren wie metastasierten Lungenkarzinomen, Hoden- und Ovarialtumoren¹⁵⁻¹⁷.

Die Schrittmacherenzyme der endogenen Polyaminsynthese dürften dabei eine große Rolle spielen. Bei Mäusen konnte ein positiver Zusammenhang zwischen der Aktivität des Enzyms ODC und der Tumorprogression bei Plattenepithel- und Basalzellkarzinomen der Haut festgestellt werden¹⁸. Zusammen mit AdoMetDC wurden erhöhte Konzentrationen der ODC in verschiedenen Tumoren mit gleichzeitig erhöhter Blutpolyaminkonzentration gefunden, welche nach Entfernung des Tumors

wieder sanken. Die Entwicklung eines Chemotherapeutikums, welches in den Polyaminstoffwechsel eingreift ist derzeit Gegenstand intensiver Forschung. Ein mögliches Ziel eines solchen Wirkstoffes wäre der ODC- Inhibitor Difluormethyl-Ornithin (DFMO). Versuche an den meisten Zelllinien ergaben nach DFMO-Administration allerdings nur eine Senkung der Konzentration von Putrescin und Spermidin und nicht von Spermin. Momentan ist DFMO nur in der Behandlung der Afrikanischen Trypanosomosis zugelassen^{7,5,11,19,20}.

1.1.4.4 Wirkung auf andere Organsysteme

Im Tierversuch konnte gezeigt werden, dass zu hohe Polyaminkonzentrationen diverse Organfunktionen negativ beeinflussen. Mäuse, welche über Wochen mit hochkonzentrierten Polyaminen gefüttert wurden, zeigten Veränderungen im Blutbild, den Leberwerten und Elektrolytverschiebungen. Gleichzeitig fanden sich vergrößerte Organe und pathologische Veränderungen an Niere, Leber, Milz und Hoden. Diese Effekte traten bei Spermidin und Spermin wesentlich häufiger und schon bei geringeren Konzentrationen als bei anderen Polyaminen auf. Die geschätzte LD₅₀ von Spermin und Spermidin lag bei jeweils 600 mg/kg²¹.

Daneben existiert mit dem Snyder Robinson Syndrom eine Krankheit, welche direkt durch einen gestörten Polyaminmetabolismus zu erklären ist. Bei dieser Erkrankung führt das fehlerhafte Enzym Sperminsynthase zu der typischen Symptomatik aus Hypotonie, neurologischem Defizit und gestörtem Muskel- und Knochenwachstum¹⁴.

1.1.4.5 Zusammenfassung der vielfältigen Wirkungen

Zusammengefasst können Polyamine die Funktion zahlreicher Organe beeinflussen. Durch ihr ubiquitäres Vorkommen und ihre Eigenschaft als Polykationen können sie an Nukleinsäuren, Glycolipide und Ionenkanäle in verschiedenen Zellen binden und so diverse Signaltransduktionskaskaden beeinflussen^{1,4,7}. Vor allem die Beeinflussung Ca²⁺ - vermittelter Signalwege durch Polyamine nimmt dabei eine bedeutende Rolle ein.

1.2 Einfluss der Polyamine auf Ca^{2+} Kanäle und Homöostase

In zahlreichen Studien konnte eine Beeinflussung der intra- und extrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationen beobachtet werden. Beispielsweise wurde bei Rattenkardiomyozyten eine Erhöhung der ODC Aktivität und der Polyaminkonzentrationen intrazellulär nach Stimulation durch Isoproterenol beschrieben. Isoproterenol bewirkt eine Erhöhung des Ca^{2+} - Ein- und Ausstroms, eine Erniedrigung der intrazellulären Ca^{2+} - Konzentration und stimuliert Ca^{2+} -abhängige Transportvorgänge. Diese Isoproterenol- induzierten Effekte verschwanden jedoch nach Blockade der Polyaminsynthese mit dem Inhibitor DFMO wieder^{22,23}.

In einer anderen Studie konnte eine signifikante Abnahme der Kraftentwicklung bei elektrisch stimulierten Rattenkardiomyozyten nach Zugabe von Spermidin und Spermin in einer Konzentration bis zu 500 μM verzeichnet werden. Dieser negativ inotrope Effekt korrelierte mit einer Abnahme des intrazellulären Kalziums²⁴. Umgekehrt jedoch scheint auch die zytosolische Ca^{2+} - Konzentration einen Einfluss auf die endogene Polyaminsynthese zu nehmen. Es konnte eine Abnahme der ODC-Aktivität und der endogenen Polyamine in künstlich perfundierten Rattenherzen mit einer Ca^{2+} - freien Lösung im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden²⁵.

Eine mögliche Ursache findet sich in dem Calciumsensitiven Rezeptor (CaR). Dieser besteht aus einer extrazellulären Domäne als Bindungsstelle für Liganden, einer transmembranösen Domäne aus einem G-Protein gekoppelten Rezeptor und einer intrazellulären Domäne für die Signaltransduktion. Über die extrazelluläre Domäne können Ca^{2+} aber auch Polyamine binden und nachfolgend die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration erhöhen. An embryonalen Nierenzellen, welche ein humaner CaR übertragen wurde, fand sich ein kooperativer Effekt zwischen extrazellulärem Ca^{2+} und Spermin, sodass bei konstanter extrazellulärer Ca^{2+} - Konzentration und steigender Sperminkonzentration das intrazelluläre Ca^{2+} anstieg^{26,27,28}. Dieser Rezeptor wurde in seiner funktionsfähigen Form allerdings bislang nur in Atria und Ventrikel adulter und neugeborener Ratten nachgewiesen²⁹.

Weiters beeinflussen Polyamine auch intrazelluläre Ca^{2+} - Verschiebungen. Beispielsweise kann Spermin die mitochondriale Ca^{2+} - Aufnahme am Rattenherz modulieren³⁰. Auch Einflüsse auf dem intrazellulären Ca^{2+} - Speicher, dem Sarkoplasmatischen Retikulum (SR) konnten gezeigt werden: An isolierten SR von Skelettmuskelzellen des Hasen, welche mit dem Ca^{2+} - freisetzenden Induktor Coffein

beladen wurden, zeigte sich nach Gabe von Spermin eine verminderte Ca^{2+} Freisetzung³¹.

Eine weitere Studie untersuchte eine Änderung der Ca^{2+} - Homöostase als möglichen Apoptosefaktor bei künstlich hypertrophen Rattenherzen. Dabei führte eine Aktivierung des CaR zu einem Ca^{2+} - Shift aus dem SR in die Mitochondrien, was unter anderem zur Freisetzung von Cytochrom c und Induktion einer Apoptose führte³². Zwar erfolgte in dieser Studie die Aktivierung des CaR nicht mit Polyaminen, andererseits konnte bei neonatalen Rattenkardiomyozyten bei Zugabe von Putrescin eine Zunahme, bei Spermidin- und Spermingabe hingegen eine Abnahme der Apoptose beobachtet werden. Daneben beschreiben viele andere Studien Polyamineffekte auf das kardiovaskuläre System³³.

1.3 Kardiale Physiologie

1.3.1 Physiologie des Aktionspotentials

Das autonome Herz verfügt im Gegensatz zum Skelettmuskel über eine eigenständige Reizgenerierung. In spezialisierten Schrittmacherzellen des Sinusknoten beginnend kommt es durch einen Na^+ - Einstrom zu einer spontanen Depolarisation durch das Öffnen von hyperpolarization- activated cyclic nucleotide-gated (HCN) Kanäle. Nach Erreichen des Schwellenpotentials kommt es zur Öffnung von spannungsabhängigen Kalziumkanälen (vgCaCH) vom L-Typ, was zu einem starken Ca^{2+} - Einstrom in die Zelle und einem steileren Potentialanstieg führt. Gleichzeitig öffnen sich dabei spannungsabhängige K^+ - Kanäle, woraufhin es zu einem Ausstrom von K^+ aus der Zelle kommt. Dadurch kommt es zur Repolarisation und zu einem Abfall des Potentials auf den Ausgangswert, dem maximal diastolischen Potential. Abschließend wird durch die Natrium- Kalium- ATPase (Na^+/K^+ - ATPase), welches Na^+ in den Extrazellularraum und K^+ in den Intrazellularraum pumpt, sowie dem Natrium- Kalzium Austauscher (NCX), welcher Ca^{2+} im Austausch gegen Na^+ aus dem Zellinneren befördert, das Ionengleichgewicht wieder hergestellt³⁴⁻³⁶.

Das Aktionspotential der Schrittmacherzellen wird anschließend auf die Zellen des Arbeitsmyokards fortgeleitet. Das dort neuentstandene Aktionspotential unterscheidet sich von jenen der Schrittmacherzellen, indem hier spannungsabhängige Na^+ -

Kanäle zu einem starken Na^+ - Einstrom in die Zelle und so zu einer schnellen Aufstrichphase am Beginn der Erregung führen. Im Anschluss findet ein Ca^{2+} - Einstrom über vgCaCH vom L-Typ statt. Dieser Ca^{2+} - Einstrom ist verantwortlich für die Ausbildung eines Plateau und Verlängerung der Aktionspotentialdauer, wodurch die Refraktärzeit erhöht und kreisende Erregungen verhindert werden. Außerdem bewirkt eingeströmtes Ca^{2+} die Öffnung des Ryanodin- Rezeptors (RyR) in der Membran des sarkoplasmatischen Retikulums (SR). Da das SR als intrazellulärer Ca^{2+} - Speicher dient, führt die Öffnung des RyR zur „kalziuminduzierten Kalziumfreisetzung“^{36,37}. Im Zellinneren freigesetztes Ca^{2+} wird zum einen für die mechanische Kontraktion verwendet, zum anderen bindet es an Calmodulin (CaM). Dieser Ca^{2+} - Calmodulin- Komplex (CaCaM) hemmt den RyR und aktiviert gleichzeitig die Calmodulinkinase II (CaMKII), welche den RyR phosphoryliert und so dessen Leitfähigkeit für das nächste Aktionspotential erhöht³⁸. Abschließend werden die Ca^{2+} - Speicher des SR über die sarko/endoplasmatische Ca^{2+} - ATPase (SERCA), welches Ca^{2+} zurück ins SR pumpt, aufgefüllt³⁹. Zusätzlich wird über den NCX Ca^{2+} im Austausch gegen Na^+ entfernt und so die Ca^{2+} - Konzentration des Ruhepotentials in der Zelle wieder hergestellt³⁴⁻³⁶.

Dieser Vorgang kann durch Ryanodin beeinflusst werden. Ryanodin (Rya), ein starker Agonist des RyR, bewirkt eine Konformationsänderung des RyR in seine geöffnete Form, wodurch die Zelle die Fähigkeit verliert Ca^{2+} im SR zu speichern. Das dadurch freigesetzte Ca^{2+} wird über den NCX aus der Zelle entfernt. Durch den Ca^{2+} - Mangel sinkt in weiterer Folge die Kontraktionskraft⁴⁰.

1.3.2 Mechanische Kontraktion und Inotropie

Im Anschluss an die elektrische Reizung der Myozyten wird die Kontraktion ausgelöst. Für die Kontraktion ist das Zusammenspiel von Aktinfilamenten und dem Protein Myosin notwendig. Im Ruhezustand sind Aktinfilamente von Proteinkomplexen aus der Familie der Troponine umhüllt. Davon nimmt Troponin C eine besondere Rolle ein, da es die Bindungsstelle für Myosin an Aktinfilamente blockiert. Die Bindungsstelle wird freigegeben, sobald Ca^{2+} an Troponin C bindet. Dieser Vorgang, bei dem während des Aktionspotentials Ca^{2+} aus dem SR ausgeschüttet und die Bindung von Myosin an Aktin ermöglicht wird, wird als elektromechanische Koppelung bezeichnet. Die Bindung von Myosin an Aktinfilamente bewirkt eine Konformationsänderung des Myosins, wodurch sich die

gesamte Zelle verkürzt. Dieser Vorgang ist ATP- abhängig. Ca^{2+} verlässt anschließend über den NCX im Austausch gegen Na^+ die Zelle oder wird über die SERCA ins SR zurückgepumpt. Als Inotropie wird eine Änderung der Kontraktionskraft der Herzmuskelzelle verstanden. Über neuronale, hormonelle oder pharmakologische Beeinflussung kann die Inotropie gesteigert (positiv inotrop) oder gesenkt (negativ inotrop) werden^{41,42}.

1.4 Beeinflussung der Ca^{2+} Homöostase durch die PI3K Signaltransduktionskaskade

Phosphoinositid 3- Kinasen (PI3K) sind Enzyme, welche die Umwandlung von Phosphatidylinositol-4,5-diphosphat in Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat katalysieren. Diese führt zu nachfolgender Initiierung verschiedener Signalwege. Die PI3K werden je nach Art der Aktivierung und Molekularstruktur in verschiedene Untergruppen eingeteilt. In dieser Arbeit wird auf die Untereinheiten PI3K α und PI3K γ und deren Einfluss auf intrazelluläre Signalwege eingegangen⁴³:

Die PI3K γ vermittelt den beta- Arrestin (β -AR) Signalweg. Über die β - Untereinheit des G- Protein gekoppelten Rezeptors (GPCR) wird die PI3K γ aktiviert. Diese erhöht die Phosphodiesterase-4- Aktivität (PDE-4), wodurch zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) zu Adenosinmonophosphat (AMP) abgebaut wird. Bei Hemmung der PI3K γ durch den reversiblen Inhibitor LY294002 wird der cAMP- Abbau verhindert, sodass es zu einem Anstieg des cAMP mit nachfolgender Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) kommt. Die PKA phosphoryliert Phospholamban (PLN), die regulierende Einheit der SERCA, wodurch die Aktivität der SERCA und die Ca^{2+} - Aufnahme ins SR erhöht wird. Im Mausversuch zeigte sich für LY 294002 ein positiv inotroper Effekt. ^{43,44,45,46}

In einer Studie an Mäusen konnte bei kurzfristiger Überexpression der PI3K α eine erhöhte Expression Ca^{2+} - regulierender Proteine wie der SERCA, des RyR und des vgCaCH vom L-Typ gezeigt werden. Langfristig führte eine Überexpression bei Mäusen zu einer Zunahme des Herzgewichts. Ein spezifischer Inhibitor der PI3K α ist A66^{43,44,47,48}.

Abbildung 5 zeigt eine Zusammenfassung der PI3K- vermittelten Signalwege und eine Beeinflussung dieser durch die Inhibitoren A66 und LY294002.

