

Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik
Abteilung Innere Medizin III
der Albert-Ludwigs-Universität
Freiburg i. Br.
Direktor: Prof. Dr. C. Bode

**Einfluss von Crataegus-Spezialextrakt WS 1442 auf
die Kontraktilität isolierter Kardiomyozyten aus
rechtsatrialem sowie linksventrikulären gesundem
und terminal-insuffizientem Myokard**

INAUGURAL – DISSERTATION
zur
Erlangung des Medizinischen Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät
der Albert-Ludwigs-Universität
Freiburg i. Br.

Vorgelegt von

Johannes von Burstin
Geboren in Jugenheim/Hessen

2001

Dekan:	Prof. Dr. rer. nat. M. Schumacher
1. Gutachter:	Prof. Dr. Ch. Holubarsch
2. Gutachter:	Prof. Dr. L. C. Rump
Jahr der Promotion:	2003

meinen Eltern

I	EINLEITUNG	7
I.1	Definition und Pathogenese der Herzinsuffizienz.....	8
I.2	Kontraktile Funktion des Herzmuskels	9
I.2.1	Zelluläre Grundlagen von Kontraktion und Relaxation	9
I.2.2	Physiologische Regulation der myokardialen Kontraktilität.....	9
I.3	Mechanismen und pathophysiologische Alterationen im Rahmen der Herzinsuffizienz.....	12
I.4	Therapie der Herzinsuffizienz	14
I.5	WS 1442	17
I.5.1	Geschichtliches	17
I.5.2	Herstellung und Inhaltsstoffe.....	18
I.5.3	Klinische Anwendung von WS 1442	21
I.6	Fragestellung dieser Arbeit	22
II	MATERIAL UND METHODEN	23
II.1	Untersuchtes Gewebe.....	23
II.1.1	Ventrikelmyokard	24
II.1.2	Vorhofmyokard	25
II.2	Medikation der Patienten	27
II.3	Lösungen	27
II.3.1	Nährstofflösung (Tyrode)	27
II.3.2	Low-Calcium-Lösung und Enzymlösung.....	27
II.3.3	Wirkung von 2,3-Butanedione-Monoxime (BDM) und Nitrotriacetic-Säure (NTA).....	29
II.4	Substanzen	29
II.4.1	Substanzen für die Lösungen	29
II.4.2	Protease, Hyaluronidase und Collagenase.....	29
II.4.3	Versuchssubstanzen.....	30
II.5	Transport.....	30
II.6	Präparation	30
II.6.1	Präparation des Ventrikelmyokards	31
II.6.2	Präparation des Vorhofmyokards	31
II.7	Zellisolierung.....	31
II.8	Messung der Kontraktilität der Myozyten	32
II.8.1	Versuchsaufbau.....	32
II.8.1.1	Küvettensystem.....	33
II.8.1.2	Mikroskop.....	34

II.8.1.3 Zellendetektion	35
II.8.1.4 Stimulation	37
II.8.1.5 Registrierung der Zellkontraktion.....	37
II.8.2 Allgemeine Versuchsvorbereitungen	37
II.8.3 Versuche mit Crataegus	38
II.8.4 Auswertung.....	40
II.8.4.Normierung der Daten und statistische Auswertung	40
III ERGEBNISSE.....	42
III.1 Untersuchungen von WS 1442 an ventrikulären Myozyten.....	42
III.1.1 Untersuchungen, die mit WS 1442 an Myozyten aus terminal- insuffizientem linksventrikulärem Myokard (NYHA IV) durchgeführt wurden	42
III.1.2 Versuche mit WS 1442, die an Myozyten aus nicht insuffizientem linksventrikulärem Myokard durchgeführt wurden.....	45
III.2 Einfluß des Crataegus-Gesamtextraktes WS 1442 auf die Kontraktilitätsparameter rechtsatrialer Myozyten	47
III.3 Wirkung der Crataegus-Subextrakte Crs-Blr 80242 A, B und C auf isolierte rechtsatriale Myozyten	50
III.3.1 Funktionelle Effekte von Crs-Blr 80242 A auf rechtsatriale Myozyten ...	50
III.3.2 Funktionelle Effekte von Crs-Blr 80242 B auf rechtsatriale Myozyten ...	53
III.3.3 Funktionelle Effekte von Crs-Blr 80242 C auf rechtsatriale Myozyten ...	56
IV DISKUSSION.....	59
IV. 1 Methode zur Gewinnung von isolierten Kardiomyozyten	61
IV.1.1 Isolation	61
IV.1.2 Kontraktile Reserven und Rezeptoren.	63
IV.1.2.1 Calcium-Konzentrations-Wirkungs-Analyse	63
IV.1.2.2 Isoproterenol-Konzentrations-Wirkungsanalyse	63
IV.2 Funktionelle Effekte des Crataegus-Gesamtextraktes WS 1442 auf die Kontraktilität isolierter linksventrikulärer humaner Myozyten.....	66
IV.2.1 Wirkung von WS 1442 an isolierten linksventrikulären humanen Kardiomyozyten aus terminal-insuffizientem Myokard (NYHA IV)	66
IV.2.2 Wirkung von WS 1442 an isolierten linksventrikulären humanen Myozyten aus nicht insuffizientem Myokard.....	66
IV.3 Wirkung von WS 1442 an isolierten rechtsatrialen humanen Myozyten.....	67
IV.4 Funktionelle Effekte der Subextrakte Crs-Blr 80242 B, A und C auf die Kontraktilität rechtsatrialer Myozyten	69
IV.5 Zusammenfassende Beurteilung	75
IV.6 Klinische Bedeutung	82

IV.7	Ausblick.....	83
V	ZUSAMMENFASSUNG	84
VI	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	85
VII	TABELLENVERZEICHNIS.....	87
VIII	LITERATURVERZEICHNIS.....	89
IX	LEBENS LAUF	105
X	DANKSAGUNGEN.....	106

I Einleitung

Bei der Herzinsuffizienz handelt es sich um eine progrediente Erkrankung, die in den Industrieländern mit einer hohen Prävalenz auftritt.

Im Verlauf der letzten Jahre wurde vermehrt nach neuen Therapieansätzen gesucht und dabei hatte sich gezeigt, daß die Ursachen der Herzinsuffizienz primär nicht in einer hämodynamischen Dysregulation zu liegen scheinen, sondern sie ist nach neueren Vorstellungen vielmehr eine Folge endogener neurohumoraler Prozesse, die sowohl bei der Entstehung als auch bei der Progredienz eine Rolle zu spielen scheinen.

Die Ursachenforschung auf dem Gebiet der Herzinsuffizienz unterliegt einem raschen Wandel, wodurch auch die Therapiestrategien häufig Neu- und Umbewertungen unterzogen werden. Die heutige Therapie besteht zumeist in der Gabe von Diuretika, Hemmstoffen des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS), Digitalis-Glykosiden und β -Rezeptorblockern. Jedoch läßt sich im immer größer werdenden Anteil der Phytopharmaka auf dem Markt auch auf dem Gebiet der Therapie der Herzinsuffizienz ein Vertreter dieser Gattung wiederfinden. Hierbei handelt es sich um einen Extrakt aus Weißdorn (*Crataegus*), der vorwiegend Patienten verabreicht wird, deren Herzinsuffizienz gemäß einem Vorschlag der New York Heart Association als Schweregrad zwei (NYHA II) eingestuft wird. Dieser Extrakt, im weiteren Verlauf als WS 1442 bezeichnet, hat schon im Tiermodell [19], [58], an humanen Myokardstreifenpräparaten [13] und in vielen klinischen Studien [28], [61], [105], [104] seine kardiale Wirksamkeit unter Beweis gestellt, wobei die Wirkmechanismen stets umstritten blieben [63], [13], [92]. WS 1442 soll in dieser Arbeit hinsichtlich seiner Wirkung auf isolierte menschliche Kardiomyozyten untersucht werden.

I.1 Definition und Pathogenese der Herzinsuffizienz

Die Herzinsuffizienz wird als derjenige Zustand definiert, bei dem das Herz nicht mehr in der Lage ist, die Peripherie trotz ausreichendem venösem Rückfluß entsprechend den Bedürfnissen des Organismus mit Blut zu versorgen [54]. Demzufolge ist die Herzinsuffizienz keine eigenständige Diagnose, sondern ein klinisches Syndrom. Die Herzinsuffizienz ist eine progrediente Erkrankung mit einer schlechten Prognose, wie eine großangelegte Studie (Framingham-Studie) zeigte: In den ersten zwei Jahren nach der Diagnosestellung starben bereits 38% der weiblichen und 37% der männlichen Erkrankten. Nach weiteren vier Jahren waren von dem beobachteten Kollektiv nur noch 33% der Frauen am Leben, bei den Männern hingegen nur noch 18% [68], [35]. Die Zahl der weltweit jährlich Neuerkrankten beläuft sich auf 15 Millionen, die meisten davon leben in den Industrienationen [9].

Obwohl die Ursachen einer Herzinsuffizienz sehr vielfältig sind, endet die Erkrankung meist als ischämische Kardiomyopathie, die mit 70% die häufigste Form der Kardiomyopathie darstellt [37], oder als dilatative Kardiomyopathie. Die Störung der ventrikulären Pumpfunktion kann direkt myokardial bedingt sein (z. B. Ischämie, Myokarditis) oder aber extramyokardiale Ursachen haben (z. B. Herzklappenvitien, arterieller Hypertonus), was dann sekundär zu einer Herzinsuffizienz führen kann. Letztlich resultieren alle Ursachen in einer verminderten Auswurfleistung des Herzens, die eine Blutstauung im Lungenkreislauf (Linksherzinsuffizienz) oder im gesamten venösen System (Globalinsuffizienz) hervorruft. Als Folge davon nimmt der arterielle Perfusionsdruck ab. Dieser Druckabfall wird mit neurohumoralen Kompensationsmechanismen beantwortet, was wiederum eine Erhöhung des peripheren Widerstandes zur Folge hat. Bleibt dieser Zustand der Nachlasterrhöhung bestehen, kommt es früher oder später zu einer kardialen Dekompensation.

I.2 Kontraktile Funktion des Herzmuskels

I.2.1 Zelluläre Grundlagen von Kontraktion und Relaxation

Die koordinierte Kontraktion und Relaxation des Herzmuskels werden im wesentlichen durch die elektromechanische Kopplung bestimmt. Diese sorgt für die regelrechte Funktion des Herzens. Während der Depolarisation der Zellmembran des einzelnen Myozyten strömt Ca^{2+} über spannungsabhängige sarkolemmale Ca^{2+} -Kanäle in das Zellinnere. Dort kommt es dann über den sogenannten Ca^{2+} -induced Ca^{2+} -Release zu einer Freisetzung des im sarkoplasmatischen Retikulum (SR) gespeicherten Ca^{2+} [31]. Diese Freisetzung geschieht durch die als Ryanodinrezeptoren bezeichneten Ca^{2+} -Kanäle des SR, die in unmittelbarer Nachbarschaft zu den sarkolemmalen Ca^{2+} -Kanälen liegen. Das nun in erhöhter Konzentration vorliegende Ca^{2+} bindet an das Regulatorprotein Troponin C und sorgt dort für eine Konformationsänderung des Troponin-Tropomyosin-Komplexes und ermöglicht dadurch eine Aktivierung des Querbrückenzyklus zwischen Aktin und Myosin.

Die Relaxation erfolgt durch die Dissoziation von Ca^{2+} von Troponin C. Das freie Ca^{2+} wird vor allem über die Ca^{2+} -ATPase des SR (SERCA) in das SR aufgenommen, und nur ein geringer Teil des Ca^{2+} wird über den $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher nach extrazellulär sequestriert. Ein noch kleinerer Teil wird primär energieabhängig über die sarkolemmale Ca^{2+} -ATPase aus dem Intrazellulärraum entfernt.

Das SR ist also der wichtigste Ca^{2+} -Speicher. Die Aufnahme des Ca^{2+} kann über die SERCA gesteuert werden: Durch Phosphorylierung des Regulatorproteins Phospholamban kommt es zu einer Steigerung der SERCA-Aktivität und so zu einer schnelleren Elimination zytosolischen Calciums [23].