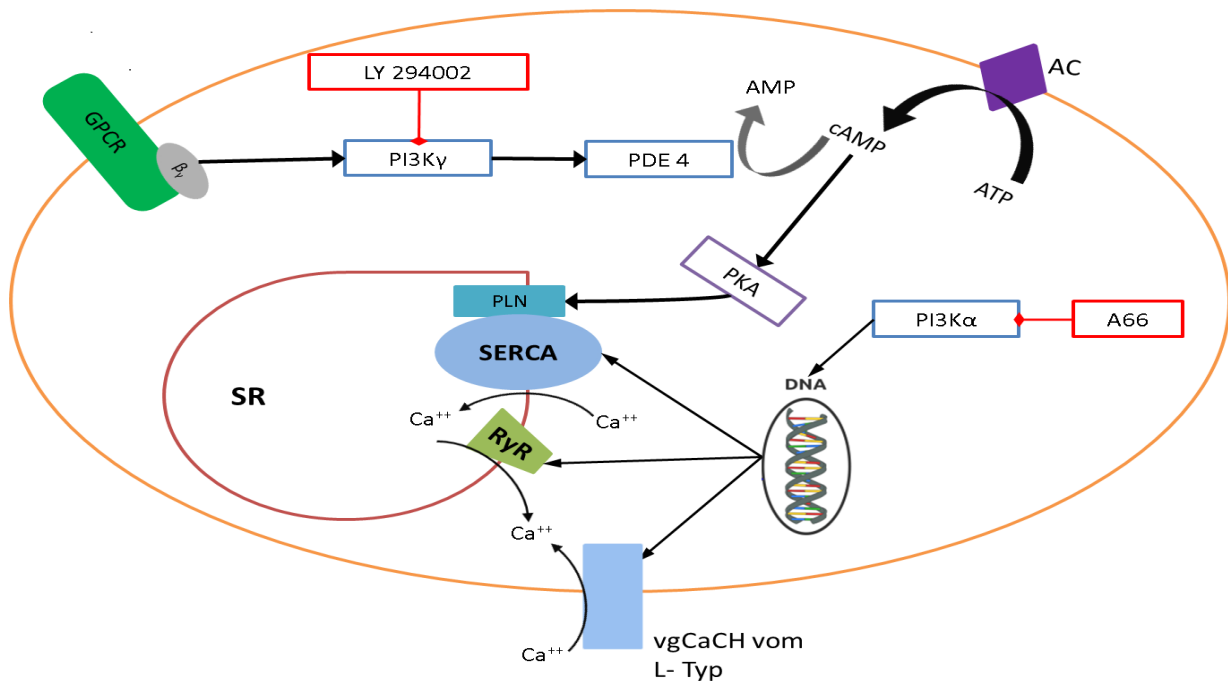


Abb. 5: Schematische Darstellung der PI3K Signaltransduktionskaskade und Beeinflussung durch die Inhibitoren A66 und LY294002. Während LY294002 letztlich zu einer vermehrten Aktivität der SERCA führt, wirkt A66 direkt auf DNA- Ebene und erhöht so die Expression Ca²⁺- regulierender Proteine.

1.5 Funktion der Polyamine im kardiovaskulären System

In Studien wurden zum einen unmittelbare wie auch Langzeiteffekte der Polyamine auf das kardiovaskuläre System beschrieben. Bei Mäusen fand sich nach Applikation von Spermin, Spermidin und Putrescin in hohen Dosen (für Spermin ab 1 mg/kg) eine Reduktion des systolischen und diastolischen Blutdrucks²¹. Beim Menschen konnte eine signifikant positive Korrelation zwischen der Spermidinkonzentration des rechten Herzohres von herzchirurgischen PatientInnen und einer erhöhten Herzfrequenz und linksventrikulären Ejektionsfraktion (LVEF), hingegen eine negative Korrelation dieser Parameter bei der Zwischenstufe N- Acetylspermidin festgestellt werden. Als morphologisches Korrelat fand sich hier eine linksatriale Vergrößerung bei PatientInnen mit erhöhter ODC Aktivität⁴⁹.

Ebenso legen viele andere Studien eine positive Korrelation zwischen kardialer Hypertrophie und Polyaminen nahe: Es wurden erhöhte Polyaminkonzentrationen im Herzgewebe nach Aortenstenose, Stress, Sport und nach Zugabe von β-

Rezeptoragonisten festgestellt. Dabei wurde eine vermehrte RNA- und Proteinsynthese sowie Histonhyperacetylierung beobachtet^{7,50,51}.

Ein mögliches Erklärungsmodell hinsichtlich der Proliferation zeigen Versuche an Kardiomyozyten von Hühnerembryonen: Hier fand sich nach Zugabe von TNF α und bakteriellem Lipopolysaccharid (LPS) eine Induktion von ODC und der induzierbaren NO-Synthase, woraufhin auch die DNA- Synthese anstieg. Dieser Effekt trat jedoch nicht mehr nach Hemmung der ODC durch DFMO und Hemmung der NO-Synthase auf⁵². Für die Aktivierung der ODC und NO- Synthase dürften die Signalmoleküle NF- κ B und ERK verantwortlich sein, welche auch gleichzeitig die Kaspasen, Schlüsselenzyme der Apoptose, hemmen. Nach Aktivierung der ODC und NO-Synthase kommt es zum Anstieg von Polyaminen und NO, welche wiederum cGMP Level in der Zelle erhöhen, was Letzendes zur Stimulation der DNA Synthese führt. Eine erhöhte DNA- Synthese ließ sich auch nach Zusatz von exogenen Polyaminen und NO- Donoren sowie cGMP- Analoga in ruhenden Zellen beobachten⁷.

In einer weiteren Studie konnte der Einfluss der ODC auf die kardiale Hypertrophie dargestellt werden. Dazu wurden genetisch manipulierte Mäuse verwendet, bei denen die ODC überexprimiert wurde. Nach Behandlung mit dem β -Rezeptoragonisten Isoproterenol zeigte sich eine stärkere linksventrikuläre Hypertrophie als bei der Kontrolle, welche die ODC im normalen Maße exprimierten. In einem zweiten Ansatz wurde zusätzlich zu Isoproterenol, L-Arginin jenen Mäusen verabreicht, die ODC überexprimierten, woraufhin es zu einer systolischen Dysfunktion und zum Tod innerhalb von 48 Stunden kam. Nachfolgende Untersuchungen der Kardiomyozyten zeigten eine verringerte Kontraktilität und veränderte Ca²⁺- Ströme⁵³.

1.6 Fragestellung und Ziele

Um akute Effekte der Polyamine auf humanes Herzgewebe zu untersuchen, wurden Herzmuskelstreifen mit steigenden Konzentrationen von Spermin, Spermidin und Putrescin behandelt. Um einen möglichen zugrundeliegenden zellulären Signaltransduktionsmechanismus für Polyamine im Herzgewebe zu identifizieren, wurde in einer zweiten Versuchsserie die Inhibitoren A66, LY294002 und Ryanodin vor Einsatz von Spermidin verwendet.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

Für die nachfolgenden Experimente wurden zwei verschiedene Gewebetypen verwendet: Die Dosiswirkungskurven wurden an atrialem und ventrikulärem humanen Myokard getestet, die Inhibitorversuche wurden nur unter Verwendung atrialer Muskelstreifen durchgeführt.

2.1.1 Atriales Gewebe

Es wurden insgesamt 33 Versuche mit Proben von 35 PatientInnen durchgeführt. Das Material wurde nach Zustimmung durch die PatientInnen im Rahmen einer Aortenklappen- oder Bypass- Operation in den Operationssälen der Herzchirurgie durch die ChirurgInnen entnommen. Bei diesen Eingriffen ist eine Umgehung des System- und Lungenkreislaufs durch Verwendung einer Herzlungenmaschine notwendig. Dabei wird eine venöse Kanüle in den rechten Vorhof eingebracht und das rechte Herzohr entfernt.

Dieses Gewebstück wurde unmittelbar mittels steriler Pinzette in einen mit 2-3 Butandion- monoxim (BDM)- Tyrode Lösung gefüllten Becher überführt und für nachfolgende Versuche verwendet. Ausgeschlossen wurden jene PatientInnen mit permanenter Vorhofflimmerarhythmie, da diese durch die chronisch geschädigte Vorhofmuskulatur eine sehr schlechte Kraftentwicklung zeigten und somit keine vernünftige Aussage über mögliche inotrope Effekte möglich war. Da das entnommene Gewebe von herzkranken PatientInnen stammte, mussten Faktoren wie zum Beispiel Medikamente und Begleiterkrankung berücksichtigt werden. Tabelle1 zeigt eine Auflistung der PatientInnendemographie.

Alle PatientInnen N=35, Daten von 34 PatientInnen (± Standardabweichung)			
Geschlecht ♂, n, (%)	31 (92%)	Diabetes mellitus II, n, (%)	12 (35%)
Geschlecht ♀, n, (%)	3 (8%)	Diastolische Dysfunktion, n, (%)	14 (41%)
Alter in Jahren	66,2 ±8,6	LVEF (%), n	56,3±12,3
BMI in kg/cm ²	27,9 ± 4,2		
CABG, n, (%)	27 (79%)	Medikamente	
AKE, n, (%)	2 (6%)	Thrombo- ASS, n, (%)	27 (79%)
AKE+ CABG, n, (%)	5 (15%)	Statine, n, (%)	26 (76%)
Sinusrhythmus, n, (%)	31 (91%)	AT II Antagonisten, n, (%)	8 (24%)
VHFA, n, (%)	1 (3%)	ACE- Hemmer, n, (%)	20 (59%)
SM- Ersatzrhythmus, n, (%)	2 (6%)	β- Blocker, n, (%)	27 (79%)
Arterielle Hypertonie, n, (%)	33 (97%)		

Tabelle 1: PatientInnendaten, atriale Muskelstreifen

♂= männlich, ♀= weiblich, BMI= body mass index, CABG= coronary artery bypass graft, AKE= Aortenklappenersatz, VHFA= Vorhofflimmerarrhythmie, SM= Schrittmacher, LVEF= Ejektionsfraktion des linken Ventrikels, ASS= Acetylsalicylsäure, AT II= Angiotensin II, ACE= angiotensin converting enzyme.

2.1.2 Ventrikuläres Gewebe

Das Gewebe wurde aus Herzen von Organspendern gewonnen, welche aus verschiedenen Gründen wie Alter, bestehenden Herzerkrankungen, positiver Virusserologie oder bösartiger Grunderkrankungen nicht für die Transplantation geeignet waren, das Herz an sich jedoch eine normale Auswurfleistung aufwies. Es konnten 16 Gewebeproben von fünf PatientInnen für die nachfolgenden Versuche verwendet werden. Die Gewinnung des Gewebes erfolgte am Zentrum für Medizinische Forschung Graz. Das Versuchsmaterial wurde sowohl aus der linken als auch rechten Kammer isoliert und nach Überführung in einen mit BDM- Tyrode-Lösung gefüllten Becher ins kardiologische Labor gebracht.

2.1.3 Pufferlösungen

- BDM- Tyrode Lösung: Um nach Erhalt des Herzohrs die Zersetzung des Gewebes zu reduzieren, wurde eine BDM- Tyrode Lösung (Zusammensetzung siehe Tabelle 2) verwendet. Das darin enthaltene 2-3 Butandion- monoxim reduziert unter anderem die Querbrückenbildung und damit die Kraftentwicklung und senkt so den Energieverbrauch. Um die Autolyse des Gewebes weiter zu reduzieren, wurde die Lösung zuvor im Kühlschrank bei 4°C gelagert und dann mittels Begasung durch Carbogen (95% O₂, 5% CO₂) auf einen physiologischen pH- Wert von 7,4 gebracht^{54,55,56}
- Tyrode- Lösung: Die Tyrode- Lösung wurde als Nährmedium für das Muskelgewebe während der Versuche verwendet. Zur längeren Haltbarkeit wurde die Lösung bei 4°C gelagert (Zusammensetzung Tabelle 2).

BDM- Tyrode- Lösung	Tyrode- Lösung
7,422 g NaCl	7,422 g NaCl
2,100 g NaHCO ₃	2,100 g NaHCO ₃
2,018 g Glukose	2,018 g Glukose
0,177 g KH ₂ PO ₄	0,177 g KH ₂ PO ₄
0,172 g KCl	0,172 g KCl
0,148 g MgSO ₄ -7H ₂ O	0,148 g MgSO ₄ -7H ₂ O
0,029 g CaCl ₂ -2H ₂ O	0,029 g CaCl ₂ -2H ₂ O
3,000 g 2,3- BDM	5 I.E. Altinsulin

Tabelle 2: Zusammensetzung der Pufferlösungen bezogen auf 1L H₂O. Ionenkonzentration der jeweiligen Lösungen [mmol/L]: Na⁺ : 152; K⁺ : 3,6 ; Ca²⁺ : 0,2; Mg²⁺ : 0,6; HCO₃⁻ : 25; Cl⁻ : 129,5; H₂PO₄⁻ : 1,3; SO₄²⁻: 0,6

2.1.4 Substanzen

Spermidin, Spermin- tetrahydrochlorid, Putrescin- dihydrochlorid, NaCl, NaHCO₃, KH₂PO₄ und 2,3- BDM wurden von Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland) und KCl, CaCl₂-2H₂O, MgSO₄-7H₂O und Glukose von Merck (Darmstadt, Deutschland) erworben. A66 und Ryanodin wurden von Tocris (Bristol, Vereinigtes Königreich) und LY 294002 von Calbiochem (Darmstadt, Deutschland) gekauft. Für die Herstellung

der Spermidinlösung wurden 5 g Spermidin in 15 mL eiskaltem destilliertem Wasser gelöst und mit 37 % HCl auf einen pH von 7,3 titriert. Abschließend wurden Aliquots von 1 mL mit einer Konzentration von jeweils 1 mol/L durch Verdünnung mit destilliertem Wasser hergestellt. Spermin- tetrahydrochlorid und Putrescindi- hydrochlorid wurden mit destilliertem Wasser zur Herstellung von je 100 µmol/L Lösungen behandelt. Es wurde 96% Ethanol für die Zubereitung von A66, LY294002 und Ryanodin verwendet.