I.2.2 Physiologische Regulation der myokardialen Kontraktilität

Besteht im Organismus ein Mißverhältnis zwischen angebotener und benötigter Blutmenge, so versucht der Körper, die Auswurfmenge des Herzens kurzfristig

über eine Steigerung der Kontraktilität zu erhöhen. Unter einer Kontraktilitätszunahme versteht man das Vermögen des Herzens, entweder bei gleicher Ejektionsfraktion einen höheren Druck zu überwinden, oder bei gleichem Druck die Ejektionsfraktion zu erhöhen. Dabei stehen dem Herzen zwei prinzipielle Möglichkeiten zur Verfügung:

1) Erhöhung des intrazellulären Calciumgehaltes

Die Erhöhung des intrazellulären Gehaltes von Ca^{2+} kann über drei Mechanismen erfolgen:

- **Frequenz-Inotropie:** Mit der Vermehrung der Erregungen pro Zeiteinheit steigt auch der Ca^{2+} -Einstrom pro Zeiteinheit an, was in einer verstärkten intrazellulären Speicherung resultiert. Das dann im SR in erhöhter Konzentration gespeicherte Ca^{2+} steht nun auch für die folgenden Kontraktionen zur Verfügung.
- **Sympathiko-adrenerge Aktivierung:** Bei einer Freisetzung von Noradrenalin aus den sympathischen Nervenendigungen oder von Adrenalin aus dem Nebennierenmark kommt es zu einer über den β_1 -Rezeptor und die Adenylatcyclase vermittelten Erhöhung der intrazellulären Konzentration von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) mit einer sich daran anschließenden Aktivierung der Proteinkinase A. Dies hat wiederum eine Modifizierung von zellulären Proteinen zur Folge, zum Beispiel von Phospholamban, den L-Typ- Ca^{2+} -Kanälen, den myofibrillären Proteinen (Troponin C und I) und des Ryanodinrezeptors am SR. Das Resultat ist abermals eine vermehrte, aber auch beschleunigte (Wieder-) Aufnahme von Ca^{2+} in das SR, was sowohl in einer gesteigerten Kontraktionskraft (positive Inotropie) als auch in einer schnelleren Relaxation (positive Lusitropie) resultiert. Eine geringere Bedeutung kommt der α -adrenozeptorvermittelten Katecholaminwirkung am Herzen zu. Hierbei wird über einen G-Protein gekoppelten Prozeß die Phospholipase C (PLC) aktiviert, die aus Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphat (PIP_2) Inositoltriphosphat (IP_3) und 1,2-Diacylglycerol (DAG) freisetzt [56], [90], [101]. IP_3 führt direkt zu einer Freisetzung von Ca^{2+} aus dem SR, DAG aktiviert die Proteinkinase C (PKC), die sowohl den Ca^{2+} -Einstrom, als auch die kontraktilen Proteine selbst modifiziert.

- Endogene Peptide:

Bei den für die Aktivierung der myokardialen Kontraktilität verantwortlichen Peptiden nehmen Angiotensin II (A II) und Endothelin-1 (ET-1) eine zentrale Rolle ein [78]. Für beide Peptide sind positiv inotrope Effekte an humanem Vorhofgewebe nachgewiesen worden [50], [69]. Am Ventrikelmyokard konnte jedoch nur für ET-1 eine Inotropiezunahme gezeigt werden [71]. Der genaue Wirkmechanismus ist nur unzureichend bekannt und ist Gegenstand der aktuellen Forschung, es scheinen jedoch die PKC sowie ein sarkolemmaler Na^+/H^+ -Austauscher für die positive Inotropie mitverantwortlich zu sein [71].

2) Sensitivitätssteigerung der kontraktilen Proteine für Calcium

Dieser Mechanismus, nach seinen Entdeckern auch als Frank-Starling-Mechanismus bekannt, beruht auf einer erhöhten diastolischen Füllung und damit einer Dehnung der Sarkomere, die mit einer gesteigerten Kontraktilität einhergeht [33], [97]. Diese Kontraktilitätszunahme bei erhöhtem enddiastolischen Volumen wird gegenwärtig wie folgt erklärt:

- Die Dehnung der Sarkomere bedingt eine erhöhte Ca^{2+} -Sensitivität der Myofilamente [3], [55], [96]. Dieser Mechanismus ist von herausragender Bedeutung.
- Dehnung und Verlängerung der Sarkomere führen zum einen zu einer erhöhten Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR [30], zum anderen wird dadurch eine bessere Überlappung der Myofilamente gewährleistet, was eine verstärkte Querbrückenaktivierung zur Folge hat [2], [79], [103].

I.3 Mechanismen und pathophysiologische Alterationen im Rahmen der Herzinsuffizienz

Die Ursachen der chronischen Herzinsuffizienz werden als sehr vielfältig angesehen und unterliegen je nach dem Stand der gegenwärtigen Forschung einem Wandel. Wurde die chronische Herzinsuffizienz zu Anfang als ein Problem der exzessiven Salz- und Wasserretention angesehen (kardiorenales Modell) [77], wechselte man später zu dem sogenannten kardiozirkulatorischen Modell [77], in dem die Herzinsuffizienz als Ergebnis einer abnormen Pumpkapazität und ausgeprägter peripherer Vasokonstriktion verstanden wurde. Heute wird die Entstehung der chronischen Herzinsuffizienz jedoch wie folgt erklärt :

Am Beginn der Erkrankung steht ein initiales Ereignis, das den Herzmuskel schädigt und in einem Funktionsverlust der Kardiomyozyten resultiert. Dieses Ereignis mag im Fall eines Myokardinfarktes abrupt, im Rahmen einer chronischen Druck- und / oder Volumenbelastung schrittweise oder aber durch genetische Veranlagung bei Kardiomyopathien auftreten. Den Initialereignissen ist jedoch gemeinsam, daß sie in einer Reduktion des Pumpvermögens des Herzens enden. Um dieses Defizit auszugleichen, reagiert der Organismus mit einer Reihe von neurohumoralen Kompensationsmechanismen wie Erhöhung des Tonus des sympathischen Nervensystems, vermehrter Salz- und Wasserretention infolge einer Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS), aber auch mit der Ausschüttung vasodilatatorischer Moleküle, zum Beispiel natriuretischer Peptide, Prostaglandine und Stickoxid [26], [27]. Aufgrund dieser Gegenregulationen bleiben die Patienten über längere Zeit minimal symptomatisch oder sogar asymptomatisch. Im weiteren Verlauf kommt es dann zu einer symptomatischen Herzinsuffizienz, die mit einer weiteren Entgleisung neurohumoraler und zytokiner Systeme verbunden ist. Weiterhin treten eine Serie adaptiver Veränderungen des Myokards an sich auf, was auch als Remodeling bezeichnet wird.

In diesem neurohumoralen Modell geht man davon aus, daß die Überexpression biologisch aktiver Moleküle, wie z. B. Noradrenalin, Angiotensin II (A II), Aldosteron, Endothelin (ET) und Tumornekrosefaktor (TNF) toxische Effekte auf

Herz und Kreislauf ausüben [11] [98]. Darüber hinaus sind A II, TNF und ET als Wachstumsfaktoren bekannt [86], [106], [53].

Die Veränderungen des Herzens im Zuge der Herzinsuffizienz sind sehr vielfältig und spielen sich auf verschiedenen Ebenen ab. Auf zellulärer Ebene ereignen sich unterschiedliche Prozesse, die gemeinsam einen Funktionsverlust von Kardiomyozyten bedingen. Dazu gehören eine Verminderung des Gehalts an α -myosin heavy chain bei gleichzeitiger Zunahme von β -myosin heavy chain [64], progressiver Verlust von Myofilamenten, Alterationen von Bestandteilen des Zytoskeletts [87], sowie eine Desensitierung des β -adrenergen Signalweges [12], [32] und Änderungen in der Calciumhomöostase. Während nämlich im gesunden Myokard das Ca^{2+} in der Diastole vorwiegend über die Ca^{2+} -ATPase des SR (SERCA) in das SR und nur ein geringer Anteil des Ca^{2+} über den $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher nach extrazellulär transportiert wird, gewinnt der $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher am insuffizienten Myokard an Bedeutung und die der SERCA nimmt im gleichen Zuge ab, so daß es bei hohem diastolischem Ca^{2+} -Gehalt zu einem vermehrten Auswärtstransport von Ca^{2+} kommt. Dies hat zur Folge, daß der oben beschriebene Mechanismus der Frequenz-Inotropie nicht mehr greifen kann und sich sogar umkehrt, so daß es bei hohen Schlagfrequenzen zu einer Abnahme der entwickelten Kontraktionskraft kommt (negative Kraft-Frequenz-Beziehung).

Die nächste Stufe der Veränderungen stellt das Myokard dar. Zum einen kommt es sowohl durch Nekrose als auch durch Apoptose zu einer vermehrten Anzahl von Zelluntergängen. Es wird vermutet, daß beide Vorgänge durch ein Übermaß von biologisch aktiven Molekülen zustande kommen, was in verschiedenen Versuchsmodellen nachgewiesen werden konnte [98], [65]. Apoptose wird unter Umständen auch durch übermäßige Dehnung des Myokards und oxidativen Streß induziert [20], [60]. Zum anderen kommt es zu einer Fibrose des Myokards. Auch hier wird davon ausgegangen, daß A II, ET und Aldosteron eine Fibrose induzieren können. Weiterhin aktivieren TNF und auch andere Zytokine kollagenolytische Enzyme, was das sogenannte myocyte slipping, eine Verdünnung der Ventrikelwand und eine Dilatation zur Folge hat. In ausgeprägten Fällen kann es dabei sogar zu einer Mitralklappeninsuffizienz kommen.

Diese Veränderungen verursachen einen Umbau der Ventrikelgeometrie mit einer Verschlechterung der Herzmechanik. Durch die Dilatation kommt es zu einem erhöhten enddiastolischen Volumen, was wiederum mit einer vermehrten Wandspannung verbunden ist. Dies bedingt einerseits einen erhöhten Sauerstoffbedarf, andererseits jedoch ein verringertes Sauerstoffangebot durch episodische subendokardiale Hypoperfusion. Durch die jetzt nochmals verschlechterte Pumpfunktion kommt es zu einer wiederum erhöhten Freisetzung biologisch aktiver Moleküle; es liegt ein circulus vitiosus vor.

I.4 Therapie der Herzinsuffizienz

Prinzipiell sind zwei Formen der Herzinsuffizienz zu unterscheiden: Die akute myogene Herzinsuffizienz, die hier nur kurz angesprochen werden soll, und die chronische Herzinsuffizienz.

Bei der akuten Herzinsuffizienz ist die Ursache in einem Mangel an energiereichen Phosphaten zu suchen und wird demzufolge auch als Mangelinsuffizienz bezeichnet. Die akute Herzinsuffizienz wird mit Hemmstoffen der Phosphodiesterase III und Katecholaminen behandelt [89]. Mit der Verabfolgung dieser Substanzen wird ein positiver inotroper Effekt erreicht.

Bei der Behandlung der chronischen Herzinsuffizienz kommen andere Substanzen zum Einsatz, wobei die Digitalis-Glykoside bislang eine entscheidende Rolle einnehmen. Es konnte allerdings gezeigt werden, daß die Gabe von Digitalis-Glykosiden die Mortalitätsrate nicht senken konnte, neuere Ergebnisse sprechen sogar für einen Anstieg [62]. Weiterhin ist eine geringe Verschlechterung der diastolischen Funktion beschrieben worden, wenn Digitalis bei systolischer Herzinsuffizienz über längere Zeit eingesetzt wird [45]. Ein weiteres Problem der Digitalistherapie stellt die individuelle Sensibilität der Patienten gegenüber dem Glykosid dar, die durch verschiedene Rezeptorsubtypen verursacht wird. Eine neue Veröffentlichung von Matsumori et al. beschreibt sogar den Anstieg von Zytokinen innerhalb des Herzmuskels durch Digitalisgabe bei einer durch Myokarditis verursachten Herzinsuffizienz [67], was hinsichtlich der neuesten Erkenntnisse über die Pathophysiologie der

Herzinsuffizienz von Bedeutung ist. Dagegen besserte sich die Lebensqualität der Patienten und diese wurden weniger oft hospitalisiert, was sowohl aus Sicht des Patienten als auch aus volkswirtschaftlichen Gründen wichtig ist [6], [85], [48]. Weiterhin ist zu berücksichtigen, daß Digitalis-Glykoside durch direkte Erhöhung des Herzminutenvolumens der auslösenden Ursache für eine neurohumorale Überreaktion entgegenwirken. Schon vor mehr als 35 Jahren entdeckten Mason und Braunwald, daß intravenös verabreichtes Ouabain, ein schnell wirkendes Glykosid, den vaskulären Widerstand und Blutdruck bei Gesunden erhöhte, während bei Patienten mit fortgeschrittener Herzinsuffizienz ein gegenteiliger Effekt eintrat [66].

Diuretika [8] und Vasodilantien [22] (ohne Hemmstoffe des Angiotensin-Konversionsenzym) senken die Vor- und die Nachlast des Herzens. Für die Vasodilantien ist darüber hinaus nachgewiesen, daß sie die Mortalitätsrate bei Herzinsuffizienz herabsetzen [21].

Mit der Gabe von β -Rezeptorblockern versucht man, der adrenergen Überstimulation entgegenzuwirken, mit der Folge, daß zwar einerseits die Kontraktilität des Herzmuskels abnimmt, aber auf der anderen Seite, und dies ist der erwünschte Effekt, der Sauerstoffverbrauch des Myokards ebenfalls gesenkt wird [29]. Als weiterer vermuteter Effekt der β -Rezeptorblockade ist die verminderte Herunterregulierung der β -Rezeptoren und der nachgeschalteten Enzyme zu nennen [47].