2.1.5 Streifenanlage

Sämtliche Versuche wurden an der in Abbildung 6 dargestellten Messanlage durchgeführt. Die Anlage setzt sich aus folgenden Elementen zusammen:

- 4 Messeinheiten mit Force Transducer (Scientific Instruments, Deutschland)
- Stimulator STM1 (Scientific Instruments, Deutschland)
- 4 Rollpumpen MC MS (Ismatec, Schweiz)
- Stereomikroskop VMT (Olympus, Japan)
- 4-Kanal-Thermoschreiber Graphtec Linearcorder WR 3320 (Graphtec, Japan)
- Computer mit Softwareprogramm Labview
- Wärmepumpe Lauda RM20 mit Schlauchsystem
- Schlauchsystem mit Tyrode Becken

Die Streifenanlage besteht aus zwei getrennten Kreisläufen:

- Einen Wärmekreislauf, welcher über eine Wärmepumpe alle Kanäle versorgt und für eine Temperatur von 37°C im Organbad sorgt. Die Erwärmung erfolgt durch Integration eines Teils des Schlauchsystems des Nährlösungskreislaufes sowie des Tyrode Beckens in das Schlauchsystem des Wärmekreislaufs. Durch den Wärmekreislauf fließt eine fungizide Lösung, welche eine Ablagerung von Pilzen im Schlauchsystem verhindert.
- Einen Kreislauf für die Nährlösung. Es gibt für jeden der 4 Kanäle einen eigenen Kreislauf, welcher über eine eigene Begasung (95% O₂, 5% CO₂), Tyrode- Becken und Rollpumpe verfügt. Über das Tyrode- Becken können Tyrode- Lösung und Substanzen für die Versuche eingebracht werden. Die Nährlösung wird durch das Schlauchsystem zum Organbad durch die Rollpumpen geleitet und anschließend wieder zum Tyrode- Becken zurückgeführt bzw. in die Perfusorspritzen abgeleitet.

Die Messeinheit setzt sich jeweils zusammen aus:

- einem in einem Thermoblock eingefasstem Organbad aus Teflon, in welches die Nährlösung gepumpt wird
- zwei Minutiennadeln, in welche der Muskelstreifen aufgehängt wird
- eine Mikrometerschraube, welche mit einer der Nadeln verbunden ist und über welche der Abstand der Nadeln reguliert werden kann
- sowie eine zu- und abführende Kanüle für die Nährlösung.

Über die Messeinheit wurden die kinetischen Daten der Trabekel erfasst. Dies erfolgt über eine der Minutiennadeln, welche mit dem Force Transducer verbunden ist.

Die Daten wurden sowohl analog auf den Drucker als auch digital auf den Computer übertragen.

Über einen Stimulator können Spannung und Frequenz der Stimulation sowie eine Nullpunktbestimmung (zero adjustment) eingestellt werden.

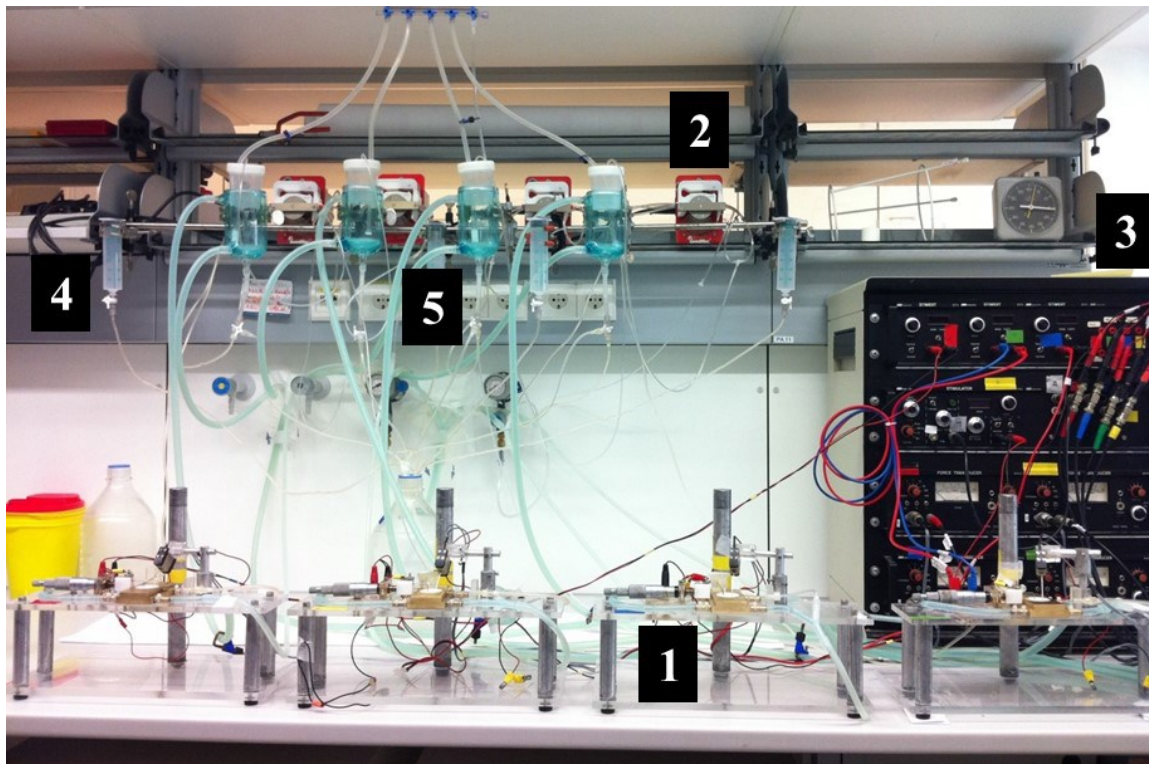


Abb. 6: Aufbau der Messanlage. 1: Messeinheit mit Force Transducer, Organbad, 2: Rollpumpe, 3: Stimulator, 4: 50 mL Perfusorenspritze zum Ablassen von Flüssigkeit, 5: 100 mL Tyrode-Becken mit Schlauchsystem

2.2 Methoden

2.2.1 Vorbereitung

Unmittelbar nach Erhalt des Gewebes aus dem herzchirurgischen Operationssaal wurde das Gewebe in das kardiologische Labor gebracht. Nach Überführung des Herzohres in eine mit frisch begaster BDM- Tyrode- Lösung gefüllten Präparierschale wurde aus dem Herzohr je nach Qualität und Größe des Herzohres zwischen null und acht Muskelstreifen, im nachfolgenden auch als Trabekel bezeichnet, gewonnen. Die Präparation erfolgte unter dem Mikroskop und unter Verwendung von Pinzetten und Mikroscheren. Es ist darauf zu achten Dehnungen des Gewebes zu vermeiden, da sonst irreversible Strukturschäden die Qualität des Gewebes gefährden. Außerdem sollte der Querdurchmesser der präparierten Trabekel nicht zu groß sein, da sonst eine Hypoxie der inneren Muskelschichten droht⁵⁷.

Die gewonnen Trabekel wurden in einem mit BDM- Tyrode- Lösung gefüllten Becher gesammelt und anschließend mittels einer Pipette in das Organbad überführt. Das Organbad wurde zuvor mit Tyrode- Lösung geflutet, indem 90 mL in das Tyrode-Becken gegeben und zum Organbad gepumpt wurde. Unter dem Mikroskop erfolgte möglichst atraumatisch das Einhängen der Trabekel in die Minutiennadeln. Um das beim Überführen der Trabekel in das Organbad vorhandene BDM wieder aus dem System auszuwaschen, wurden 40 mL der ursprünglichen 90 mL Tyrode Lösung in die Perfusorspritzen überführt, sodass nur mehr 50 mL im System verblieben.

Nach Einhängen der Muskelstreifen wurde die diastolische Ruhespannung der einzelnen Trabekel auf einen Ausgangswert von 0 mN/mm² gesetzt.

Um eine physiologische Ca²⁺- Konzentration von 2,5 mmol/L herzustellen, wurde in 2 Schritten zunächst 50 µL (Ca²⁺- Konzentration von 1,2 mmol/L erreicht) anschließend 65 µL (Ca²⁺- Konzentration von 2,5 mmol/L erreicht) einer 1M CaCl₂- Lösung zugeführt. Nach Zugabe des 2. Ca²⁺- Schrittes erfolgte die elektrische Stimulation der Muskelstreifen. Es wurden alle Versuche mit einer Stimulationsfrequenz von 1 Hertz (Hz) durchgeführt. Die Höhe der elektrischen Spannung wurde abhängig von der optimalen Kraftentwicklung an die einzelnen Trabekel angepasst.

Nach Einschalten der Stimulation wurden die Trabekel mittels Mikrometerschraube gedehnt. Dadurch wird eine Erhöhung der Vorlast (=preload) simuliert, welche über den Frank- Starling- Mechanismus zu einer Erhöhung der systolischen Kraft führt⁵⁸.

Die Dehnschritte wurden solange wiederholt bis die Trabekel keinen wesentlichen Kraftzuwachs mehr verzeichneten. Dieser Punkt wurde als L_{max} bezeichnet und markierte den Startpunkt der nachfolgenden Versuchsprotokolle.

2.2.2 Dosis- Wirkungskurve

Nach Erreichen von L_{max} wurde im Abstand von 20 Minuten die Interventionssubstanzen Spermidin, Spermin oder Putrescin bzw. NaCl Lösung als Kontrolle in steigenden Konzentrationen in die Tyrode- Becken pipetiert. Für die Interventionen wurde jeweils mit 100 nM Gesamtkonzentration gestartet (L_{max}) und die Dosis alle 20 Minuten um den Faktor zehn bis zu einer Konzentration von 1 mM für die Polyamine und 3,3 mM für NaCl erhöht, sodass die Gesamtzeit der Versuche ab L_{max} 100 Minuten betrug (Abb.7). Zwischen den Konzentrationssteigerungen wurden die kinetischen Daten gemessen und gespeichert.

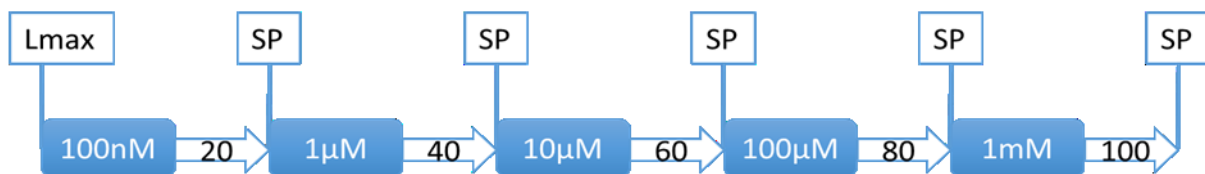


Abb.7: Versuchsprotokoll der Dosis Wirkungskurven: Nach Erreichen von L_{max} wurde der erste Speicherpunkt gesetzt. Die weiteren Speicherpunkte (SP) wurden vor Dosissteigerung alle 20 Minuten gesetzt. Nach 100 Minuten und Setzen des letzten SP war das Experiment beendet.

2.2.3 Inhibitorversuche

Nach Erreichen von L_{max} wurden 1µM Ryanodin, 1µM A66 oder 5µM LY294002 bzw. 50µL 96% Ethanol als Kontrolle in die verschiedenen Kanäle pipetiert und anschließend für 30 Minuten inkubiert. Abschließend wurde in jeden der Kanäle 1mM Spermidin zugeführt und weitere 30 Minuten inkubiert (Abb.8).

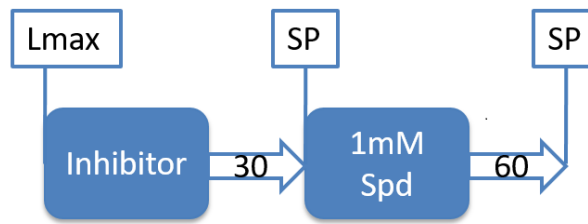


Abb.8: Versuchsprotokoll der Inhibitorversuche: Unmittelbar vor den Interventionen wurden Speicherpunkte (SP) gesetzt. Die Zahl in den Pfeilen spiegelt die Dauer des Experimentes in Minuten wieder (Spd= Spermidin).

2.3 Auswertung und Statistik

Die Daten wurden an den gewählten Messpunkten aus einem Mittelwert von jeweils fünf aufeinanderfolgenden Kontraktionen gewonnen. Dabei wurden die Parameter der systolischen Kraft und der diastolischen Spannung erfasst.

Die Versuchsgruppen wurden mittels ungepaartem T- Test gegeneinander verglichen. Signifikante Ergebnisse wurden bei einem p-Wert von $<0,05$ angenommen.

3 Ergebnisse

3.1 Systolische Kraft und diastolische Spannung

Die diastolische Spannung bezeichnet die Ruhespannung der eingehängten Muskelstreifen. Die Muskelstreifen wurden im schlaffen Zustand an den Minutiennadeln fixiert. Vor Beginn der Dehnschritte wurde die diastolische Spannung auf 0 mN/mm^2 gesetzt (zero adjustment). Da die Trabekel bis zum Erreichen von L_{max} verschieden stark gedehnt wurden, wichen die Werte für die diastolische Spannung oft stark voneinander ab. Um Veränderungen in systolischer Kraft und diastolischer Spannung besser erfassen zu können und die einzelnen Experimente statistisch besser vergleichen zu können, wurden relative Werte bezogen auf den Startpunkt des Experimentes (=100%) errechnet. Der Startpunkt eines jeden Experimentes wurde mit L_{max} bezeichnet. Abbildung 9 zeigt exemplarisch den Ausdruck einer Originalregistrierung eines Kontrollmuskelstreifens mit Beschreibung der systolischen und diastolischen Spannung.

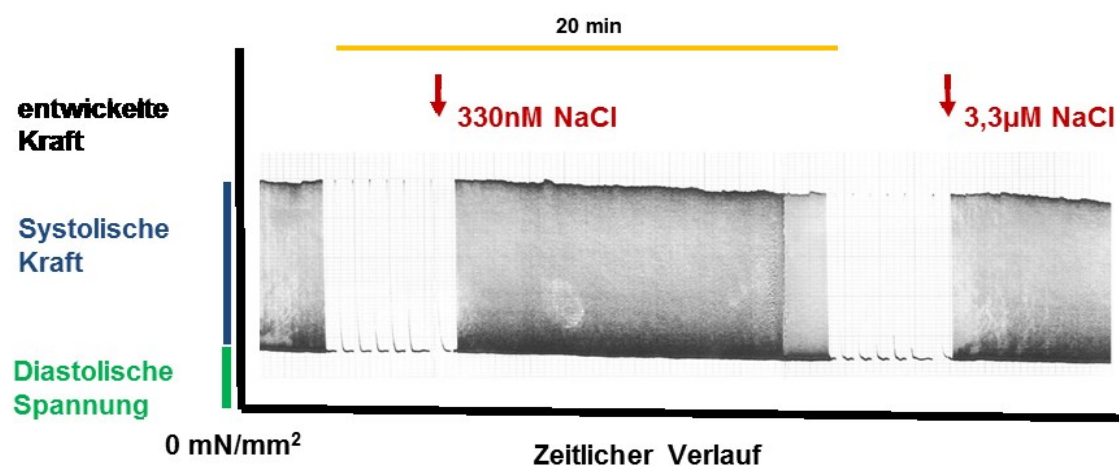


Abb.9: Auszug einer Originalregistrierung einer Dosiswirkungskurve mit NaCl. Humanes Vorhofgewebe, 37°C , 1Hz Stimulationsfrequenz

Die Ordinate beschreibt die entwickelte Kraft in mN/mm^2 . Die blaue Linie kennzeichnet die systolische Kraft, die grüne Linie die diastolische Spannung. Die Abszisse beschreibt den zeitlichen Verlauf. Einzelzacken stehen für einen Speicherpunkt (Papiervorschub 5mm/Sekunde). Schwarze Fläche: Papiervorschub: 5 mm/Minute . Die Pfeile markieren den Zeitpunkt einer Konzentrationserhöhung. Es zeigt sich eine kontinuierliche Abnahme der systolischen Kraft (rundown) und der diastolischen Spannung für diesen Konzentrationsbereich (330 nM - $3,3 \mu\text{M}$).

3.2 Inotrope Effekte

Um inotrope Effekte zu erfassen, wurde unter anderem die systolische Kraft an den jeweiligen Speicherpunkten gemessen. Wird keine Substanz zugesetzt, kommt es zu einem kontinuierlichen physiologischen Kraftverlust über die Zeit. Dieser als Rundown bezeichnete Vorgang wird in Abbildung 10 veranschaulicht. Ein negativ inotroper Effekt ist in Abbildung 11 dargestellt. Nach Zugabe der stark negativ inotrop wirkenden Substanz Ryanodin kommt es zu einem starken Kraftverlust bis auf ein bestimmtes Niveau, ab welchem die entwickelte Kraft konstant bleibt (steady state).

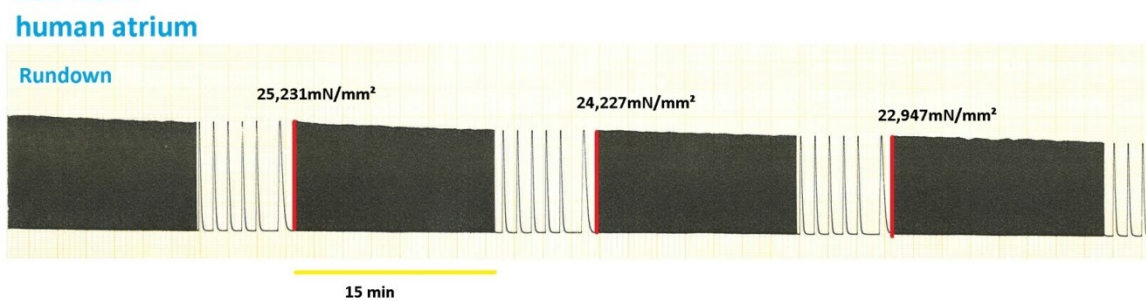


Abb.10: Originalregistrierung eines Rundown- Experimentes. Humanes Vorhofgewebe, 37°C, 1 Hz Stimulationsfrequenz.

Ohne Intervention kommt es innerhalb von 30 Minuten zu einem physiologischen Kraftverlust von 25,231 mN/mm² auf 22,947 mN/mm². Schwarze Fläche: Papiervorschub 5 mm/Minute, Einzelzacken: Papiervorschub 5mm/Sekunde.

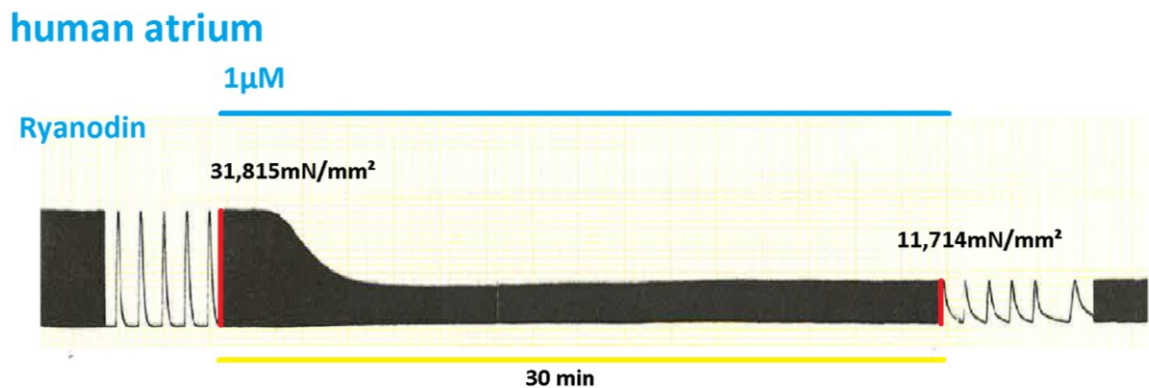


Abb.11: Originalregistrierung eines Inhibitor-Experimentes: Humanes Vorhofgewebe, 37°C, 1 Hz Stimulationsfrequenz.

Nach Zugabe von 1 µM Ryanodin kommt es zu einem Kraftabfall bis auf ein stabiles Niveau (steady state). Schwarze Fläche: Papiervorschub 5mm/Minute, Einzelzacken: Papiervorschub 5mm/Sekunde.

3.3 Atrium- Kontrolle (NaCl)

Da die Polyamine in HCl gelöst wurden, mussten mögliche Effekte durch Chlorid-Ionen ausgeschlossen werden. Um den Chloridanteil in den Interventionslösungen zu berücksichtigen diente eine NaCl- Lösung als Kontrollsubstanz. Die Konzentration wurde entsprechend dem Chloridanteil in den Polyaminkonzentrationen alle 20 Minuten um den Faktor 10 gesteigert. Die Abszissenachse markiert die Konzentration der NaCl- Lösung beginnend mit 330 nM, die Ordinate zeigt die entwickelte Kraft (Abb.12).

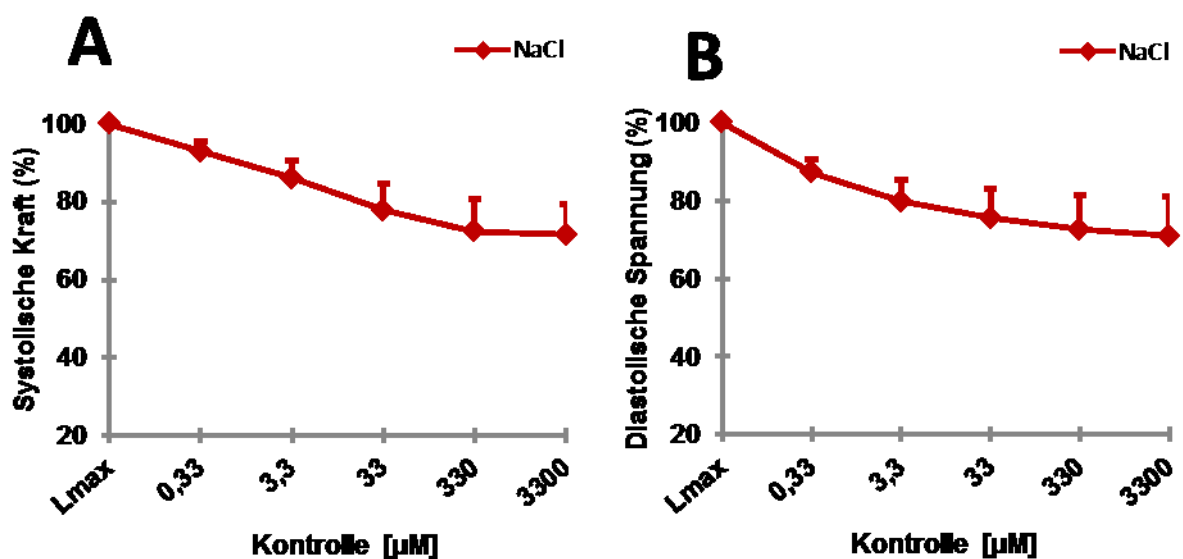


Abb.12: Dosis Wirkungskurve der Kontrollsubstanz NaCl an humanen atrialem Myokard, 37°C, 1 Hz

A: Die Muskelstreifen ($n = 9$) verlierten mit zunehmender Konzentration annähernd einer linearen Funktion an Kraft. Dieser Kraftverlust ist nicht substanzinduziert und vereinbar mit einem physiologischen Rundown. Abszisse: Konzentration der Kontrolle in μM , Ordinate: systolische Kraft in % (+ SEM)

B: Abgebildet ist die diastolische Spannung als Mittelwerte der relativen Werte. Bei steigenden Konzentrationen kam es zu einem annähernd linearen diastolischen Kraftverlust. Abszisse: Konzentration der Kontrolle in μM , Ordinate: diastolische Spannung in % (+ SEM)

Nach 100 Minuten erfolgte die letzte Messung bei einer Konzentration von 3,3 mM NaCl. Die Muskelstreifen zeigten eine verminderte systolische Kraftentwicklung von $71,6 \% \pm 7,7 \%$ im Vergleich zu 100% bei Start des Experiments. Die diastolische Spannung fiel bei einer Konzentration von 3,3 mM auf $71,0 \% \pm 10,1 \%$ ab. Diese Messungen mit steigenden NaCl- Konzentrationen wurden parallel zu jenen der Dosis- Wirkungskurven der einzelnen Polyamine durchgeführt, um eine gute Vergleichbarkeit zu erzielen.

3.4 Atrium- Spermidin

Es wurden inotrope Effekte der einzelnen Polyamine auf das Vorhofgewebe untersucht. Zu Beginn der Experimente wurde die systolische Kraft mit 100% festgelegt. Es erfolgte eine Dosissteigerung alle 20 Minuten beginnend mit 100 nM .

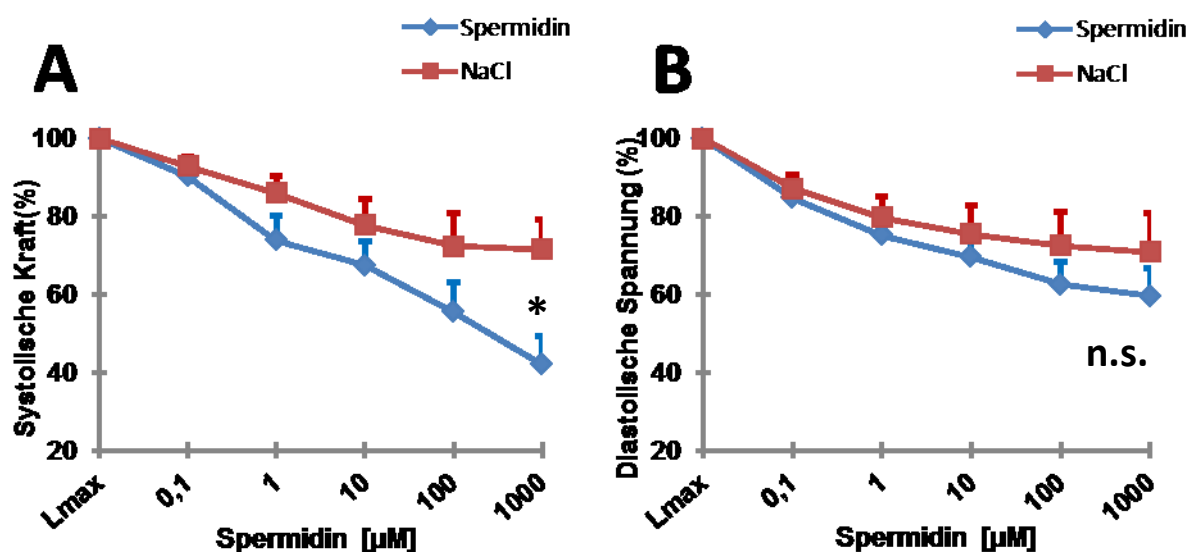


Abb.13: Inotrope Effekte von Spermidin auf humanes atriales Myokard, 37°C , 1Hz

A: Dosiswirkungskurve: Auswirkung von Spermidin (blaue Linie, $n = 13$) auf die systolische Kraft ([$\%$] + SEM). Bei steigender Spermidinkonzentration kam es zu einem zunehmend negativ inotropen Effekt im Vergleich zur Kontrolle (rote Linie, $n = 9$). Der negativ inotrope Effekt erreicht bei einer Konzentration von 1 mM Signifikanz. *: $p < 0,05$

B: Dosiswirkungskurve: Auswirkung von Spermidin (blaue Linie, $n = 13$) auf die diastolische Spannung ([$\%$] + SEM). Es zeigte sich kein signifikanter Effekt im Vergleich zur Kontrolle (rote Linie, $n = 9$). n.s.: nicht signifikant

Bei einer geringen Konzentration von 100 nM Spermidin kam es zu einem geringen Kraftverlust nach 20 Minuten, welcher auch in der Kontrolle auftrat. Dieser ist vereinbar mit dem physiologischen Rundown. Ab einer Konzentration von 1 μ M wurde der Kraftverlust deutlicher. Bei 1 mM Spermidin wurde ein signifikanter negativ inotroper Effekt sichtbar. Die systolische Kraft ist hier auf $42,0\% \pm 7,5\%$ abgesunken. Im Vergleich dazu lag die systolische Kraft der Kontrolle noch bei $71,6\% \pm 7,7\%$.

Die diastolische Spannung fiel sowohl bei der Kontrolle, als auch bei Spermidin in gleichem Maße bei steigenden Konzentrationen ab, sodass hier kein signifikanter Effekt verzeichnet wurde (Abb.13).

Neben dem signifikant negativ inotropen Effekt von Spermidin ab einer Konzentration von 1 mM, traten auch Arrhythmien ab einer Konzentration von 100 μ M auf. Bei 17 gemessenen Muskelstreifen entwickelten zwei Trabekel Arrhythmien (11,8%). Abbildung 14 zeigt einen Ausdruck einer Originalregistrierung mit Auftreten einer Arrhythmie im Konzentrationsbereich von 100 μ M bis 1 mM Spermidin.

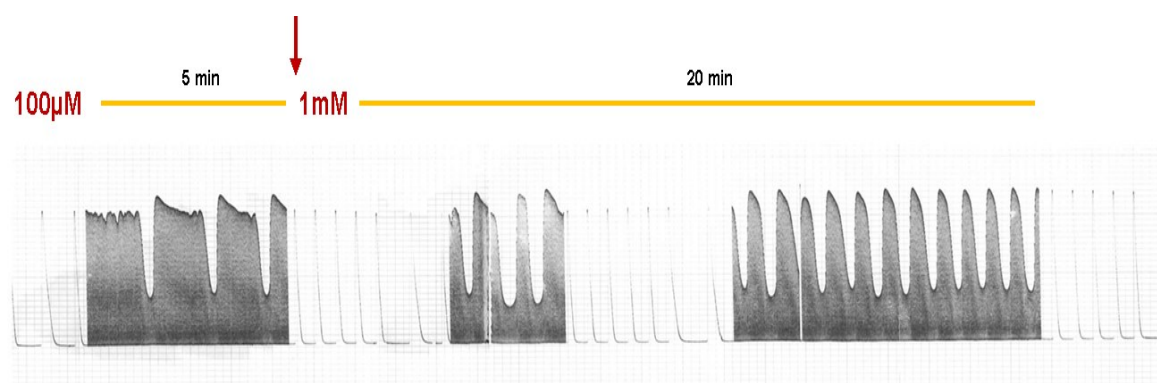


Abb.14: Proarrhythmogener Effekt von Spermidin auf humanes atriales Myokard, 37°, 1Hz Stimulationsfrequenz.