Daß β -Rezeptorblocker nicht nur eine Linderung der Symptome, sondern auch eine wirkliche Lebensverlängerung bewirken, ist bereits in zwei Studien belegt worden, nämlich in der MDC-Studie (The Metoprolol in Dilated Cardiomyopathy Trial Study) [7] und der CIBIS (Cardiac Insufficiency Bisoprolol Study) [59]. Im Rahmen der MDC-Studie konnte ermittelt werden, daß die Patienten, die mit Metoprolol behandelt wurden, sich signifikant seltener einer Transplantation unterziehen mußten als diejenigen, die mit einem Placebo behandelt wurden. Weiterhin stieg sowohl die Lebensqualität, als auch die Lebenserwartung der mit Metoprolol behandelten Patienten.

In der zweiten Mortalitätsstudie wurde die Wirkung von Bisoprolol an 557 Patienten auf die Hämodynamik untersucht. Dabei konnte eine signifikante

Senkung der Herzfrequenz bei gleichzeitigem Anstieg der linksventrikulären Verkürzungsfraktion beobachtet werden, was mit einer verminderten Mortalität korreliert. Erstaunlich ist das Ergebnis einer Veröffentlichung von Gottlieb et al. [38]: Bei Patienten, die nach einem Herzinfarkt mit β -Rezeptorblockern behandelt worden waren, sank die Mortalität um 40%.

Ein heute weit verbreiteter Therapieansatz ist die Hemmung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS), was auf zwei verschiedene Weisen möglich ist. Die Hemmung des RAAS bringt nicht nur eine Vasodilatation mit anschließender Nachlastsenkung [22], sondern erwiesenermaßen auch eine Symptomverbesserung [84] und eine Reduzierung der kardialen Hypertrophie [73]. Angiotensin II (A II) wird aus seinem Vorläufer Angiotensin I (A I) mittels des Angiotensin-Konversionsenzyms (ACE, angiotensin converting enzyme) gebildet, A I wird wiederum durch die Protease Renin aus Angiotensinogen abgespalten. In der Unterbrechung dieser Kaskade liegt auch der erste Schritt zur Hemmung des RAAS. Es wird versucht, die Umwandlung von A I zu A II durch das Konversionsenzym zu hemmen. Eine Studie mit dem ACE-Hemmer Captopril konnte jedoch zeigen, daß auch eine unerwünschte proarrhythmogene Wirkung, die sich in einer Verlängerung der QT-Zeit äußerte, auftrat. Die zweite Methode, das RAAS zu hemmen, besteht darin, den Rezeptor für A II zu blockieren. Die ELITE-I-Studie (Evaluation of Losartan in the elderly) hatte gezeigt, daß eine proarrhythmogene Wirkung ausblieb und darüber hinaus eine bessere Verträglichkeit zu verzeichnen war [15]. In weiteren Studien (ELITE-II und RESOLVD-Studie) konnte die scheinbar günstigere Wirkung von Rezeptorantagonisten nicht bestätigt werden [107].

Wenn man berücksichtigt, daß eine Therapie, die nur eine Verbesserung der Hämodynamik zum Ziel hat, zwar eine Symptomverbesserung bewirkt, die Progredienz aber nicht aufhalten kann, so kommt man zu dem Schluß, daß die Progredienz in erster Linie durch eine neurohumorale Überstimulation bedingt ist. Eine Therapie, die die gesteigerte Aktivität des neurohumoralen Systems blockiert, führt nicht nur zu einer hämodynamischen Verbesserung, sondern auch zu einer Reduktion des ventrikulären Remodelings und damit zu einem lebensverlängernden Therapieerfolg.

I.5 WS 1442

I.5.1 Geschichtliches

Der Weißdorn, im Lateinischen als Crataegus, im englischen Sprachgebrauch als Hawthorne bezeichnet, wurde bereits von Disokruides, einem römischen Wander- und Militärarzt zu Neros Zeiten, erstmals als Heilmittel benutzt.

Im Mittelalter erfolgte schon die spezifische Anwendung in Form eines Sirups als „herzstärkendes Mittel“ durch den Leibarzt Wilhelms IV, Quercetanus (1544–1609). Während der irische Arzt Green in der zweiten Hälfte des neunzehnten Jahrhunderts den Weißdorn als Therapeutikum verschiedener Herzerkrankungen einsetzte, wurde auf dem sechsten homöopathischen Kongreß in Nizza wenig später über die erfolgreiche Anwendung von Crataegus bei verschiedenen Erkrankungen des Herzens, vor allen Dingen bei Myokardschäden und koronaren Durchblutungsstörungen, berichtet.

1930 erfolgte erstmals die systematische Untersuchung am Menschen durch Assmann, und gleichzeitig begann die gezielte Erforschung der Crataegus-Inhaltsstoffe durch Baechler aus Basel, der damit den Grundstein für weitere Forschung legte. 1941 erfolgte dann endgültig die Aufnahme in das Ergänzungsbuch zu dem Deutschen Arzneimittelbuch Nr. 6 (DAB 6).

I.5.2 Herstellung und Inhaltsstoffe

Der Crataegus-Extrakt WS 1442 wird aus getrockneten Blättern und Blüten gewonnen. Dabei handelt es sich um einen ethanolischen Auszug (Ethanol 45% m/m), wobei die Pflanzen *Crataegus monogyna* und *oxycantha* (Synonym: *laevigata*) verwendet werden. Der Extrakt WS 1442 ist auf 18,75% oligomere Procyanidine (OPC) standardisiert. Für Crataeguspflanzen sind zahlreiche Bestandteile beschrieben worden, sie enthalten unter anderem:

- Verschiedene Säuren wie Ursolsäure, Crataegolsäure, Kaffeesäure und Chlorogensäure.
- biogene Amine in Spuren wie Serotonin, Noradrenalin, Dopamin, Tyramin, Phenylethylamin und Hydroxyindolsäure.

Als wesentliche und auch wirksamkeitsbestimmende Stoffe werden jedoch die Flavonoide und die oligomeren Procyanidine (OPC) genannt.

Flavonoide, das sind Flavone und Flavonole, die in ihrer natürlichen Form an Zucker gebunden und somit als Glykoside vorliegen. Das Grundgerüst der Flavone stellt das Apigenin und das Luteolin dar, und sie kommen sowohl als C- und auch als O-Glykoside vor. Die Flavonole mit den Grundbausteinen Quercetin, Kämpferol und 8-Methoxykämpferol kommen dagegen nur als O-Glykoside vor.

Da die Stoffgruppe der Flavonoide sehr komplex ist, sieht das Deutsche Arzneimittelbuch (DAB 1997) in der Monographie „Weißdornblätter mit Blüten“ ein Analyseverfahren vor, bei dem der Gehalt an Flavonoiden nach Hydrolyse photometrisch gemessen wird. Hierbei findet jedoch keine Differenzierung von Flavonoiden in einzelne Flavonole und Flavone statt, da dies mit der beschriebenen Methode nicht möglich ist. Weiterhin werden dabei auch die nicht hydrolysierbaren C-Glykoside mit diesem Verfahren nicht erfaßt. Der Flavonoidanteil beträgt nach dieser Methode bei dem Extrakt WS 1442 2%, der wahre Gehalt dürfte aber um den Faktor 2–3 höher liegen.

Procyanidine sind Verknüpfungen von Catechin und / oder Epicatechin. Sind die Monomere untereinander einfach verknüpft, so spricht man von A-Procyanidinen.

In Crataeguspflanzen sind neben den dimeren Procyanidinen B1–B4 auch trimere C–Procyanidine nachgewiesen worden. Von oligomeren Procyanidinen spricht man definitionsgemäß bei einer Anzahl von $n=2$ bis $n=8$ Grundbausteinen.

Aufgrund ihrer Komplexität (Stereoisomerie, Polymerisationsgrad) bereiten auch die OPCs große analytische Schwierigkeiten. Um jedoch nähere Hinweise auf die Wirkungen von OPCs zu erhalten, wurde der Gesamtextrakt nach folgender Methode fraktioniert: Der Extrakt wurde in Reinstwasser eingerührt und homogenisiert, anschließend wurde mit Essigester ausgeschüttelt. Die Essigesterphase wurde dann an einem Rotationsverdampfer eingeeengt. Die essigesterlösliche Substanz wird im folgenden als Fraktion A oder Crs-Blr 80242 A bezeichnet. Die Wasserphase wurde dann mit Ethanol verdünnt und anschließend bei einem Druck von 1,8 – 2,2 bar ultrafiltriert. Das Retentat wird nun als Fraktion C bezeichnet, das Filtrat als Fraktion B (Crs-Blr 80242 C resp. B). Die Fraktionierung ist in Abbildung 1 dargestellt, die Zusammensetzung des Gesamtextraktes und der Fraktionen ist in Tabelle 1 aufgeführt.

	Ausbeute aus dem Extrakt [%]	Flavonoide [%]	Oligomere Procyanidine [%]
WS 1442		4,85	18,75
Fraktion A	12,5	14,9	12,5
Fraktion B	67,9	4,1	10,5
Fraktion C	21,3	<0,004	57,8

Tabelle 1: Zusammensetzung des Gesamtextraktes und der daraus gewonnenen Fraktionen hinsichtlich des Gehalts an Flavonoiden und OPCs.

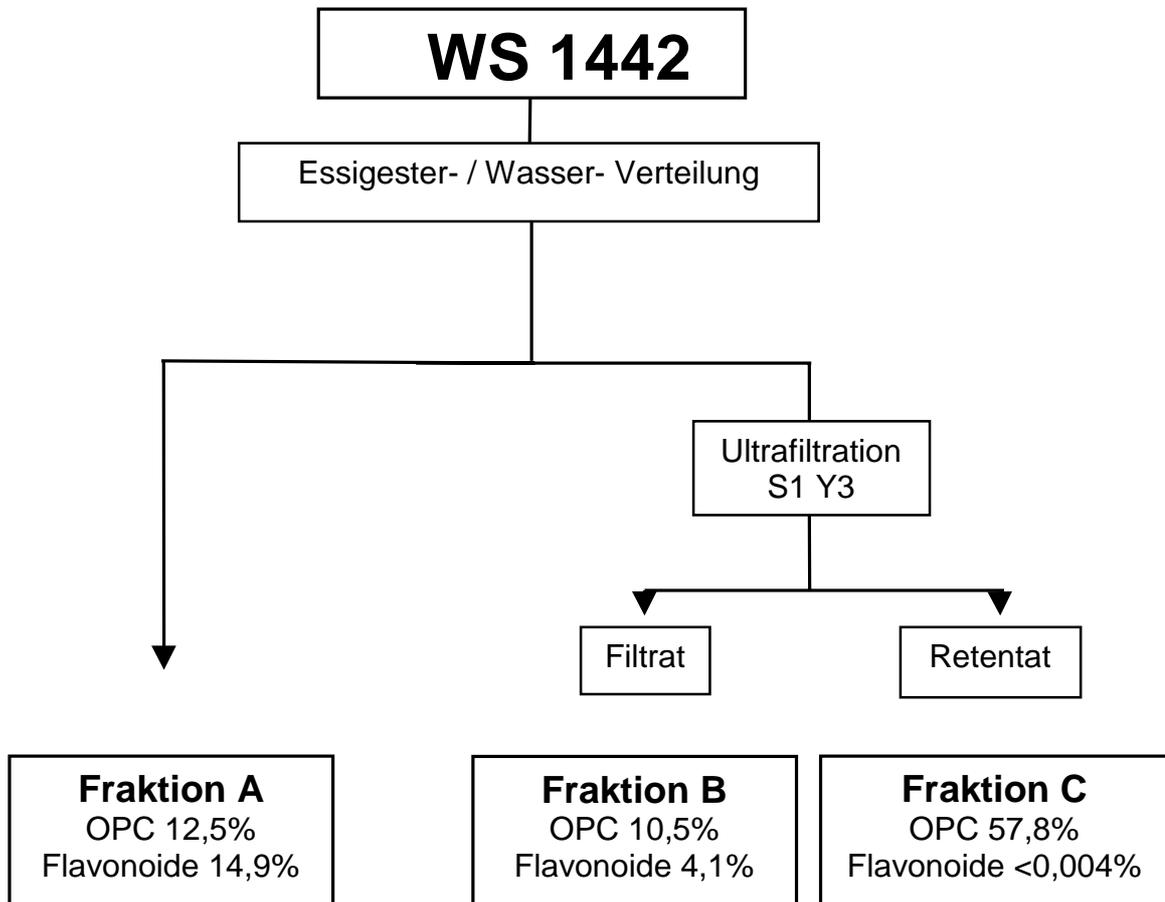


Abbildung 1: Fraktionierungsschema für WS 1442 und die drei Fraktionen A, B und C.

I.5.3 Klinische Anwendung von WS 1442

Der Crataegus-Extrakt WS 1442 wird vornehmlich Patienten mit leichter bis mittelgradiger Herzinsuffizienz (NYHA I-II) verordnet. Bisher sind zu Crataegus-Extrakten einige klinische Studien durchgeführt worden, wobei hier betont werden soll, daß für die klinische Erprobung eines Phytopharmakons exakt die gleichen Anforderungen und Kriterien gelten wie für synthetisch gewonnene Substanzen. Das heißt also, daß von Crataegus eine verbesserte Lebensqualität, eine Abnahme der Mortalität sowie eine Zunahme der Lebensdauer unter der Therapie gefordert wird.