Nach Erhöhung der Konzentration auf 100 μ M Spermidin kam es noch zu keinem unmittelbaren Auftreten von Arrhythmien. Erst 15 Minuten nach Intervention traten Arrhythmien auf. Es kam zu einem periodischen Abfall und Wiederanstieg der systolischen Kraft. Bei Erhöhung der Konzentration auf 1 mM wird dieser Effekt deutlicher.

3.5 Atrium- Spermin

Analog zu den Spermidin Experimenten wurden inotrope Effekte auf humanes atriales Myokard für Spermin untersucht. Beginnend mit 100 nM erfolgte eine Konzentrationserhöhung alle 20 Minuten um den Faktor zehnfach. Als Kontrolle diente wieder NaCl. Im Gegensatz zu Spermidin zeigte sich für Spermin kein Kraftabfall bei niedrigen Konzentrationen im Vergleich zur Kontrolle. Der kontinuierliche Kraftabfall in der Kontrolle und Intervention bis 100 μM erklärt sich durch den physiologischen Rundown. Bei einer Konzentration von 1 mM Spermin zeigte sich ein signifikanter negativ inotroper Effekt. Die systolische Kraft bei 1 mM Spermin ist im Vergleich zu L_{max} (100%) auf $39,9\% \pm 12,2\%$ gesunken. Die systolische Kraft der Kontrolle betrug $71,6\% \pm 7,7\%$ bei diesem Messpunkt. Sowohl in der Kontrolle als auch für Spermin kam es zu einem sukzessiven Abfall der diastolischen Spannung im zeitlichen Verlauf, sodass kein signifikanter Effekt beobachtet wurde (Abb. 15).

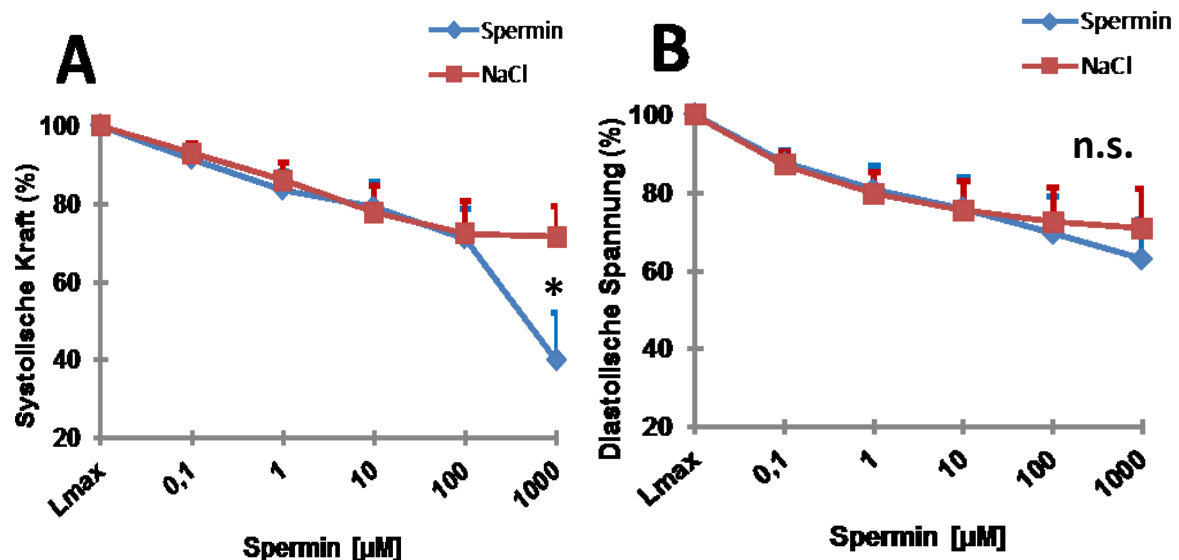


Abb. 15: Inotrope Effekte von Spermin auf humanes atriales Myokard, 37°C, 1Hz

A: Dosiswirkungskurve: Auswirkung von Spermin (blaue Linie, $n = 10$) auf die systolische Kraft ([%] + SEM). Es zeigt sich ein signifikanter negativ inotroper Effekt im Vergleich zur Kontrolle (rote Linie, $n = 9$) bei einer Konzentration von 1 mM Spermin. *: $p < 0,05$

B: Dosiswirkungskurve: Auswirkung von Spermin (blaue Linie, $n = 10$) auf die diastolische Spannung ([%] + SEM). Es zeigt sich kein signifikanter Effekt im Vergleich zur Kontrolle (rote Linie, $n = 9$). n.s.: nicht signifikant

3.6 Atrium- Putrescin

Messungen mit steigenden Konzentrationen von Putrescin bildeten den Abschluss der Versuchsserie. Analog zu Spermin und Spermidin wurde auch hier mit 100 nM begonnen und alle 20 Minuten die Konzentration gesteigert. Als Kontrolle dienten wiederum mit NaCl behandelte Trabekel. Im Gegensatz zu den beiden Polyaminen Spermidin und Spermin, fand sich für Putrescin keine Beeinflussung der systolischen Kraft in den gemessenen Konzentrationen. Die systolische Kraft sank am Ende des Experiments auf $82,5 \% \pm 8,8 \%$ ab. In der Kontrolle betrug die systolische Kraft $71,6 \% \pm 7,7 \%$ zu diesem Messpunkt, sodass in beiden Fällen ein Rundown beobachtet wurde und der Unterschied nicht signifikant war. Die diastolische Spannung fiel in der Intervention und in der Kontrolle kontinuierlich ab, sodass auch hier kein Effekt beobachtet werden konnte (Abb.16).

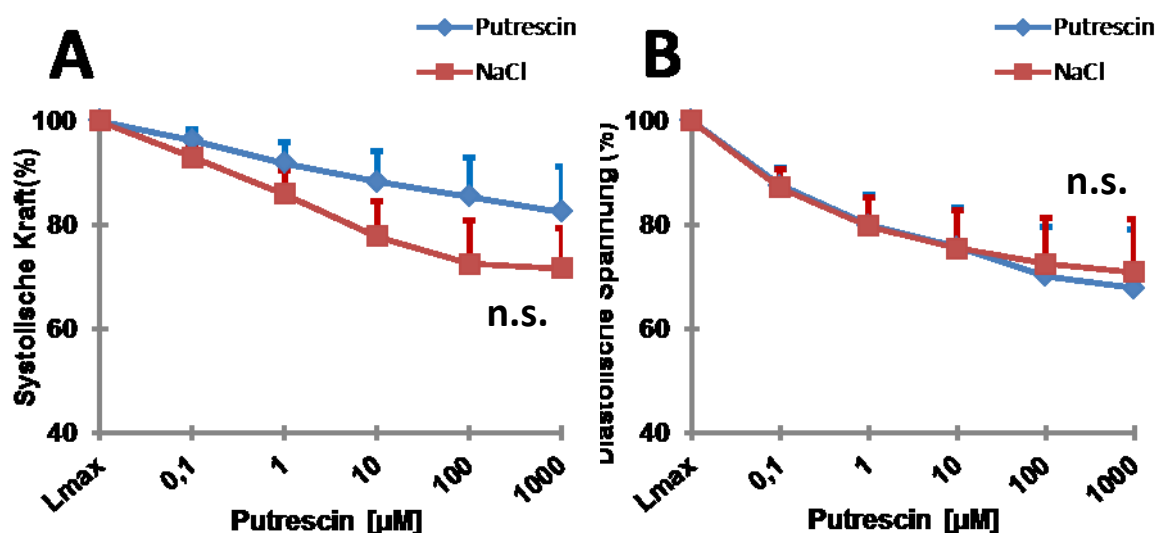


Abb.16: Inotrope Effekte von Putrescin auf humanes atriales Myokard, 37°C, 1Hz

A: Dosiswirkungskurve: Auswirkung von Putrescin (blaue Linie, $n = 7$) auf die systolische Kraft ([%] + SEM). Auch bei hoher Putrescinkonzentration von 1 mM konnte kein inotroper Effekt im Vergleich zur Kontrolle (rote Linie, $n = 9$) beobachtet werden. n.s.: nicht signifikant

B: Dosiswirkungskurve: Auswirkung von Putrescin (blaue Linie, $n = 7$) auf die diastolische Spannung ([%] + SEM). Es zeigt sich kein signifikanter Effekt im Vergleich zur Kontrolle (rote Linie, $n = 9$). n.s.: nicht signifikant

3.7 Ventrikel- Spermidin

Um zu untersuchen, ob die Effekte am atrialem Gewebe auch in ventrikulärem Myokard auftreten, wurde Spermidin in steigenden Konzentrationen an ventrikulären Muskelstreifen getestet. Die Konzentrationen wurden analog den atrialen Experimenten von 100 nM bis 1 mM gewählt. NaCl- Lösung diente wiederum als Kontrolle. Im Gegensatz zum Atrium fand sich in ventrikulärem Gewebe keine signifikante Beeinflussung der Inotropie. Die systolische Kraft lag bei einer Konzentration von 1 mM Spermidin bei $60,7 \% \pm 11,2 \%$, in der Kontrolle lag dieser Wert bei 3,3 mM NaCl bei $55,0 \% \pm 13,0 \%$. Ähnlich wie in den atrialen Versuchen zeigte sich auch beim Ventrikel für Spermidin und für die Kontrolle eine kontinuierliche Abnahme der diastolischen Kraft über die Zeit (Abb.17).

Es kam zu keinem Auftreten von Arrhythmien bei Spermidin behandelten Muskelstreifen.

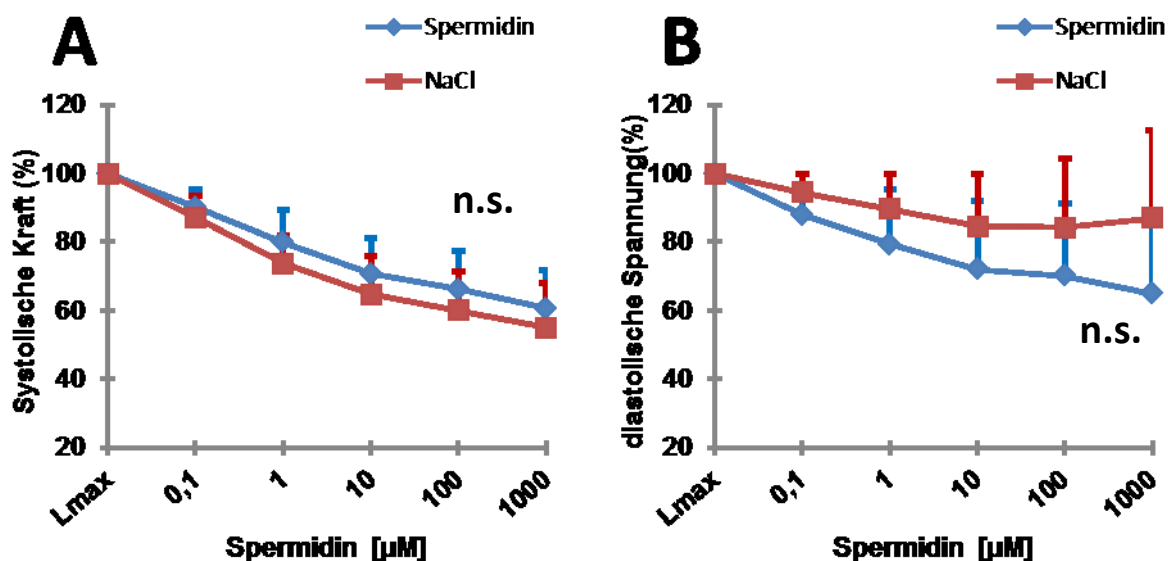


Abb.17: Inotrope Effekte von Spermidin auf humanes ventrikuläres Myokard, 37°C, 1Hz

A: Dosiswirkungskurve: Auswirkung von Spermidin (blaue Linie, $n = 4$) auf die systolische Kraft ([%] + SEM). Es zeigte sich auch in hohen Konzentrationen kein inotroper Effekt im Vergleich zur Kontrolle (rote Linie, $n = 4$). n.s.: nicht signifikant

B: Dosiswirkungskurve: Auswirkung von Spermidin (blaue Linie, $n = 4$) auf die diastolische Spannung ([%] + SEM). Es zeigt sich kein signifikanter Effekt im Vergleich zur Kontrolle (rote Linie, $n = 4$). n.s.: nicht signifikant

3.8 Inhibitoren

In den bisher durchgeführten Experimenten konnte gezeigt werden, dass Spermidin und Spermin in hohen Konzentrationen jedoch nicht Putrescin einen negativ inotropen Effekt auf humanes atriales Myokard hat. Die diastolische Spannung wurde durch steigende Polyaminkonzentrationen nicht verändert. Polyamine beeinflussen die Ca^{2+} -Konzentrationen über verschiedene Mechanismen in verschiedenen Geweben^{22-26,27,28,30-33}. In den nachfolgenden Versuchen wurden daher spezifische Inhibitoren intrazellulärer Signaltransduktionswege der Ca^{2+} Homöostase untersucht. Es wurden der Ryanodin- Rezeptor Agonist Ryanodin und die PI3K- Hemmer LY294002 und A66 verwendet.

Die Herstellung der Inhibitorlösungen erfolgte mit 96% Ethanol, sodass mit äquimolaren Konzentrationen von Ethanol behandelte Muskelstreifen als Kontrollen dienten. Um inhibitorinduzierte Effekte zu erfassen, wurden die diastolische Spannung und die systolische Kraft 30 Minuten nach Inhibitorzugabe gemessen. Dieser Wert wurde auf die Baseline (BL) bezogen, welche die systolische Kraft und die diastolische Spannung für jeden einzelnen Muskelstreifen vor Beginn der Intervention darstellt ($L_{\max} = 100\%$).

Bei Ryanodin betrug die systolische Kraft 30 Minuten nach Substanzzugabe $30,2\% \pm 4,7\%$. Hier zeigte sich ein signifikant negativ inotroper Effekt im Vergleich zur Kontrolle, wo dieser Wert bei $87,2\% \pm 3,2\%$ lag. Im Gegensatz dazu zeigten sich keine inotropen Effekte für die PI3K Inhibitoren A66 und LY294002. Die systolische Kraft 30 Minuten nach Substanzzugabe lag bei LY294002 bei $81,4\% \pm 2,8\%$, bei A66 bei $78,5\% \pm 3,7\%$ (Abb. 18).