Leuchtgens [61] veröffentlichte 1993 die Ergebnisse einer placebokontrollierten Doppelblindstudie, in der 30 Patienten mit Herzinsuffizienz NYHA II über die Dauer von acht Wochen mit einer Tagesdosis von 160 mg/d behandelt wurden. Zielgrößen waren das Druck-Frequenz-Produkt des linken Herzens bei Belastung auf dem Ergometer sowie eine subjektiv empfundene Verbesserung der Symptomatik. Nach den acht Wochen gaben die Patienten eine Verbesserung des Allgemeinbefindens an, eine Abnahme des Druck-Frequenz-Produktes bei ergometrischer Belastung konnte nachgewiesen werden. Eine weitere Studie [105] mit 136 Patienten, die aber sonst unter identischen Bedingungen ablief, offenbarte zwar eine Abnahme des Druck-Frequenz-Produktes, führte jedoch nicht zu einer subjektiven Abnahme der Symptomatik. In zwei weiteren Studien konnte gezeigt werden, daß bei Patienten mit Herzinsuffizienz NYHA II und einer Ejektionsfraktion (EF) < 55% die Gabe von WS 1442 über einen Zeitraum von vier Wochen mit einer Tagesdosis von 240 mg/d [104] bzw. 480 mg /d [28] eine signifikante Steigerung der EF zur Folge hatte.

I.6 Fragestellung dieser Arbeit

WS 1442 wurde bislang nicht an isolierten Kardiomyozyten untersucht, die Ergebnisse anderer Studien sind mitunter recht widersprüchlich. Die hier vorgenommene Untersuchung an isolierten Kardiomyozyten schließt eine Beteiligung und Beeinflussung der Myozyten durch andere Zellen aus.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die pharmakologische Wirksamkeit von WS 1442 und seiner Fraktionen an isolierten Kardiomyozyten zu prüfen.

- Hat WS 1442 an isolierten Myozyten aus nicht terminal-insuffizientem Myokard eine positive inotrope Wirkung?
- Wirkt WS 1442 auch an Myozyten aus terminal-insuffizientem Myokard?
- Gibt es einen Unterschied hinsichtlich der Wirkung an insuffizientem und nicht insuffizientem Myokard?
- Haben WS 1442 und seine Fraktionen an isolierten Vorhofmyozyten eine positive inotrope Wirkung?
- Kann aus der Mechanik der Myozyten und im Vergleich mit den Ergebnissen anderer Untersuchungen auf einen Wirkungsmechanismus von WS 1442 geschlossen werden?

II Material und Methoden

II.1 Untersuchtes Gewebe

In der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen an sieben isolierten linksventrikulären Myozyten aus sechs terminal-insuffizienten Herzen durchgeführt. Zwei linksventrikuläre Myozyten aus zwei Herzen herzgesunder Patienten sowie eine Myozyte, die aus dem Herz einer Patientin mit hypertropher obstruktiver Kardiomyopathie (HOCM) isoliert wurde und deren Kontraktionsverhalten dem der Zellen aus nicht terminal-insuffizientem Myokard gleich, wurden zu Kontrollmessungen herangezogen. Aus Vorhofgewebe konnten insgesamt 29 Myozyten untersucht werden.

II.1.1 Ventrikelmyokard

Es wurden insgesamt sieben isolierte Myozyten aus linksventrikulärem Gewebe von sechs Patienten (sechs Männer) mit terminaler Herzinsuffizienz Grad IV (NYHA) untersucht, die sich bei Vorliegen einer ischämischen oder dilatativen Kardiomyopathie (ICM, resp. DCM) einer orthotopen Herztransplantation unterziehen mußten.

Die explantierten Herzen erhielten wir von der chirurgischen Universitätsklinik Freiburg und dem Herzzentrum Nordrhein-Westfalen, Bad Oeynhausen. Einzelheiten bezüglich Diagnose, Alter, Geschlecht, linksventrikulärer Ejektionsfraktion sowie gewonnene Zellzahl und basale Verkürzung können der Tabelle 2 entnommen werden.

Initialen	Geschlecht	Alter [a]	Diagnose	EF [%]	Zellzahl	Basale Verkürzung
E. H.	♂	54	ICM	34	1	1,16
A. S.	♂	39	DCM	32	1	4,8
W. M.	♂	66	ICM	22	2	1,89/2,34
K. F.	♂	67	ICM	20	1	7,61
R. M.	♂	52	ICM	k. A.	1	3,26
H. Z.	♂	58	ICM	42	1	3,23
Ø±SEM		56±4,22		30±4,05		3,47±0,82

Tabelle 2: Daten von Patienten, aus deren terminal-insuffizienten linken Ventrikeln Zellen zur Untersuchung von WS 1442 isoliert wurden. DCM/ICM = dilatative/ischämische Kardiomyopathie; EF = linksventrikuläre Ejektionsfraktion; k. A. keine Aussage über die tatsächliche linksventrikuläre Ejektionsfraktion möglich, da der Patient bereits längere Zeit vor der Herztransplantation eine maschinelle Unterstützung zur Verbesserung des Herzminutenvolumens erhielt.

Von zwei Organspendern, deren Herz trotz normaler Herzfunktion aus technischen Gründen nicht transplantiert wurde und einer Patientin, die sich wegen einer HOCM einer Transplantation unterziehen mußte, konnten drei isolierte linksventrikuläre Myozyten zu Kontrollzwecken untersucht werden.

II.1.2 Vorhofmyokard

Von 20 Patienten (6 Frauen/13 Männer) mit koronarer Herzkrankheit und einer Patientin, die wegen einer Mitralklappeninsuffizienz operiert werden mußte, erhielten wir einen Teil des rechten Vorhofs (Auriculum cordis dexter). Das Gewebe wurde bei der Kanülierung zum Anschluß an die extrakorporale Zirkulation während einer Aorto-Koronaren-Bypass-Operation oder der Klappenersatzoperation noch vor Einleitung der Kardioplegie gewonnen.

Bei fast allen Patienten konnte echokardiographisch eine normale oder allenfalls nur leicht bis mäßig eingeschränkte linksventrikuläre Pumpfunktion nachgewiesen werden. Nur einer der Patienten mit einer linksventrikulären Ejektionsfraktion von 23% bot zum Zeitpunkt der Operation eine milde Symptomatik der Herzinsuffizienz. Die aus diesem Atrium isolierte Myozyte erfüllte die morphologischen Kriterien, und die durchgeführte Versuchsreihe war unauffällig. Alle rechtsatrialen Gewebeproben stammten aus der chirurgischen Universitätsklinik Freiburg, wo die Operationen durchgeführt wurden. Informationen über Alter, Geschlecht, Diagnose, Ejektionsfraktion sowie die pro Atrium untersuchte Zellzahl und die basale Verkürzung unter Kontrollbedingungen können der Tabelle 3 entnommen werden.

Initialen	Geschlecht	Alter [a]	Diagnose	EF [%]	Zellzahl	Basale Verkürzung
W S 1 4 4 2						
H. S.	♂	74	KHK	60	1	5,32
R. S.	♀	79	KHK	70	1	6,30
F. B.	♀	71	KHK	35	1	5,40
A. W.	♂	69	KHK	78	1	5,00
A. M.	♂	60	KHK	70	2	2,75/6,61
W. S.	♂	75	KHK	23	1	1,78
Crs-Blr 80242 A						
S. F.	♂	58	KHK	55	1	3,30
M. W.	♂	57	KHK	40	1	9,89
G. H.	♂	49	KHK	63	2	6,33/5,16
W. H.	♂	45	KHK	55	3	2,41/2,57/2,83
Crs-Blr 80242 B						
D. S.	♂	55	KHK	60	1	2,96
M. S.	♀	55	KHK	55	1	3,20
W. H.	♂	51	KHK	40	2	3,28/4,12
W. K.	♂	73	KHK	65	1	10,83
D. A.	♀	51	KHK	55	1	3,13
H. B.	♂	77	KHK	55	1	3,91
I. M.	♀	75	MKI	60	1	9,31
Crs-Blr 80242 C						
R. S.	♀	56	KHK	70	2	4,03/13,82
F. S.	♂	62	KHK	60	1	1,73
F. M.	♂	75	KHK	45	1	3,42
D. A.	♀	51	KHK	60	1	5,16
I. J.	♀	75	KHK	60	2	3,72/5,57
Ø±SEM		63,32±2,35		56,09±2,74		4,83±0,53

Tabelle 3: Daten von Patienten, an deren Vorhofzellen Untersuchungen mit WS 1442 oder den Subextrakten Crs-Blr 80242 A, B oder C vorgenommen wurden. KHK = koronare Herzkrankheit; MKI = Mitralklappeninsuffizienz; EF = linksventrikuläre Ejektionsfraktion; SEM = Standardfehler des Mittelwertes.

II.2 Medikation der Patienten

Patienten mit terminaler Herzinsuffizienz, die sich einer Transplantation unterzogen, wurden mit Nitraten (1), Calciumantagonisten (1), Digitalis-Glykosiden (4), ACE-Hemmern (5), β -Blockern (4) und Diuretika (2) behandelt.

Patienten, aus deren Vorhöfen die Myozyten isoliert werden konnten, erhielten die folgenden Medikamente: Nitrate (9), Digitalis-Glykoside (3), ACE-Hemmer (8), β -Blocker (14), Diuretika (2).

II.3 Lösungen

II.3.1 Nährstofflösung (Tyrode)

Die Lösung, in der das zu untersuchende Gewebe transportiert und präpariert wurde und mit der die isolierten Zellen während der Experimente superfundiert wurden, ist eine modifizierte, mit Carbogen (95% O₂, 5% CO₂) begaste Krebs-Henseleit Lösung (Tyrode) mit folgender Zusammensetzung: Na⁺ 144 mM, K⁺ 5,8 mM, Cl⁻ 126 mM, HCO₃⁻ 25 mM, H₂PO₄⁻ 1,29 mM, Mg²⁺ und SO₄²⁻ jeweils 0,96 mM, Ca²⁺ 1,25 mM, Glucose 11,2 mM, und 10 I.E./l Altinsulin. Zur Präparation und zum Transport enthielt die Tyrode zusätzlich 30 mM 2,3-Butanedione-Monoxime (BDM). Die Tyrode wurde alle zwei Tage aus höher konzentrierten Stammlösungen hergestellt, Glucose und Insulin wurden jeweils erst unmittelbar vor Versuchsbeginn hinzugegeben.

Zur Herstellung der Lösung wurde bidestilliertes Wasser verwendet.

II.3.2 Low-Calcium-Lösung und Enzymlösung

Vor der Zellisolation wurde, um freies Calcium auszuwaschen, das bereits präparierte Myokard mit Low-Calcium-Lösung, die sich wie folgt zusammensetzt, gewaschen: Na⁺ 120 mM, K⁺ 5,4 mM, Cl⁻ 125,4 mM, Mg²⁺ und SO₄²⁻ jeweils 5 mM, Glucose und Taurin 20 mM, N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-ethansulfonsäure

(HEPES) 10 mM, Nitrilotriacetic-Säure (NTA) 6,7 mM, Pyruvat 5 mM. Der pH-Wert der Lösung wurde auf 7,4 eingestellt.

Das Lösen der Enzyme und das Inkubieren der Myokardstückchen geschah in carbogendurchperlter Enzymlösung, wobei die Konzentration der in der Enzymlösung enthaltenen Stoffe denen der Low-Calcium-Lösung bis auf folgende Ausnahmen entsprechen: BDM 20 mM und Ca^{2+} 0,0005 mM wurden hinzugefügt, Nitrilotriacetic-Säure wurde dagegen nicht verwendet, der pH-Wert wurde auf 7,3 eingestellt.

II.3.3 Wirkung von 2,3-Butanedione-Monoxime (BDM) und Nitrilotriacetic-Säure (NTA).

BDM wurde aufgrund seiner vorteilhaften Eigenschaften der Tyrode beim Transport und der Präparation des Gewebes und auch der Enzymlösung während der Myozytenisolation hinzugefügt. Bei der Präparation der Muskelstückchen kommt es an der Schnittstelle zur Verletzung der Zellmembran der sich dort befindlichen Myozyten. Das dabei frei werdende Calcium führt zu Kontrakturen der umgebenden Myozyten. Diese Kontrakturen lassen sich durch BDM verhindern, indem es vermutlich die Calciumbindungsstellen an Troponin C und den Calciumkanälen blockiert. Dadurch wird eine optimale Kardioplegie erreicht, die den Transport über lange Distanzen und eine möglichst schonende Präparation ermöglicht. Diese Effekte treten rasch ein und sind durch Auswaschen innerhalb kurzer Zeit vollständig reversibel. [43], [72]. NTA hat in der Low-Calcium-Lösung die Funktion eines Chelatbildners, der freie Calcium- und Magnesiumionen binden soll, um diese später auswaschen zu können.

II.4 Substanzen

II.4.1 Substanzen für die Lösungen

KCl, MgSO₄, NaHCO₃, KH₂PO₄, CaCl₂ und Glucose wurden von der Firma Merck bezogen. NaCl, Pyruvat, Taurin, NTA und BDM erhielten wir von der Firma Sigma, während HEPES bei der Firma Roth, NaHCO₃ bei Riedel-de-Haen und Insulin bei der Firma Hoechst erworben werden konnten. Alle Substanzen besitzen größten analytischen Reinheitsgrad.

II.4.2 Protease, Hyaluronidase und Collagenase

Protease und Hyaluronidase konnten in größtem analytischen Reinheitsgrad von der Firma Sigma erworben werden, Collagenase stammte von der Firma Boehringer. Die Firmen gaben die Aktivitäten der Protease und der

Hyaluronidase mit 9,9 U/mg und 320 U/mg, resp. an, die der Collagenase mit 0,21 U/mg.

Damit variierende Aktivitäten der Collagenase zwischen verschiedenen Chargen ausgeschlossen werden konnten, wurden alle Versuche mit nur einer Charge durchgeführt.

II.4.3 Versuchssubstanzen

Der Crataegus-Gesamtextrakt WS 1442 sowie die Subextrakte Crs-Blr 80242 A, B, und C wurden ausschließlich von der Firma Dr. Willmar Schwabe Arzneimittel, Karlsruhe, zur Verfügung gestellt. Auf ihre Gewinnung und ihre Wirkung wird an anderen Stellen dieser Arbeit im Detail eingegangen.

II.5 Transport

Vorhof- und Ventrikelgewebe, das aus der Universitätsklinik Freiburg stammte, wurde unmittelbar nach der Entnahme durch den Chirurgen in carbogengesättigte, BDM-haltige gekühlte Tyrode gelegt. Der anschließende Transport in das Labor dauerte meist unter zehn Minuten. Die Gewebeproben, die wir aus dem Herzzentrum Nordrhein-Westfalen erhielten, wurden in einem speziellen Transportkoffer mit gekühlter, carbogengesättigter Tyrode nach Freiburg geschickt, wobei die Sauerstoffsättigung während des bis zu sechs Stunden dauernden Transportes ausreichend war.

II.6 Präparation

Die Präparation der Myokardstückchen erfolgte in einer silikonbeschichteten Präparierschale mit Hilfe eines Stereomikroskops (Olympus, SZ 40) bei zehnfacher Vergrößerung. Das Gewebe lag während der Präparation in BDM-haltiger und mit Carbogen gesättigter Tyrode. Die Präparation erfolgte bei Raumtemperatur in nicht gekühlter Tyrode. Um Schädigung der Myozyten durch die massive Calciumfreisetzung, die bei der Präparation auftritt, zu vermeiden, verblieben die Muskelstückchen noch für einige Minuten in der Präparierschale

unter BDM-Protektion. Anschließend wurden die Muskelstückchen in ein Cellstar-Gefäß zur weiteren Isolierung überführt.

II.6.1 Präparation des Ventrikelmyokards

Aus dem uns zu Verfügung stehenden linken Ventrikel oder Ventrikelstück wurden 1-2 g subendokardiales Gewebe entnommen und mit GEM-Klingen in ca. 1 mm³ große Würfel geschnitten. Dabei orientierte sich die Präparation an der Faserrichtung, makroskopisch fibrosierte Anteile wurden nicht verwendet.

II.6.2 Präparation des Vorhofmyokards

Aus dem Auriculum cordis dexter wurden mit Hilfe augenchirurgischer Instrumente alle Trabekel herauspräpariert und anschließend mit der Klinge in ca. 1 mm³ große Würfel geschnitten.

II.7 Zellisolierung

Der Isolationsvorgang erfolgte in einem 37° C warmen Wasserbad (Julabo, U3) unter permanenter Carbogendurchperlung. Dies diente nicht nur einer optimalen Sauerstoffsättigung der Lösung, in der sich die Myokardstückchen befanden, sondern hatte auch eine ständige Durchmischung und mechanische Dissoziation zur Folge.

Damit freies Calcium und BDM ausgewaschen werden, wurden die präparierten Muskelstückchen insgesamt zwölf Minuten lang in 20 ml Low-Calcium-Lösung gespült, wobei die Lösung in dreiminütigen Abständen ausgetauscht wurde. Der Vorgang des Spülens mit Low-Calcium-Lösung darf aufgrund des Calcium-Paradoxons nicht länger als insgesamt zwölf Minuten dauern.

Die darauffolgende Isolierung erfolgte mittels Enzymen in drei Schritten mit einer Dauer von jeweils 45 Minuten pro Isolierungsschritt. Im ersten Schritt wurden die Myokardstückchen in proteasehaltiger Enzymlösung inkubiert (Enzymaktivität Ventrikel: 3,07 U/ml, Vorhof 4,3 U/ml), im zweiten und dritten Schritt fand die Inkubation in Collagenase-haltiger Enzymlösung statt (Enzymaktivität: Ventrikel

0,21 U/ml, Vorhof 0,37 U/ml). Bei der Isolierung von Vorhofzellen enthielt die erste Inkubation mit Collagenase zusätzlich Hyaluronidase (Enzymaktivität 160 U/ml).

Die isolierten Zellen befanden sich in dem Überstand der Collagenase-Lösungen und konnten von dort aus leicht abpipettiert werden. Die Lösungen mit den isolierten Zellen wurden auf Eis gestellt, um die Isolation zu stoppen. Der Anteil an morphologisch intakten Zellen schwankte sehr, er lag zwischen 10% und 80%. Die durchschnittliche Verkürzung unter basalen Bedingungen betrug für linksventrikuläre Myozyten $3,30 \pm 0,60\%$, für atriale Zellen $4,99 \pm 0,53\%$.

II.8 Messung der Kontraktilität der Myozyten

II.8.1 Versuchsaufbau

Bei der Durchführung der Versuche kamen folgende Geräte zum Einsatz:

- inverses Mikroskop mit Küvetteneinsatz (Diaphot 300, Nikon)
- Stimulationseinheit (Scientific Instruments, Heidelberg)
- Rollpumpe (Scientific Instruments, Heidelberg)
- Kameraeinheit (Scientific Instruments, Heidelberg)
- Temperaturkontrolleinheit (Scientific Instruments, Heidelberg)
- Kathodenstrahloszilloskop (HM 304, HAMEG)
- Monitor (12 Bit s/w slave monitor, Philips)
- Softwarepaket zur Signalanalyse (MUCELL, Scientific Instruments, Heidelberg)
- Personalcomputer mit A/D-Wandler (Pentium II, datacapo)
- pH-Meter (WTW pH 330)
- Wasserwärmebad (Polyscience)

Die oben aufgeführte Gerätegruppe wurde von Professor K. Güth, Scientific Instruments, Heidelberg, für Kontraktilitätsmessungen an isolierten Myozyten entwickelt und eigens für unsere Arbeitsgruppe zusammengestellt.

In der folgenden Abbildung ist die Anlage zur Messung des Kontraktionsablaufs an isolierten Herzmuskelzellen dargestellt.

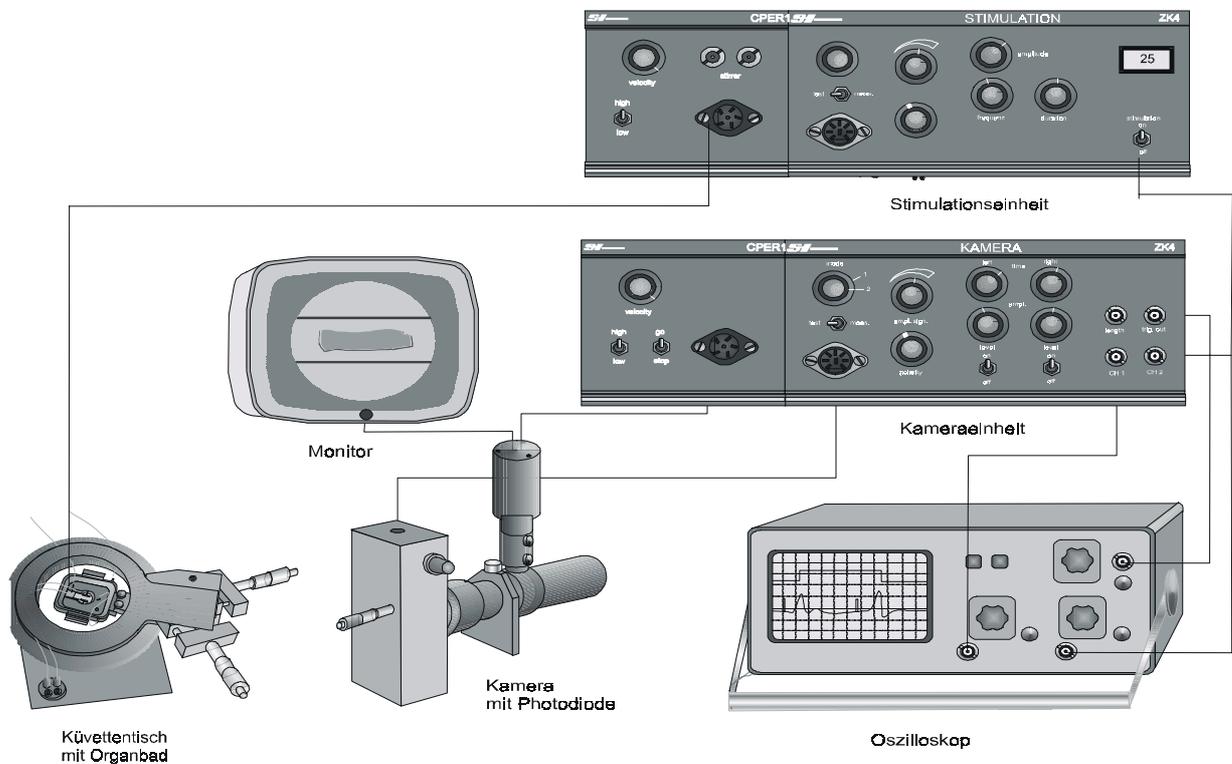


Abbildung 2: Anlage zur Messung des Kontraktionsablaufs isolierter Kardiomyozyten.

II.8.1.1 Küvettenystem

Abbildung 3 zeigt das Küvettenystem im Detail. In der Mitte des Küvettenystems, das in den Mikroskoptisch integriert ist, befindet sich eine kleine Vertiefung, in die das Deckglas eingelegt werden kann. Das Deckglas bildet somit den Boden des Organbades, dem nach oben die Küvette mit einer mittigen Öffnung aufsitzt. Für die Abdichtung des Organbades sorgt ein Dichtungsring. Nachdem die Inkubationszeit beendet ist, wird etwa ein Milliliter zellhaltige Enzymlösung in das Organbad pipettiert und mit einem quarzglasernen Deckel abgedeckt. Dieser Deckel enthält jeweils einen Zu- und Ablauf sowie auch zwei Platinelektroden, die mit der Stimulationseinheit verbunden sind. Eine Rollpumpe, mit der die Flußgeschwindigkeit manuell geregelt werden kann, sorgt für den Fluß der Tyrode. Die Küvette enthält

darüber hinaus ein integriertes Thermometer, so daß die Ist-Temperatur ständig gemessen wird und über einen Thermosensor, der die Küvette umgibt, korrigiert werden kann. Auch das sich unter dem Deckglas befindende Phasenkontrastobjektiv ist von einem Thermoblock umgeben, um Temperaturdifferenzen zu vermeiden. Auf diese Art kann die Temperatur des Organbades auf 32° C konstant gehalten werden. Die zufließende Tyrode wird von einem Wasserbad auf 30° C vorgewärmt, um so die Entstehung von Gasblasen innerhalb des Organbades zu verhindern.

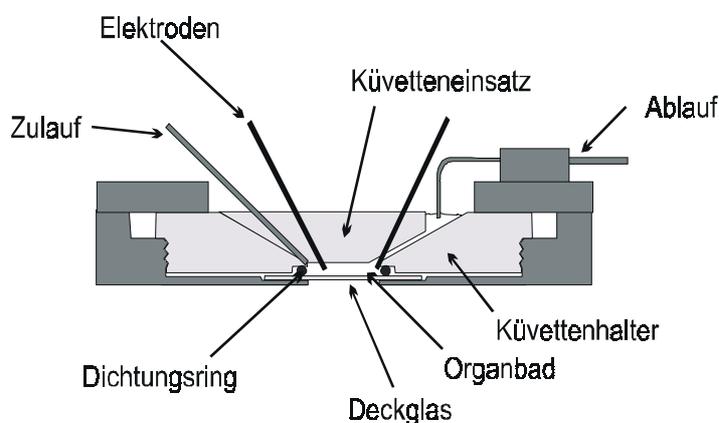


Abbildung 3: Küvettenystem mit Organbad

II.8.1.2 Mikroskop

Der von oben in das Organbad und das Objektiv einfallende Lichtstrahl wird über mehre Spiegel zu einem Teil in das Binokular, zum anderen Teil zu der Kameraeinheit und der Diodenkette geleitet. Das Aufsuchen von morphologisch intakten Zellen wurde mit einem Objektiv mit 40-facher Vergrößerung durchgeführt, das Einstellen der zu messenden Zelle erfolgte mit einem Phasenkontrastobjektiv mit 100-facher Vergrößerung.