Es zeigte sich keine Beeinflussung der diastolischen Spannung durch die Inhibitoren im Vergleich zur Kontrolle.

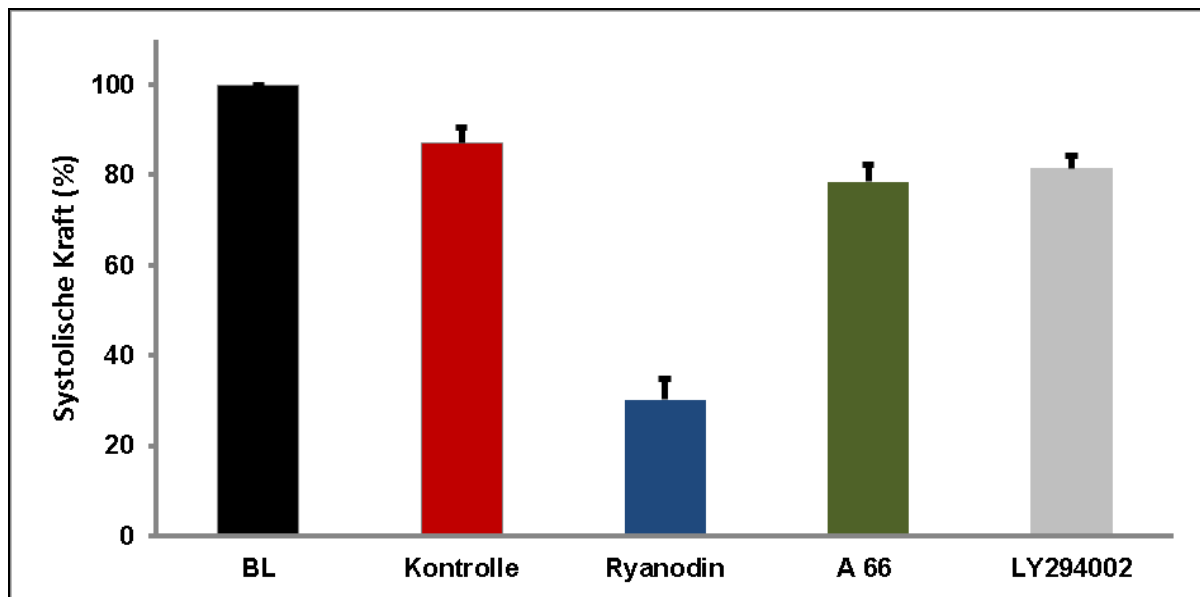


Abb. 18: Inotrope Effekte der Inhibitoren Ryanodin [1 μ M], A66 [1 μ M] und LY294002 [5 μ M] auf humanes atriales Myokard, 37°, 1Hz Stimulationsfrequenz.

Die Baseline (BL) markiert den Ausgangswert der systolischen Kraft zu Beginn des Experimentes für jeden einzelnen Muskelstreifen. In der Kontrolle (n=10) und bei den PI3K Inhibitoren A66 (n=9) und LY294002 (n=10) kommt es zu einer kontinuierlichen Abnahme der systolischen Kraft über die Zeit. Dieser Effekt lässt sich mit einem physiologischen Rundown vereinbaren. Für Ryanodin (n=7) zeigt sich ein signifikant negativ inotroper Effekt nach Substanzzugabe im Vergleich zur Kontrolle. *: p<0,05.

30 Minuten nach Inkubation mit den Inhibitoren wurden die Muskelstreifen mit einer Einmaldosis von 1 mM Spermidin behandelt. Nach weiteren 30 Minuten wurden die kinetischen Parameter erneut gemessen. Als Baseline wurde die systolische Kraft der einzelnen Muskelstreifen 30 Minuten nach Inhibitorenzugabe gewählt.

In der Kontrolle konnte ähnlich zu den vorangegangenen Experimenten ein negativ inotroper Effekt nach Spermidinzugabe beobachtet werden. Die systolische Kraft lag hier bei 80,5 % \pm 4,5 %. In den LY294002 und A66 vorbehandelten Muskelstreifen wurde ebenso ein negativ inotroper Effekt registriert. Bei LY294002 lag die systolische Kraft bei 81,5 % \pm 2,9 % und bei A66 bei 76,4 % \pm 5,6 % 30 Minuten nach Spermidinzugabe. Bei Ryanodin vorbehandelten Muskelstreifen fand sich eine signifikante Abschwächung des

Spermidin- induzierten negativ inotropen Effekts. Hier lag die systolische Kraft nach Intervention mit 1 mM Spermidin noch bei 95,3 % \pm 3,3 % (Abb. 19).

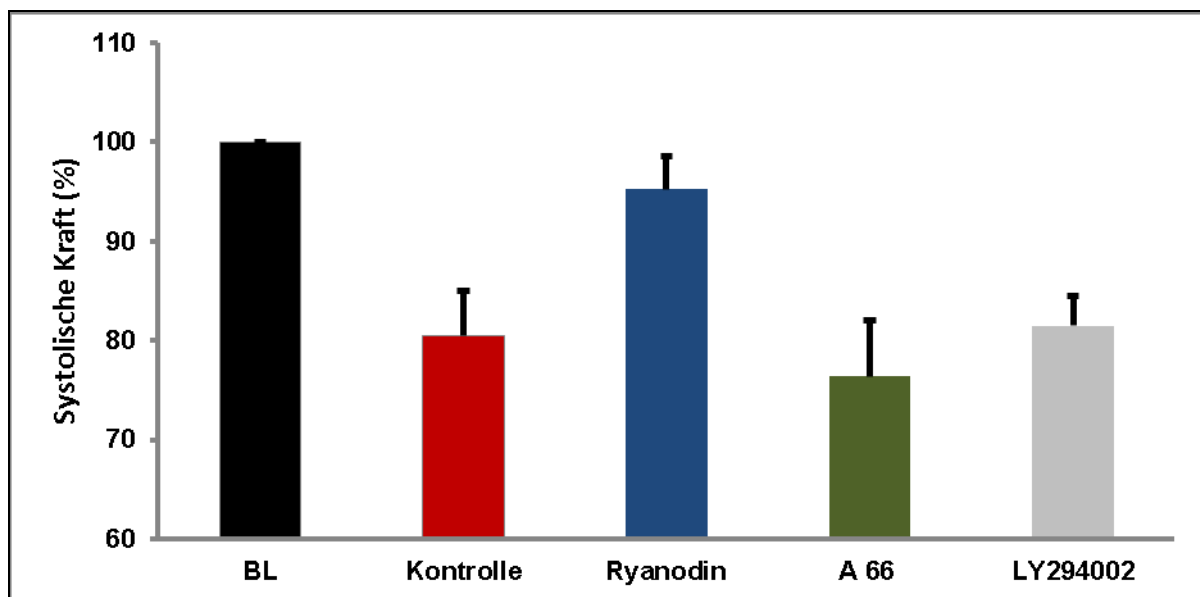


Abb.19: Inotrope Effekte von Spermidin auf mit Inhibitoren vorbehandelte Muskelstreifen von humanem atrialen Myokard, 37°, 1 Hz Stimulationsfrequenz.

Die Baseline (BL) wurde auf 100 % gesetzt und markiert die systolische Kraft 30 Minuten nach Inhibitorzugabe in den jeweiligen Interventionsstreifen. In der Kontrolle (n = 10) sowie bei A66 (n = 9) und LY294002 (n = 10) ließ sich ein negativ inotroper Effekt nach Spermidinzugabe verzeichnen. In Ryanodin (n = 7) vorbehandelten Muskelstreifen war der negativ inotrope Effekt von Spermidin abgeschwächt. *: $p < 0,05$.

Neben dem negativ inotropen Effekt von Spermidin fanden sich auch proarrhythmogene Effekte. Diese konnten auch in den Inhibitorexperimenten beobachtet werden. In der Kontrolle entwickelten 40% der Muskelstreifen nach Spermidinzugabe Arrhythmien. Bei Ryanodin lag dieser Wert mit 36% arrhythmischer Trabekel ähnlich hoch. Bei den PI3K Inhibitoren wurden weniger Arrhythmien beobachtet. Nur 20% der LY294002 behandelten Muskelstreifen und keiner der A66 vorbehandelten Trabekel entwickelte nach Spermidinzugabe Arrhythmien (Abb.20).

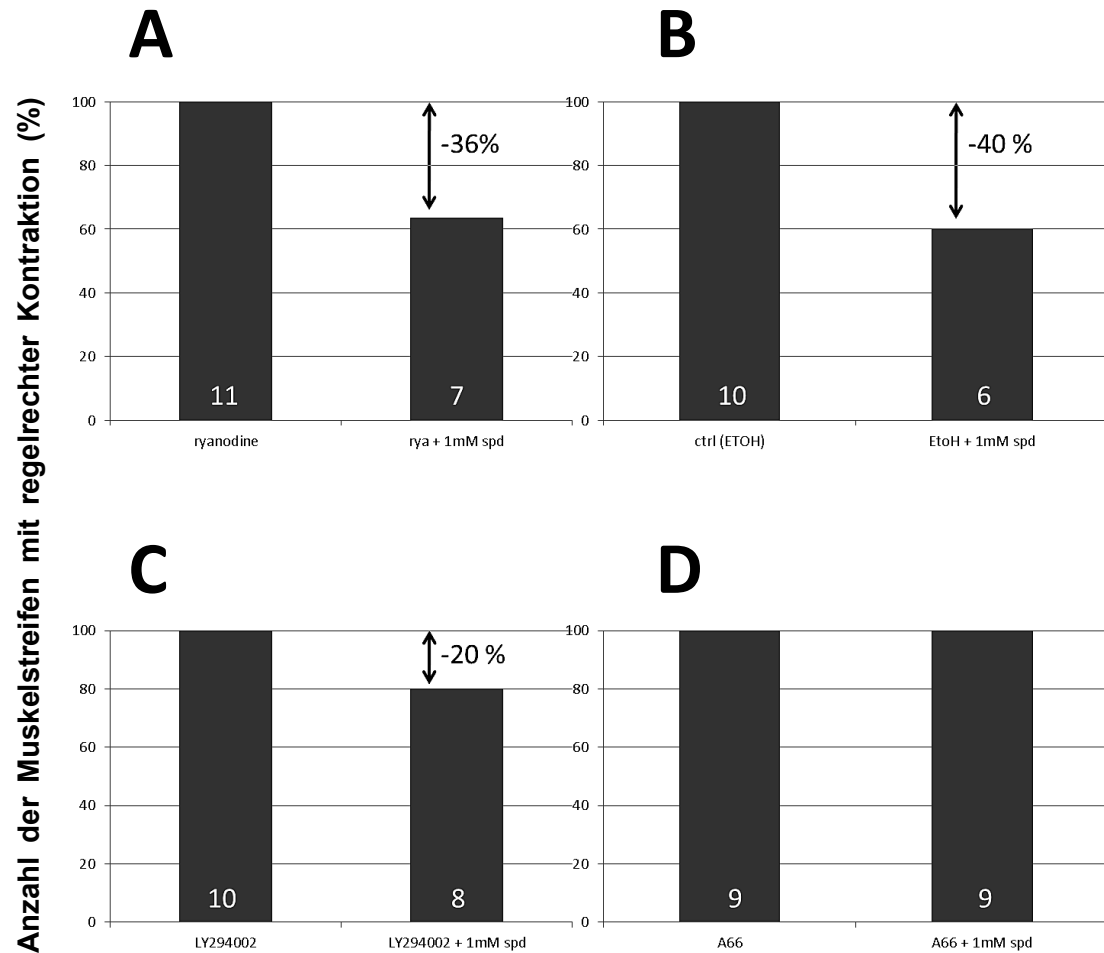


Abb.20: Beeinflussung Spermidin- induzierter Arrhythmien durch Inhibitor- präinkubierte Muskelstreifen im humanen atrialen Myokard, 37°, 1 Hz Stimulationsfrequenz.

Die Ordinate gibt die Anzahl der Muskelstreifen ohne Arrhythmien in % an. Der erste Balken in den jeweiligen Grafiken steht für die Anzahl der Muskelstreifen in % mit regelrechter Kontraktion nach Inhibitorzugabe, der zweite Balken nach zusätzlicher Spermidinzugabe. Die Zahlen in den Balken kennzeichnen die Anzahl der Muskelstreifen.

A: In Ryanodin vorbehandelten Muskelstreifen entwickelten vier von elf Muskelstreifen Arrhythmien.

B: In der Kontrolle entwickelten vier von zehn Muskelstreifen Arrhythmien.

C: In LY294002 vorbehandelten Muskelstreifen zeigten nur zwei von zehn Muskelstreifen Arrhythmien.

D: In A66 vorbehandelten Muskelstreifen (n = 9) kam es zu keinem Auftreten von Arrhythmien.

4 Diskussion

Im Rahmen der durchgeführten Experimente wurden Dosis- Wirkungskurven für die getesteten Polyamine angefertigt. Dabei zeigte sich im hohen Konzentrationsbereich von 1 mM ein negativ inotroper Effekt für Spermidin und Spermin im Vergleich zur Kontrolle in atrialem Gewebe. Gleichzeitig kam es bei Spermidin in atrialem Gewebe ab einer Konzentration von 100 μ M zum Auftreten von Arrhythmien. Im Gegensatz zu atrialem Gewebe wurden im ventrikulären Gewebe keine Effekte beobachtet. Anschließend wurden Muskelstreifen aus atrialem Gewebe mit Ryanodin vorbehandelt, wobei sich nach Spermidinzugabe eine Abschwächung des negativ inotropen Effekts fand. Eine Vorbehandlung mit den PI3K Inhibitoren A66 und LY294002 resultierte in einem geringen Auftreten von Spermidin- induzierten Arrhythmien im Vergleich zur Kontrolle. Die Ergebnisse ließen folgende Rückschlüsse zu: (1) Supraphysiologische Konzentrationen der Polyamine Spermidin und Spermin bewirken unter möglicher Beteiligung des RyR negativ inotrope Effekte in atrialen Muskelstreifen. (2) Spermidin verursacht in höheren Konzentrationen ab 100 μ M Arrhythmien in atrialen Muskelstreifen, welche womöglich über den PI3K Signalweg vermittelt werden könnten.

4.1 Kalzium- abhängige Signalkaskaden als möglicher Angriffspunkt

Ca^{2+} ist zentral in der Signaltransduktion und dem Ablauf der Kontraktion kardialer Myozyten eingebunden. Dabei wurde veranschaulicht, dass eine Änderung der intrazellulären Ca^{2+} - Konzentration auch eine Veränderung der Kontraktionskraft zur Folge hat. Diese lässt sich durch verschiedene Angriffspunkte erklären: zum einen wird Ca^{2+} von extrazellulär, unter anderem über den v_gCaCH vom L-Typ, in die Zelle aufgenommen, andererseits besteht ein weiterer Mechanismus über den intrazellulären Transport zwischen den Kompartimenten, also dem Zytosol und dem SR. Diese Prozesse werden von der SERCA und dem Ryanodin- Rezeptor beeinflusst. Zuletzt ist das Ansprechen von Ca^{2+} auf die Myofilamente zum Auslösen des Filamentgleitens entscheidend für eine Kontraktion³⁴⁻⁴².