II.8.1.3 Zellendetektion

Die Zellen wurden mittels einer Diodenkette detektiert, die Helligkeitsunterschiede sehr gut wahr nimmt. Durch Verwendung eines Phasenkontrast-Mikroskops ergibt sich eine deutliche Kontrastzunahme der Zellkonturen, die dann von der Photodiode als Helligkeitssprung registriert werden. Um die Zelle exakt einzustellen, muß die Diodenkette parallel zur Zelle liegen. Zur Erleichterung der Einstellung ist die Kamera an einen Bildschirm angeschlossen, auf dem sich die Zellposition gut beurteilen läßt. Abbildung 4 gibt die Möglichkeiten zur Einstellung der Zellen wieder.

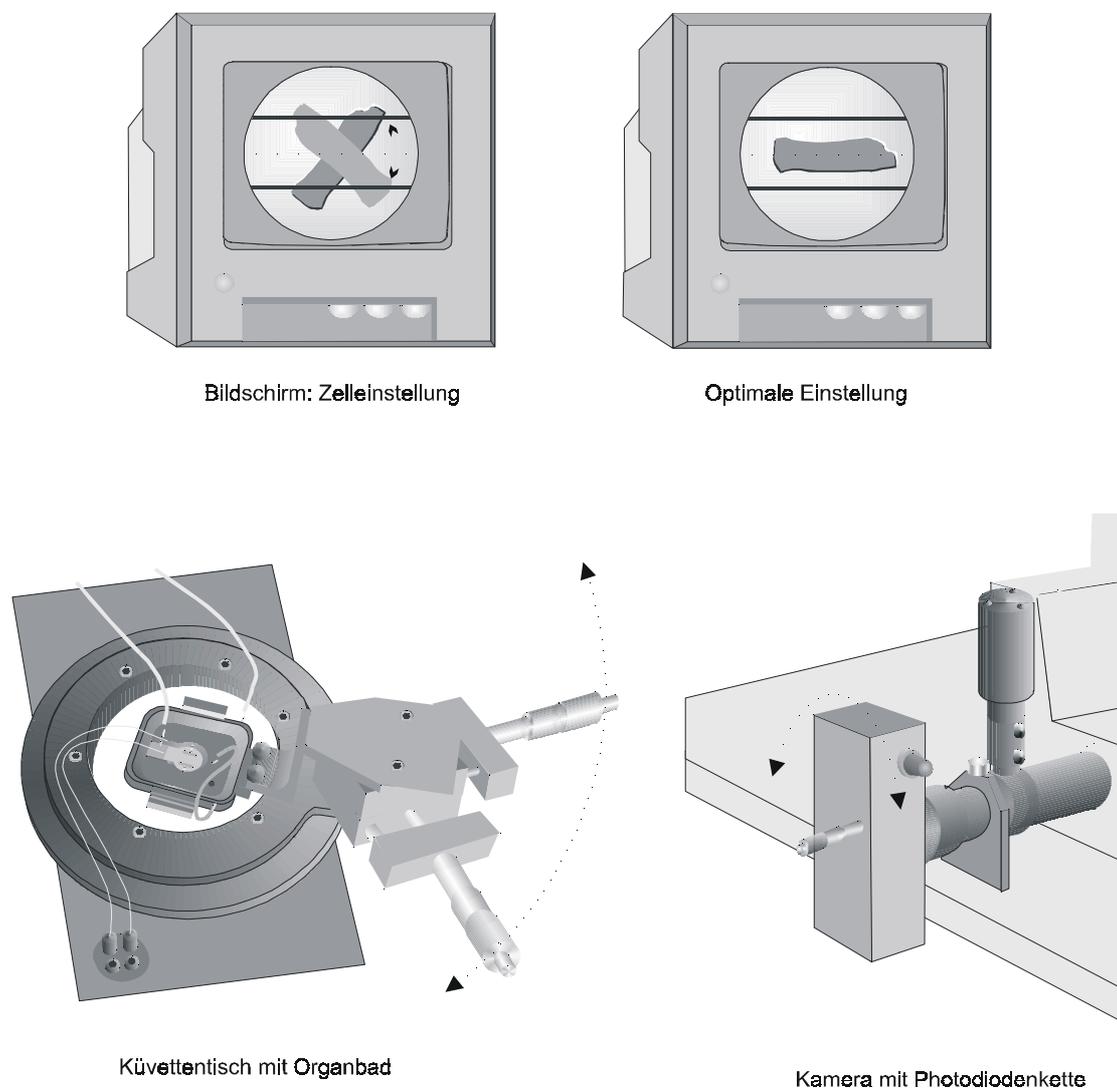


Abbildung 4: Die optimale Einstellung der Zelle erfolgt durch Drehen der Kamera oder des Kuvettentisches, so daß die Zelle parallel zur Diodenkette liegt.

Die von der Photodiode registrierten Helligkeitsunterschiede werden durch ein angeschlossenes Oszilloskop in analoge Signale umgewandelt und über den Kanal 1 als Oszillogramm wiedergegeben. Auf dem Oszilloskopschirm befinden sich zwei Marker, die sich vertikal und horizontal bewegen lassen und die für Zellgrenzen typischen Helligkeitsunterschiede erkennen. Die Marker werden jeweils links von den Zellenden positioniert und detektieren das rechts davon liegende Zellende. Über einen zweiten Kanal wird so die Zelllänge angezeigt: Der erste Marker entdeckt das linke Zellende, das auf dem Oszilloskop durch ansteigende Spannung zu erkennen ist. Umgekehrt entdeckt der zweite Marker das durch Spannungsabfall gekennzeichnete rechte Zellende. Die Zelle ist folglich so lang, wie der Abschnitt der erhöhten Spannung zwischen den beiden Markern.

Die Änderung der Zelllänge bei einer Kontraktion wird so mit einer Gesamtauflösung von 50 Hz zuverlässig aufgenommen. Abbildung 5 zeigt eine korrekt eingestellte Zelle.

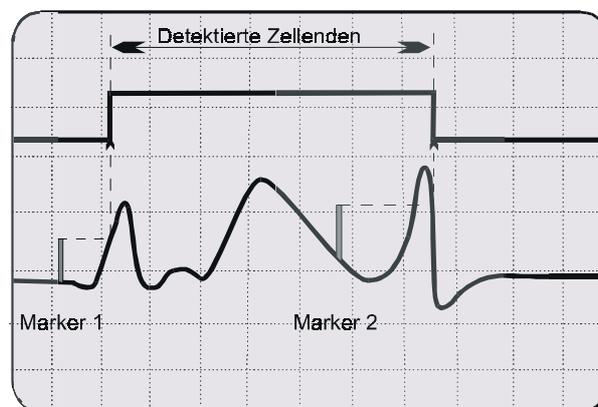


Abbildung 5: Detektion der Zellenden und Bestimmung der Zelllänge durch zwei Marker durch Umwandlung der Lichtsignale in analoge Signale.

II.8.1.4 Stimulation

Die isolierten Myozyten wurden über zwei Platinelektroden in der Küvettenkammer mit einem bipolaren Stimulationspuls von 5 ms Dauer im Feld stimuliert. Die Spannung, mit der im Feld stimuliert wurde, lag 10% höher als die ermittelte Schwellenspannung und betrug in der Regel zwischen 18 und 35 V. Der Mittelwert liegt bei $30,34 \pm 0,66$ V. Als Stimulationsfrequenz wurden 0,2 Hz gewählt. Eine Gasbildung innerhalb der Küvette wurde durch die kurze Stimulationsdauer und die symmetrische Stimulation wirkungsvoll verhindert.

II.8.1.5 Registrierung der Zellkontraktion

Das Kontraktionssignal wurde gleichzeitig über den Monitor, das Oszilloskop und mittels einem 12 Bit Analog/Digital-Wandler durch den Personalcomputer registriert. Das MUCCELL-Softwareprogramm mittelte eine vorgewählte Anzahl einzelner Zellkontraktionen und speicherte diese Ergebnisse. Auf diese Art und Weise kann das Ergebnis optimiert werden, da so kleine Fehler bei der Kontraktionsaufnahme, die z. B. durch Bewegungen der Zelle durch die Pumpströmung entstehen, herausgemittelt werden. Als Ergebnis der gemittelten Kontraktionssignale wurde eine Verkürzungskurve und die errechneten Werte ausgegeben.

II.8.2 Allgemeine Versuchsvorbereitungen

Nach Beendigung des zweiten bzw. des dritten Inkubationsschritts wurde etwa ein Milliliter Enzymlösung, in der sich die Kardiomyozyten befanden, in das Küvettenystem pipettiert und die Myozyten setzten sich auf dem Deckglas ab. Das Küvettenystem wurde nun mit 1,25 mM calciumhaltiger, carbogenbegaster Tyrode in einem zunächst offenen Kreislauf gespült. Dadurch wurden Reste von Enzymlösung und BDM wie auch Zelltrümmer entfernt. Nach einer Ruhephase von 30 bis 45 Minuten Dauer wurde mit der Feldstimulation begonnen.

Die Auswahl der Myozyten erfolgte nach vollständiger Stabilisierung der Kontraktionsamplituden unter folgenden Gesichtspunkten:

- Zellmorphologie: gut zu erkennende Querstreifung, keine großen Vakuolen oder erkennbare Kontrakturbereiche.
- Keine Spontankontraktionen in Tyrode, die Calciumionen in einer Konzentration von 1,25 mM enthielt.
- Konstante Kontraktionsamplitude unter basaler Stimulationsfrequenz von 0,2 Hz über fünf Minuten.
- Konstante diastolische Länge.
- Keine Extrasystolen unter der Stimulation.

Die verwendeten Substanzen WS 1442 und seine Subextrakte Crs-Blr 80242 A, B und C wurden je nach Versuchsprotokoll als Einzel-Dosis oder im Sinne einer kumulativen Konzentrations-Wirkungs-Analyse untersucht. Bei positiv inotropen Effekten, also einer Zunahme der Kontraktionsamplitude, wurde mit der Registrierung begonnen, wenn die Zelle mindestens drei Minuten ohne weiteren Kraftzuwachs kontrahierte.

Waren keine Effekte der Substanz auf die Myozyte zu erkennen, so wurde mit der Registrierung nach zehn Minuten begonnen.

II.8.3 Versuche mit Crataegus

Die inotropen Effekte von WS 1442 an atrialen und linksventrikulären Myozyten wurden an sieben rechtsatrialen Myozyten aus sechs Vorhöfen und sieben linksventrikulären Myozyten aus terminal-insuffizientem Myokard in Form einer Konzentrations-Wirkungs-Analyse mit Konzentrationen von jeweils 10^{-10} bis 10^{-7} [g/ml] untersucht. Kontrolluntersuchungen an Zellen aus nicht terminal-insuffizientem Myokard wurden mit einer Einzel-Dosis von 10^{-8} [g/ml] durchgeführt.

Weiterhin wurde der Effekt einer Einzel-Dosis von 10^{-8} [g/ml] der jeweiligen Subextrakte Crs-Blr 80242 A, B und C auf Vorhofmyozyten untersucht. Der

Subextrakt A konnte an sieben Myozyten aus vier Vorhöfen untersucht werden, Subextrakt Crs-Blr 80242 B an acht rechtsatrialen Myozyten, die aus sieben Vorhöfen isoliert wurden. Der Subextrakt Crs-Blr 80242 C wurde an sieben Zellen aus fünf Vorhöfen hinsichtlich seiner positiv inotropen Wirkung untersucht.

Die Messung wurde bei allen Versuchen solange durchgeführt, bis die Myozyte entweder keinen Kraftzuwachs aufwies oder Zeichen der Zytotoxizität (Kontraktur, Extrasystolen unter der Stimulation) auftraten.

II.8.4 Auswertung

Die Versuche wurden nach der Speicherung mit Hilfe des MUCCELL-Softwareprogrammes ausgewertet

Dabei wurden folgende Parameter berechnet:

- | | | |
|-----|---------------------------------|--|
| (1) | L_{max} [µm] | maximale Verkürzung |
| (2) | INT [µm*s] | Integral der Kontraktionskurve |
| (3) | TTP [ms] | Dauer bis zu maximal entwickelten Verkürzung |
| (4) | t_{10% P} [ms] | Dauer der 10%igen Verkürzung bis zur maximal entwickelten Verkürzung |
| (5) | RT_{50%} [ms] | Dauer der Relaxation bis auf die Hälfte |
| (6) | SMD [-L_{dia}/s] | maximale Verkürzungsgeschwindigkeit |
| (7) | SMU [L_{dia}/s] | maximale Relaxationsgeschwindigkeit |
| (8) | L_{dia} [µm] | diastolische Länge |

II.8.4. Normierung der Daten und statistische Auswertung

Die gemessenen maximalen Verkürzungen wurden auf die diastolische Länge der jeweiligen Myozyte bezogen und als relative Verkürzung in Prozent angegeben.

Alle in dieser Arbeit genannten Ergebniswerte sind als Mittelwert und dessen Standardfehler \pm angegeben. Die statistische Auswertung wurde mit Hilfe der Statistikprogramme SPSS 7.52 und SPSS 9.0 vorgenommen.

Innerhalb einer Gruppe von Experimenten wurden die Veränderungen der Parameter bei Zugabe des zu prüfenden Stoffes gegenüber dem jeweiligen Ausgangswert mit dem Student-t-Test für gepaarte Stichproben auf Signifikanz geprüft. Vergleiche zwischen verschiedenen Gruppen erfolgten durch den Student-t-Test für unverbundene Stichproben. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant gewertet.

III Ergebnisse

III.1 Untersuchungen von WS 1442 an ventrikulären Myozyten

III.1.1 Untersuchungen mit WS 1442 an Myozyten aus terminal-insuffizientem linksventrikulärem Myokard (NYHA IV)

Es gelang, WS 1442 an sieben linksventrikulären Myozyten aus sechs terminal-insuffizienten Herzen zu untersuchen. Klinische Information zu den Patienten sind in Kapitel II aufgeführt.

Der Crataegus-Gesamtextrakt WS 1442 wurde in Form einer Dosis-Wirkungs-Analyse untersucht. Dabei stieg die relative Verkürzung in Abhängigkeit von der Dosis von $3,47 \pm 0,82\%$ auf maximal $6,90 \pm 1,64\%$ bei einer Konzentration von 10^{-7} [g/ml].

Abbildung 6 zeigt die Änderung des Kontraktionsverhaltens linksventrikulärer Myozyten aus terminal-insuffizientem Myokard bei stufenweiser Zugabe von WS 1442.

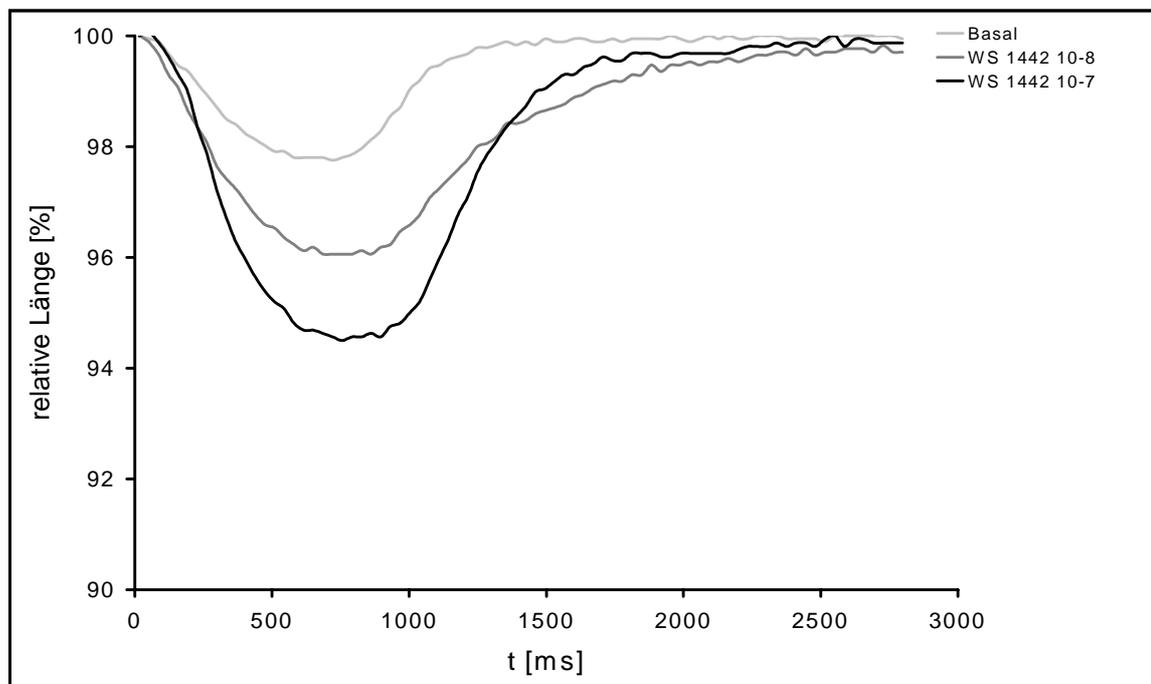


Abbildung 6: Typische Änderungen des Kontraktionsverhaltens linksventrikulärer Myozyten nach der sukzessiven Zugabe des Gesamtextraktes WS 1442.

Die statistische Auswertung von sieben Versuchen, bei denen WS 1442 am Ventrikel untersucht wurde, ergab, daß die relative Verkürzung von basal $3,47 \pm 0,82\%$ auf $4,16 \pm 0,97\%$, $4,91 \pm 1,21\%$ und $6,15 \pm 1,44\%$ bei 10^{-10} , 10^{-9} und 10^{-8} [g/ml], respektive, stieg. Bei einer Maximalkonzentration von 10^{-7} [g/ml] wurde eine relative Verkürzung von $6,90 \pm 1,64\%$ erreicht. Zur Veranschaulichung ist der Anstieg der Verkürzungsfraction in Abbildung 7 dargestellt.

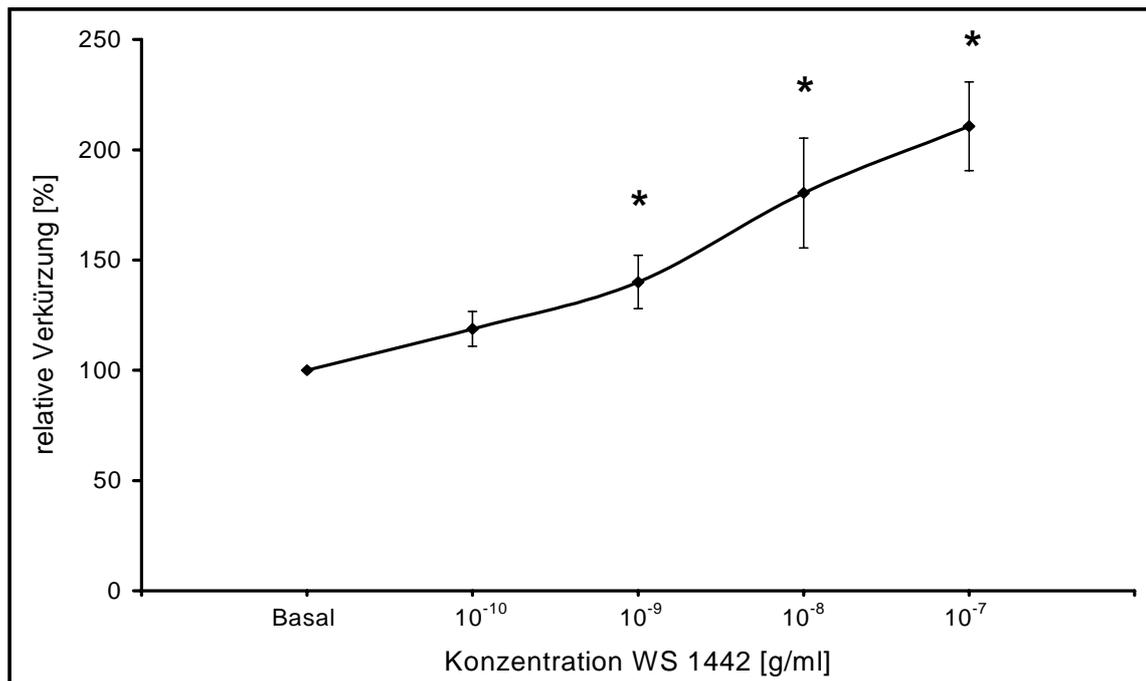


Abbildung 7: Zunahme der relativen Verkürzung bei schrittweiser Zugabe von WS 1442.

* = signifikant verschieden zum Ausgangswert.

Das Verkürzungs-Zeit-Integral stieg von $4231,72 \mu\text{m}\cdot\text{s}$ signifikant auf $7787,13 \mu\text{m}\cdot\text{s}$ bei einer Konzentration von 10^{-7} [g/ml] Extrakt an. Die maximale Kontraktionsgeschwindigkeit SMD stieg ab einer Konzentration von 10^{-8} [g/ml] signifikant. Alle übrigen Kontraktions- und Relaxationszeiten $RT_{50\%}$, TTP und $T_{10\%P}$ konnten ebensowenig wie die maximale Aufstrichgeschwindigkeit SMU ein Signifikanzniveau erreichen.

Tabelle 4 faßt die Werte der Meßgrößen zusammen.

	Kontrolle	WS 10 ⁻¹⁰	WS 10 ⁻⁹	WS 10 ⁻⁸	WS 10 ⁻⁷
relV	3,47±0,82	4,16±0,97	4,91*±1,21	6,15*±1,44	6,90*±1,64
INT	4232±943	4674±794	5642*±799	5763±423	7787*±1608
TTP	649,1±49,7	706,7±36,2	626,8±52,2	601,5±40,8	626,5±33,6
T _{10%P}	555,3±54,7	601,1±45,3	527,0±44,1	512,4±37,0	536,6±25,6
RT _{50%}	1234±182,8	1192±164,8	1000±88,8	940±84,3	1268±225,8
SMD	-18,15±7,33	-15±44,32	-21,90±7,75	-26,7*±9,95	-30,4*±9,52
SMU	12,77±7,22	12,07±4,32	15,37±5,55	23,33±11,8	20,32±10,7
Ldia	123,8±14,3	125,3±18,2	123,6±17,5	121,2±16,3	126,0±13,2

Tabelle 4: Mittelwerte ± Standardfehler der Kontraktilitätsparameter der Dosis-Wirkungs-Analyse von Crataegus-Gesamtextrakt WS 1442 an sieben linksventrikulären Kardiomyozyten. Crataegus-Konzentration [g/ml].

relV = relative Verkürzung [%].

INT = Verkürzungs-Zeit-Integral [$\Delta l/\Delta t$].

TTP = Dauer bis zur maximal entwickelten Verkürzung [ms].

T_{10%P} = Dauer von der 10%igen bis zur maximal entwickelten Verkürzung [ms].

RT_{50%} = Dauer der Relaxation auf 50% [ms].

SMD = maximale Verkürzungsgeschwindigkeit [-Ldia/s].

SMU = maximale Relaxationsgeschwindigkeit [Ldia/s].

Ldia = diastolische Länge [μm].

* = signifikante Veränderung des Parameters gegenüber dem Ausgangswert.

III.1.2 Versuche mit WS 1442, die an Myozyten aus nicht insuffizientem linksventrikulärem Myokard durchgeführt wurden

WS 1442 zeigte auch am gesunden Spenderherz eine positiv inotrope Wirkung. Dazu konnten zwei Zellen aus gesunden Herzen, die aus technischen Gründen nicht transplantiert wurden, sowie eine funktionell gesunde Zelle aus einem Herz mit HOCM verwendet werden. Die genauen klinischen Daten der Spender wurden aus datenschutzrechtlichen Gründen nicht übermittelt. Die Verkürzungsfraction stieg bei einer Konzentration von 10^{-8} [g/ml] im Mittel von $2,91 \pm 0,81$ auf $4,93 \pm 1,05\%$.

Bezieht man nun in jedem einzelnen Versuch die Verkürzungszunahme auf den Ausgangswert 100%, so entspricht sie Zunahme der relativen Verkürzung $177,04 \pm 22,24\%$ an nicht insuffizientem Myokard.

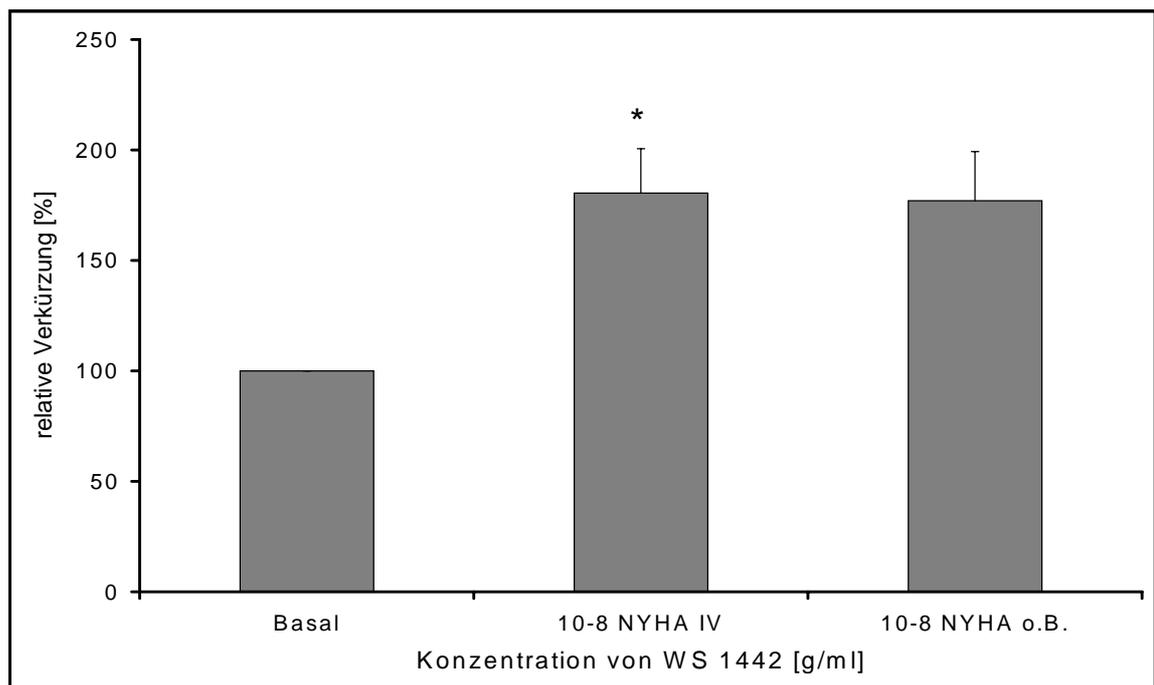


Abbildung 8: Zunahme der relativen Verkürzung von linksventrikulären Myozyten. NYHA IV = aus terminal-insuffizientem Myokard isolierte Myozyten (n=7) NYHA o. B. = aus Kontrollmyokard isolierte Zellen (n=3).