Obwohl in zahlreichen Studien eine Beeinflussung der Ca^{2+} Homöostase durch Polyamine beschrieben wird, existieren kaum Studien die eine Beteiligung des vgCaCH vom L-Typ an diesen Prozessen beschreiben. Hingegen scheint der Calciumsensitive Rezeptor (CaR) ein viel versprechender Angriffspunkt in diesen Prozessen zu sein. Die Aktivierung des CaR, beispielsweise durch Binden von Kalzium an den Rezeptor, führt zur Aufnahme von Ca^{2+} in den Myozyten. In Rattenmyozyten konnte eine Bindung von Spermin an den CaR und eine erhöhte intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration bei Anwesenheit von ein bis zehn mM Spermin nachgewiesen werden⁵⁹. Diese Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Aufnahme scheint zunächst widersprüchlich zu den Ergebnissen aus den Versuchsserien. Auf der anderen Seite konnte gezeigt werden, dass eine zu hohe intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration zur myozytären Dysfunktion (aftercontractions) und zum Auftreten von Arrhythmien führen kann^{60,61}.

In den Versuchen wurde der Ryanodin- Rezeptor Agonist Ryanodin verwendet. Trabekel, die mit dieser Substanz vorbehandelt wurden, zeigten eine Abschwächung des negativ inotropen Effektes von Spermidin. Es ist daher eine Interaktion zumindest von Spermidin mit dem Ryanodin- Rezeptor anzunehmen. Auch in anderen Studien wurden Interaktionen von Polyaminen mit dem Ryanodin- Rezeptor beschrieben. Palade untersuchte den Einfluss der Polyamine auf isolierte SR des Skelettmuskels von Hasen. Ca^{2+} - freisetzende Induktoren wie Coffein und Thymol wurden verwendet, um einen Ca^{2+} - Shift aus dem SR ins Zytosol zu erwirken. Nach Spermidin- und Sperminzugabe war dieser Shift signifikant vermindert³¹. Uehara et al untersuchten die Bindung der Polyamine an den Ryanodin- Rezeptor im isolierten SR von Kardiomyozyten bei Hasen. Dabei zeigte sich bei den Polyaminen Putrescin, Spermidin und Spermin im millimolaren Bereich eine spannungsabhängige Blockade der Ryanodin- Rezeptor Pore. Diese Blockade war bei null mV am Stärksten und nahm bei zunehmender Spannung wieder ab. Interessanterweise konnte die Blockade der Pore zu beiden Seiten der Sarkoplasma beobachtet werden. Weiters war die Effizienz der Blockade von der Strömungsrichtung der Ionen abhängig, wobei Spermin als potentester Blocker agierte. Es wurde daher davon ausgegangen, dass Polyamine als permeable Kationenblocker mit dem Ryanodin- Rezeptor interagieren⁶².

Der letzte Einflussfaktor auf die Inotropie stellt die direkte Interaktion mit den Myofilamenten dar. Harris et al untersuchten den Einfluss der Polyamine Spermin, Spermidin und Putrescin auf die Ca^{2+} - Sensitivität an kardialen Myofilamenten von Ratten. Dabei konnte gezeigt werden, dass bei Zusatz dieser Polyamine mehr Ca^{2+} zum Erreichen der halbmaximalen Spannung notwendig wurde. Auch hier wirkte Spermin am Potentesten, dann Spermidin und schließlich Putrescin. Interessanterweise fanden sich gegenteilige Effekte der Polyamine in der glatten Muskulatur. In Dünndarmzellen von Meerschweinchen und Gefäßwänden von Ratten zeigte sich bei hoher intrazellulärer Polyaminkonzentration eine Zunahme der Ca^{2+} Sensitivität an den Myofilamenten^{63,64,65}.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass ein negativ inotroper Effekt von Spermidin bei Blockade des RyR abgeschwächt wurde. Dies legt nahe, dass der Spermidin induzierte negativ inotrope Effekt durch eine Interaktion mit dem Ryanodin- Rezeptor und Veränderung des für die Kontraktion zur Verfügung stehenden Ca^{2+} zustande kommt. In Studien an Rattenherzen fanden sich ähnliche Ergebnisse. Allerdings existieren auch Studien, die einen anderen Angriffspunkt der Polyamine beschreiben. Neben dem Eingreifen auf die Ca^{2+} - Homöostase wie bereits beschrieben, sind auch Wirkungen auf Kaliumkanäle beschrieben. In diesen Studien konnten Spermidin und Spermin einwärtsgerichtete Kaliumkanäle blockieren^{66,67}. Wie letztlich der negativ inotrope Effekt von Spermidin und Spermin im menschlichen Herzvorhof zustande kommt, lässt sich an Hand der erhobenen Daten nicht eindeutig sagen. Ein komplexes Eingreifen auf verschiedenen Ebenen der Signaltransduktion und der Kontraktionsauslösung gilt jedoch als wahrscheinlich.

4.2 Polyaminwirkung auf den PI3K Signalweg

Eine Vorbehandlung der Muskelstreifen mit den PI3K Inhibitoren A66 und LY294002 führte zu einem geringeren Auftreten von Arrhythmien nach Spermidinzugabe. Bei dem selektiven PI3K α Blocker A66 traten keine Arrhythmien auf, beim PI3K γ Inhibitor LY294002 nur in 20% der Trabekel nach Spermidinzugabe. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass Spermidin- induzierte Arrhythmien über den PI3K Signalweg vermittelt werden.

Im Gegensatz dazu beschreiben mehrere Studien einen proarrhythmogenen Effekt bei verminderter Aktivität der PI3K. Ghigo et al untersuchten an Mäusen mit fehlender PI3K γ das Auftreten von Arrhythmien nach β -adrenerger Stimulation. Dabei kam es zu vorzeitigen Kontraktionen im Ventrikel, welche nach Gabe eines β -Rezeptorblockers wieder durchbrochen werden konnten. Diese ventrikulären Arrhythmien gingen mit erhöhten cAMP-Konzentrationen in der Zelle einher, sodass von einer Beteiligung des β -AR-Signalweges auszugehen ist. In der Studie konnte weiters eine Hyperphosphorylierung von Phospholamban mit der Folge erhöhter intrazellulärer Ca^{2+} -Freisetzung, sowie ein Auftreten spontaner Ca^{2+} -Freisetzung und arrhythmischer Ca^{2+} Ströme beobachtet werden. Zusammenfassend zeigten die Ergebnisse der Studie, dass bei Mäusen mit fehlender PI3K γ Ca^{2+} -abhängige Arrhythmien nach β -adrenerger Stimulation auftraten⁶⁸.

Pretorius et al untersuchten das Auftreten von Vorhofflimmerarrhythmien bei Mäusen mit fehlender PI3K α . Es wurden drei Gruppen untersucht: transgenetisch manipulierte Mäuse mit dilatativer Kardiomyopathie (CMP), transgenetisch manipulierte Mäuse mit dilatativer Kardiomyopathie und fehlender PI3K α und gesunde Mäuse als Kontrolle. Mäuse mit fehlender PI3K und dilatativer CMP entwickelten eine Vorhofflimmerarrhythmie und zeigten eine stärkere Vergrößerung und Fibroseneigung der Atria im Vergleich zu Mäusen, welche nur eine dilatative CMP hatten. Weiters konnte in der Studie an menschlichem Vorhofgewebe eine verminderte Aktivität der PI3K α bei PatientInnen mit vorbestehender Vorhofflimmerarrhythmie im Vergleich zu PatientInnen mit regelrechtem Sinusrhythmus gemessen werden. Diese Ergebnisse lassen auf einen antiarrhythmogenen Effekt der PI3K α im Vorhof schließen⁶⁹.

Ein möglicher Einflussfaktor in der Entwicklung von Arrhythmien stellt auch der Inositol Phospholipid Metabolismus dar, welcher auch durch PI3K mitbeeinflusst wird. Woodcock et al konnten zeigen, dass eine Bindung von Inositol (1,4,5)-Triphosphat (IP3), ein Endprodukt im Inositol Phospholipid Stoffwechsel, an seinen eigenen Rezeptor am SR zur vermehrten Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR führt. Zima et al fanden bei atrialen Katzenmyozyten, dass IP3 zu spontaner Ca^{2+} -Freisetzung mit nachfolgender Entwicklung atrialer Arrhythmien führt^{70,71}.

Neben der Prävention Spermidin- induzierter Arrhythmien wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluss der PI3K auf die Kraftentwicklung untersucht. Dabei zeigte sich weder eine Beeinflussung der Inotropie durch die Substanzen selbst, noch eine Beeinflussung des Spermidin- vermittelten negativ inotropen Effektes. Da LY294002 direkt in den β -AR- Signalweg eingreift, scheint hier eine Beeinflussung der Inotropie logisch. Tatsächlich konnten Leblais et al in einer Studie an Rattenventrikel zeigen, dass der positiv inotrope Effekt von LY294002 infolge des verminderten Abbaus von intrazellulärem cAMP, erst nach Zugabe eines β - Rezeptoragonistens (Isoproterenol) zu Tragen kommt und dass LY294002 selbst die Kontraktionskraft nur gering beeinflusst⁷².

Zusammenfassend fand sich nach Blockade des PI3K Signalwegs ein geringeres Auftreten Spermidin- induzierter Arrhythmien, jedoch keine Beeinflussung des negativ inotropen Effektes. Das verringerte Auftreten von Arrhythmien nach Blockade der PI3K ist größtenteils widersprüchlich zu anderen Studien, wo eine verringerte PI3K Aktivität das Auftreten von Arrhythmien begünstigte. Wie sich letzten Endes das vermehrte Auftreten von Arrhythmien bei höheren Spermidinkonzentrationen erklären lässt, ist an Hand der verwendeten Methodik und der aktuellen Studienlage nicht möglich.

4.3 Limitationen der Arbeit

Die Ergebnisse aus dieser Arbeit erbringen interessante Erkenntnisse über die Wirkung von Polyaminen auf das menschliche Herz. Da frühere Studien meist an Tieren durchgeführt wurden, sind diese Informationen umso bedeutender, da sich beim Menschen wie bei der Ratte zum Teil ähnliche Ergebnisse finden²⁴. Eine Einschränkung in der Aussage bezüglich der Wirkung von Polyaminen auf das menschliche kardiovaskuläre System ergibt sich insofern, als hier nur akute Effekte beobachtet wurden. Wie sich eine Langzeiteinnahme höherer Polyaminkonzentrationen auf das menschliche Herz auswirkt, kann an Hand dieser Ergebnisse nicht beurteilt werden. Zusätzlich dazu ist bei der Frage, ob Polyamine kardioprotektive Eigenschaften besitzen, auch das nachgeschaltete vaskuläre System miteinzubeziehen.

Nilsson et al untersuchten die Auswirkungen von Spermin auf die Kontraktion der glatten Muskelzellen in Pfortadern von Ratten. Es konnte gezeigt werden, dass erhöhte intrazelluläre Sperminkonzentrationen eine Zunahme der Ca^{2+} -Sensitivität auf die Kraftentwicklung bewirkten. Interessanterweise führten erhöhte extrazelluläre Sperminkonzentrationen genau zu einem gegenteiligen Effekt⁶⁵.

Überraschenderweise konnte in der vorliegenden Arbeit eine Beeinflussung der Inotropie nur in atrialem nicht aber in ventrikulärem Gewebe beobachtet werden. Dies könnte zum einen durch stark gewebeabhängige Effekte von Polyaminen erklärt werden, zum anderen wurde jedoch nur eine geringe Anzahl ventrikulärer Muskelstreifen gemessen, sodass ein zufälliger Effekt auch möglich ist.

Ähnliches gilt für die Beurteilung der Arrhythmien in den Inhibitorversuchen, wo zufällige Effekte bei PI3K- vorbehandelten Muskelstreifen auch möglich sind. An dieser Stelle sei auch erwähnt, dass die verwendete Methodik zum Erfassen inotroper Effekte von Substanzen und den dahinterliegenden Mechanismen über nachfolgende Inhibitorexperimente gut geeignet ist, jedoch beim Auftreten von Arrhythmien oft nur schwer eine zugrundeliegende Ursache gefunden werden kann.

Eine weitere Limitation ergibt sich an Hand der verwendeten Inhibitoren. In zahlreichen Studien an Mäusen und Ratten konnte gezeigt werden, dass Polyamine in der Lage sind Ca^{2+} -Konzentrationen zu verschieben. Auf diese Weise konnten mehrere Angriffspunkte der Polyamine in der Ca^{2+} -Homöostase identifiziert werden²²⁻³². Somit scheint ein komplexes Eingreifen auf mehreren Ebenen möglich. In dieser Arbeit fand sich eine Abschwächung des Spermidin-induzierten negativ inotropen Effektes am Atrium bei vorangegangener Blockade des Ryandoin- Rezeptors über Ryanodin. Da Ryanodin selbst zu einem starkem Ca^{2+} Verlust aus der Zelle führt, ist hier ein direkter Vergleich zur Kontrolle auf Grund der unterschiedlichen intrazellulären absoluten Ca^{2+} -Konzentrationen eingeschränkt möglich, vor allem auch in Anbetracht möglicher multipler Targets in der Kontraktionseinleitung. Darüber hinaus ist eine Mitbeteiligung anderer Kanäle wie Kaliumkanälen möglich.

Interessanterweise stammten die gemessenen Muskelstreifen vorwiegend von männlichen Patienten. Obwohl kein Unterschied zwischen den Geschlechtern zu erwarten ist, kann hier keine sichere Aussage getroffen werden, ob bei weiblichen Patientinnen gleiche Effekte auftreten.

4.4 Ausblick

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass durch die Versuche in dieser Arbeit interessante und neue Erkenntnisse in der Wirkung von Polyaminen auf das menschliche Herz aufgedeckt werden konnten. Da die Experimente vorwiegend an atrialem Gewebe durchgeführt wurden, lässt sich eine Aussage über mögliche Effekte auf das kardiovaskuläre System an Hand dieser Ergebnisse und in Zusammenschau mit der aktuellen Studienlage nicht treffen. Um letztlich zu beurteilen, ob Polyamine bzw. eine polyaminreiche Ernährung kardioprotektive Effekte beim Menschen besitzen, ist zum einen ein genaueres Verständnis des Polyaminstoffwechsels vor allem zwischen den Zellen notwendig, zum anderen ist auf Grund der mangelnden Datenlage hinsichtlich Studien an menschlichem Gewebe die Durchführung weiterer Studien zur Untersuchung von Polyamineffekten von Nöten. Weiterführend wären Ionenkanalmessungen wie beispielsweise „patch- clamp“ zur besseren Abklärung der Spermidin induzierten Arrhythmien sinnvoll.

5 Literaturverzeichnis

1. Schuber, F. Influence of polyamines on membrane functions. *The Biochemical journal* **260**, 1-10 (1989).
2. Kecskemeti, V., Kelemen, K., Marko, R. & Selmecci, L. Modification of the cardiac transmembrane potentials and currents by polyamines. *European journal of pharmacology* **142**, 297-303 (1987).
3. Woster, P.M. Polyamine structure and synthetic analogs. in *Polyamine cell signaling* 3-24 (Springer, 2006).
4. Soda, K. *Polyamines-The Principal Candidate Substance of Soybean-Induced Health*, (INTECH Open Access Publisher, 2011).
5. Soda, K., et al. Long-term oral polyamine intake increases blood polyamine concentrations. *Journal of nutritional science and vitaminology* **55**, 361-366 (2009).
6. Perez-Leal, O., Barrero, C.A., Clarkson, A.B., Casero, R.A., Jr. & Merali, S. Polyamine-regulated translation of spermidine/spermine-N1-acetyltransferase. *Molecular and cellular biology* **32**, 1453-1467 (2012).
7. Giordano, E., et al. Polyamines in cardiac physiology and disease. *Open Heart Failure Journal* **3**, 25-30 (2010).
8. Seiler, N. Polyamine metabolism. *Digestion* **46 Suppl 2**, 319-330 (1990).
9. Park, M.H. & Igarashi, K. Polyamines and their metabolites as diagnostic markers of human diseases. *Biomolecules & therapeutics* **21**, 1-9 (2013).
10. Uemura, T., Stringer, D.E., Blohm-Mangone, K.A. & Gerner, E.W. Polyamine transport is mediated by both endocytic and solute carrier transport mechanisms in the gastrointestinal tract. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* **299**, G517-522 (2010).
11. Seiler, N. Thirty years of polyamine-related approaches to cancer therapy. *Retrospect and prospect. Part 1. Selective enzyme inhibitors. Current drug targets* **4**, 537-564 (2003).
12. Gao, J.H., Guo, L.J., Huang, Z.Y., Rao, J.N. & Tang, C.W. Roles of cellular polyamines in mucosal healing in the gastrointestinal tract. *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society* **64**, 681-693 (2013).

13. Skatchkov, S.N., Woodbury-Farina, M.A. & Eaton, M. The role of glia in stress: polyamines and brain disorders. *The Psychiatric clinics of North America* **37**, 653-678 (2014).
14. Pegg, A.E. The function of spermine. *IUBMB life* **66**, 8-18 (2014).
15. Loser, C., Folsch, U.R., Paprotny, C. & Creutzfeldt, W. Polyamines in colorectal cancer. Evaluation of polyamine concentrations in the colon tissue, serum, and urine of 50 patients with colorectal cancer. *Cancer* **65**, 958-966 (1990).
16. Lipton, A., Sheehan, L.M. & Kessler, G.F., Jr. Urinary polyamine levels in human cancer. *Cancer* **35**, 464-468 (1975).
17. Russell, D.H., Levy, C.C., Schimpff, S.C. & Hawk, I.A. Urinary polyamines in cancer patients. *Cancer research* **31**, 1555-1558 (1971).
18. Nowotarski, S.L., Feith, D.J. & Shantz, L.M. Skin Carcinogenesis Studies Using Mouse Models with Altered Polyamines. *Cancer growth and metastasis* **8**, 17-27 (2015).
19. Seiler, N., Delcros, J.G. & Moulinoux, J.P. Polyamine transport in mammalian cells. An update. *The international journal of biochemistry & cell biology* **28**, 843-861 (1996).
20. Seiler, N. & Raul, F. Polyamines and apoptosis. *Journal of cellular and molecular medicine* **9**, 623-642 (2005).
21. Til, H.P., Falke, H.E., Prinsen, M.K. & Willems, M.I. Acute and subacute toxicity of tyramine, spermidine, spermine, putrescine and cadaverine in rats. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* **35**, 337-348 (1997).
22. Fan, C.C. & Koenig, H. The role of polyamines in beta-adrenergic stimulation of calcium influx and membrane transport in rat heart. *Journal of molecular and cellular cardiology* **20**, 789-799 (1988).
23. Koenig, H., Goldstone, A.D. & Lu, C.Y. Polyamines are intracellular messengers in the beta-adrenergic regulation of Ca²⁺ fluxes, [Ca²⁺]_i and membrane transport in rat heart myocytes. *Biochemical and biophysical research communications* **153**, 1179-1185 (1988).
24. Ventura, C., Ferroni, C., Flamigni, F., Stefanelli, C. & Capogrossi, M.C. Polyamine effects on [Ca²⁺]_i homeostasis and contractility in isolated rat ventricular cardiomyocytes. *The American journal of physiology* **267**, H587-592 (1994).

25. Koenig, H., Goldstone, A.D., Trout, J.J. & Lu, C.Y. Polyamines mediate uncontrolled calcium entry and cell damage in rat heart in the calcium paradox. *The Journal of clinical investigation* **80**, 1322-1331 (1987).
26. Hofer, A.M., Curci, S., Doble, M.A., Brown, E.M. & Soybel, D.I. Intercellular communication mediated by the extracellular calcium-sensing receptor. *Nature cell biology* **2**, 392-398 (2000).
27. Quinn, S.J., et al. The Ca²⁺-sensing receptor: a target for polyamines. *The American journal of physiology* **273**, C1315-1323 (1997).
28. Smajilovic, S. & Tfelt-Hansen, J. Calcium acts as a first messenger through the calcium-sensing receptor in the cardiovascular system. *Cardiovascular research* **75**, 457-467 (2007).
29. Tfelt-Hansen, J., et al. Calcium receptor is functionally expressed in rat neonatal ventricular cardiomyocytes. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* **290**, H1165-1171 (2006).
30. Lenzen, S., Munster, W. & Rustenbeck, I. Dual effect of spermine on mitochondrial Ca²⁺ transport. *The Biochemical journal* **286 (Pt 2)**, 597-602 (1992).
31. Palade, P. Drug-induced Ca²⁺ release from isolated sarcoplasmic reticulum. III. Block of Ca²⁺-induced Ca²⁺ release by organic polyamines. *The Journal of biological chemistry* **262**, 6149-6154 (1987).
32. Lu, F.H., et al. Role of the calcium-sensing receptor in cardiomyocyte apoptosis via the sarcoplasmic reticulum and mitochondrial death pathway in cardiac hypertrophy and heart failure. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* **31**, 728-743 (2013).
33. Han, L., et al. Effects of polyamines on apoptosis induced by simulated ischemia/reperfusion injury in cultured neonatal rat cardiomyocytes. *Cell biology international* **31**, 1345-1352 (2007).
34. Fearnley, C.J., Roderick, H.L. & Bootman, M.D. Calcium signaling in cardiac myocytes. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **3**, a004242 (2011).
35. Nerbonne, J.M. & Kass, R.S. Molecular physiology of cardiac repolarization. *Physiological reviews* **85**, 1205-1253 (2005).
36. Silbernagl, S. *Taschenatlas Physiologie*. (2012).

37. Fabiato, A. Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. *The American journal of physiology* **245**, C1-14 (1983).
38. Balshaw, D.M., Xu, L., Yamaguchi, N., Pasek, D.A. & Meissner, G. Calmodulin binding and inhibition of cardiac muscle calcium release channel (ryanodine receptor). *The Journal of biological chemistry* **276**, 20144-20153 (2001).
39. Periasamy, M. & Kalyanasundaram, A. SERCA pump isoforms: their role in calcium transport and disease. *Muscle & nerve* **35**, 430-442 (2007).
40. Fill, M. & Copello, J.A. Ryanodine receptor calcium release channels. *Physiological reviews* **82**, 893-922 (2002).
41. Gordon, A.M., Homsher, E. & Regnier, M. Regulation of contraction in striated muscle. *Physiological reviews* **80**, 853-924 (2000).
42. Lamb, G.D. Excitation-contraction coupling in skeletal muscle: comparisons with cardiac muscle. *Clinical and experimental pharmacology & physiology* **27**, 216-224 (2000).
43. Oudit, G.Y. & Penninger, J.M. Cardiac regulation by phosphoinositide 3-kinases and PTEN. *Cardiovascular research* **82**, 250-260 (2009).
44. Crackower, M.A., et al. Regulation of myocardial contractility and cell size by distinct PI3K-PTEN signaling pathways. *Cell* **110**, 737-749 (2002).
45. Vlahos, C.J., Matter, W.F., Hui, K.Y. & Brown, R.F. A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *The Journal of biological chemistry* **269**, 5241-5248 (1994).
46. Brittsan, A.G. & Kranias, E.G. Phospholamban and cardiac contractile function. *Journal of molecular and cellular cardiology* **32**, 2131-2139 (2000).
47. Yano, N., et al. Temporally controlled overexpression of cardiac-specific PI3K α induces enhanced myocardial contractility--a new transgenic model. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* **295**, H1690-1694 (2008).
48. Jamieson, S., et al. A drug targeting only p110 α can block phosphoinositide 3-kinase signalling and tumour growth in certain cell types. *The Biochemical journal* **438**, 53-62 (2011).
49. Meana, C., et al. Correlation between endogenous polyamines in human cardiac tissues and clinical parameters in patients with heart failure. *Journal of cellular and molecular medicine* **20**, 302-312 (2016).

50. Cubria, J.C., Reguera, R., Balana-Fouce, R., Ordonez, C. & Ordonez, D. Polyamine-mediated heart hypertrophy induced by clenbuterol in the mouse. *The Journal of pharmacy and pharmacology* **50**, 91-96 (1998).
51. Bazzani, C., Genedani, S., Tagliavini, S., Piccinini, G. & Bertolini, A. Treatment with polyamine synthesis inhibitors reduces the positive inotropic effect of ouabain, noradrenaline and calcium. *Pharmacological research communications* **20**, 23-35 (1988).
52. Pignatti, C., et al. Nitric oxide mediates either proliferation or cell death in cardiomyocytes. Involvement of polyamines. *Amino acids* **16**, 181-190 (1999).
53. Giordano, E., et al. Overexpression of ornithine decarboxylase decreases ventricular systolic function during induction of cardiac hypertrophy. *Amino acids* **42**, 507-518 (2012).
54. Brixius, K. & Schwinger, R.H. Modulation of cross-bridge interaction by 2,3-butanedione monoxime in human ventricular myocardium. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* **361**, 440-444 (2000).
55. Kong, L.H., et al. [Effect of 2,3-butanedione monoxime on calcium paradox-induced heart injury in rats]. *Nan fang yi ke da xue xue bao = Journal of Southern Medical University* **36**, 633-638 (2016).
56. Zhang, J., Furukawa, R.D., Fremes, S.E., Mickle, D.A. & Weisel, R.D. Effects of butanedione monoxime and temperature on prolonged cardiac storage. *The Annals of thoracic surgery* **63**, 388-394 (1997).
57. St John Sutton, M., Ritman, E.L. & Paradise, N.F. Biphasic changes in maximum relaxation rate during progressive hypoxia in isometric kitten papillary muscle and isovolumic rabbit ventricle. *Circulation research* **47**, 516-524 (1980).
58. Solaro, R.J. Mechanisms of the Frank-Starling law of the heart: the beat goes on. *Biophysical journal* **93**, 4095-4096 (2007).
59. Wang, R., et al. Calcium and polyamine regulated calcium-sensing receptors in cardiac tissues. *European journal of biochemistry* **270**, 2680-2688 (2003).
60. Yatani, A., et al. Insights into cardioprotection obtained from study of cellular Ca²⁺ handling in myocardium of true hibernating mammals. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* **286**, H2219-2228 (2004).

61. Kondo, N. *Excitation-contraction coupling in myocardium of nonhibernating and hibernating chipmunks: effects of isoprenaline, a high calcium medium, and ryanodine. Circ Res* **59**, 221-228 (1986).
62. Uehara, A., Fill, M., Velez, P., Yasukochi, M. & Imanaga, I. *Rectification of rabbit cardiac ryanodine receptor current by endogenous polyamines. Biophysical journal* **71**, 769-777 (1996).
63. Harris, S.P., Patel, J.R., Marton, L.J. & Moss, R.L. *Polyamines decrease Ca(2+) sensitivity of tension and increase rates of activation in skinned cardiac myocytes. American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* **279**, H1383-1391 (2000).
64. Sward, K., Nilsson, B.O. & Hellstrand, P. *Inhibition of polyamine synthesis influences contractility of intestinal smooth muscle in culture. The American journal of physiology* **273**, C77-84 (1997).
65. Nilsson, B.O., Gomez, M., Santiago Carrilho, R., Nordstrom, I. & Hellstrand, P. *Differential actions of exogenous and intracellular spermine on contractile activity in smooth muscle of rat portal vein. Acta physiologica Scandinavica* **154**, 355-365 (1995).
66. Lopatin, A.N., Shantz, L.M., Mackintosh, C.A., Nichols, C.G. & Pegg, A.E. *Modulation of potassium channels in the hearts of transgenic and mutant mice with altered polyamine biosynthesis. Journal of molecular and cellular cardiology* **32**, 2007-2024 (2000).
67. Ficker, E., Taglialatela, M., Wible, B.A., Henley, C.M. & Brown, A.M. *Spermine and spermidine as gating molecules for inward rectifier K⁺ channels. Science* **266**, 1068-1072 (1994).
68. Ghigo, A., et al. *Phosphoinositide 3-kinase gamma protects against catecholamine-induced ventricular arrhythmia through protein kinase A-mediated regulation of distinct phosphodiesterases. Circulation* **126**, 2073-2083 (2012).
69. Pretorius, L., et al. *Reduced phosphoinositide 3-kinase (p110alpha) activation increases the susceptibility to atrial fibrillation. The American journal of pathology* **175**, 998-1009 (2009).
70. Woodcock, E.A., Kistler, P.M. & Ju, Y.K. *Phosphoinositide signalling and cardiac arrhythmias. Cardiovascular research* **82**, 286-295 (2009).
71. Zima, A.V. & Blatter, L.A. *Inositol-1,4,5-trisphosphate-dependent Ca(2+) signalling in cat atrial excitation-contraction coupling and arrhythmias. The Journal of physiology* **555**, 607-615 (2004).

72. Leblais, V., et al. *Phosphatidylinositol 3-kinase offsets cAMP-mediated positive inotropic effect via inhibiting Ca²⁺ influx in cardiomyocytes. Circ Res* **95**, 1183-1190 (2004).