Es ist zu erwarten, daß sich die übrigen Parameter, wie auch bei den Versuchen mit WS 1442 an Myozyten aus terminal-insuffizientem Myokard, ebenfalls ändern. Tatsächlich steigerte sich das Integral von ursprünglich 2678 ± 1081 auf 5176 ± 1516 . Auch alle übrigen Zielgrößen, mit Ausnahme der diastolischen Länge, nahmen zu. Die Werte sind in Tabelle 5 zusammengefaßt. Auf eine Prüfung auf Signifikanz mittels eines t-Tests wurde aufgrund der geringen Anzahl von $n = 3$ verzichtet.

	Kontrolle	WS 1442 10^{-8}
relV	2,91±0,81	4,93±1,05
INT	2678±1081	5176±1516
TTP	423±18,25	555,4±64,34
T_{10%P}	362,5±16,8	486,6±51,9
RT_{50%}	656,5±34,9	805,9±95,1
SMD	-18,72±8,14	-24,45±10,01
SMU	14,17±5,57	21,74±9,29
Ldia	106,2±4,0	105,6±3,5

Tabelle 5: Mittelwerte \pm Standardfehler der Kontraktilitätsparameter der mit WS 1442 (10^{-8} [g/ml]) untersuchten linksventrikulären Myozyten aus gesundem Myokard.

relV = relative Verkürzung [%].

INT = Verkürzungs-Zeit-Integral [$\Delta l/\Delta t$].

TTP = Dauer bis zur maximal entwickelten Verkürzung [ms].

T_{10%P} = Dauer von der 10%igen bis zur maximal entwickelten Verkürzung [ms].

RT_{50%} = Dauer der Relaxation auf 50% [ms].

SMD = maximale Verkürzungsgeschwindigkeit [-Ldia/s].

SMU = maximale Relaxationsgeschwindigkeit [Ldia/s].

Ldia = diastolische Länge [μm].

III.2 Einfluß des Crataegus-Gesamtextraktes WS 1442 auf die Kontraktilitätsparameter rechtsatrialer Myozyten

Die Wirkung des Crataegus-Gesamtextraktes WS 1442 auf rechtsatriale Myozyten wurde an sieben Kardiomyozyten aus sechs Vorhöfen, deren auriculum cordis dextrum im Rahmen einer Aorto-coronar-venösen Bypassoperation exzidiert wurde, in Form einer Dosis-Wirkungs-Kurve untersucht.

Die klinischen Daten der Patienten sind in der Tabelle 3 in Kapitel II bereits aufgeführt.

Zu Beginn der Versuche lag die durchschnittliche Verkürzung der Myozyten in Anwesenheit von 1,25 mM Ca^{2+} bei $4,74 \pm 0,68\%$. Die relative Verkürzung nahm auf ein Maximum von $9,54 \pm 1,78\%$ zu. Wenn die Ausgangswerte gleich 100% gesetzt und die jeweilige Kontraktilitätssteigerung darauf bezogen wird, so ergibt sich ein Maximum von $245,39 \pm 40,56\%$. Eine statistische Signifikanz lag ab einer Konzentration von 10^{-9} [g/ml] vor.

Die folgende Abbildung zeigt Originalregistrierungen dreier Kontraktionen ohne WS 1442 und in Gegenwart des Extraktes in den Konzentrationen 10^{-8} und 10^{-7} [g/ml]. Dabei fällt eine verlängerte Kontraktionszeit mit zunehmender Konzentration auf.

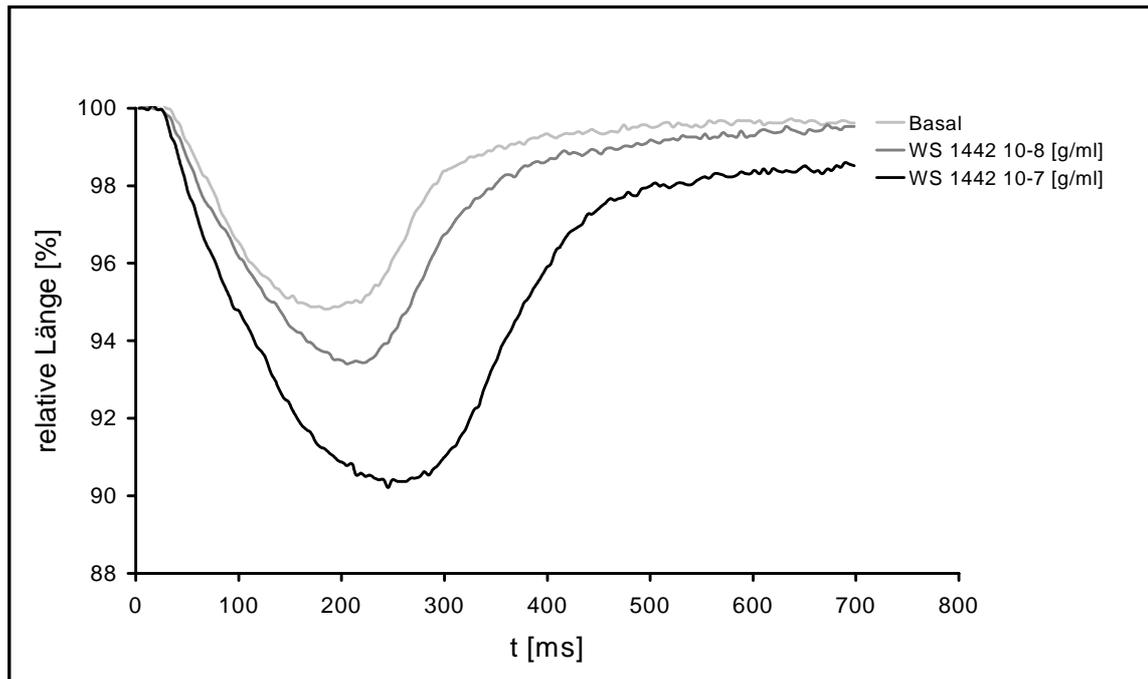


Abbildung 9: Originalregistrierung dreier Kontraktionen eines rechtsatrialen Myozyten ohne den Crataegus-Gesamtextrakt und in Anwesenheit des Extraktes (10^{-8} und 10^{-7} [g/ml]).

Die Steigerung der Verkürzungsfraction in Abhängigkeit der jeweiligen Konzentration von WS 1442 ist in Abbildung 10 dargestellt

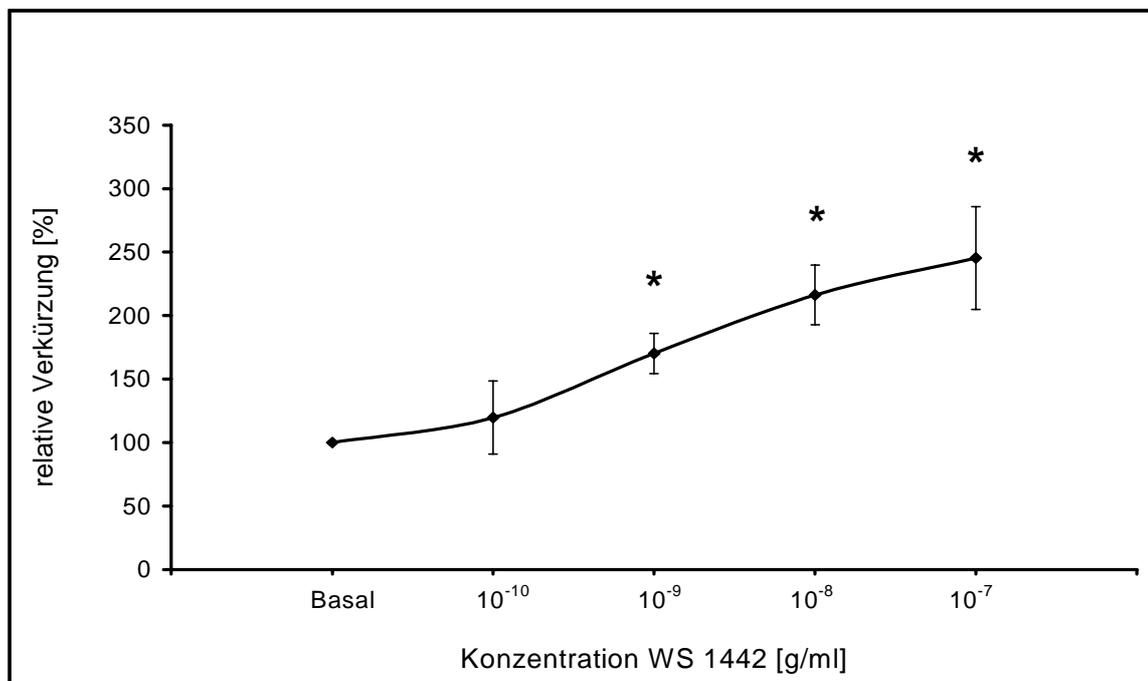


Abbildung 10: Mittelwerte \pm Standardfehler der Mittelwerte der relativen Verkürzung der Kardiomyozyten bei einer Dosis-Wirkungs-Analyse von WS 1442. * = im Vergleich zum Basalwert signifikant.

Mit steigender Konzentration von WS 1442 änderte sich aber nicht nur die Verkürzungsfraction der Myozyten, sondern auch die übrigen Meßgrößen. Das Verkürzungs-Zeit-Integral stieg ab einer Konzentration von 10^{-9} [g/ml] signifikant gegenüber der Kontrollmessung an und erreichte den maximalen Wert $3509,40 \pm 627,1$ [$\Delta l/\Delta t$] bei einer Konzentration von 10^{-7} [g/ml]. Weiterhin nahmen auch die Parameter TTP, $T_{10\%P}$, $RT_{50\%}$ und SMU signifikant im Vergleich zu den Ausgangswerten zu. Die Zunahme der SMD und die Änderung der diastolischen Länge waren nicht signifikant (Tabelle 6).

	Kontrolle	WS 10^{-10}	WS 10^{-9}	WS 10^{-8}	WS 10^{-7}
relV	4,73 \pm 0,68	6,49 \pm 1,26	7,85* \pm 1,23	9,53* \pm 1,78	8,83* \pm 1,31
INT	1661 \pm 500	153 \pm 483	2375 \pm 571	3236* \pm 645	3342 \pm 570
TTP	150,9 \pm 22,3	47,88 \pm 27,9	202,9* \pm 29,4	243,0* \pm 40,4	214,2* \pm 19,3
$T_{10\%P}$	119,0 \pm 19,8	118,4 \pm 23,6	166,9* \pm 29,1	188,2* \pm 32,7	170,4* \pm 17,9
$RT_{50\%}$	285,9 \pm 42,9	247,6 \pm 28,1	356,5 \pm 50,1	371,1 \pm 54,0	365,2 \pm 46,1
SMD	-111,3 \pm 36,4	-160,8 \pm 66,3	-106,6 \pm 14,1	-130,0 \pm 29,7	-109,8 \pm 20,4
SMU	43,03 \pm 9,1	67,44 \pm 12,9	65,42 \pm 15,8	93,43 \pm 35,2	67,12* \pm 13,6
Ldia	122,2 \pm 13,3	98,8 \pm 11,7	111,7 \pm 13,9	110,0 \pm 16,8	124,9 \pm 19,0

Tabelle 6: Mittelwerte \pm Standardfehler der Kontraktilitätsparameter der Dosis-Wirkungs-Analyse von Crataegus-Gesamtextrakt WS 1442 an sieben rechtsatrialen Kardiomyozyten. Crataegus-Konzentration [g/ml].

relV = relative Verkürzung [%].

INT = Verkürzungs-Zeit-Integral [$\Delta l/\Delta t$].

TTP = Dauer bis zur maximal entwickelten Verkürzung [ms].

$T_{10\%P}$ = Dauer von der 10%igen bis zur maximal entwickelten Verkürzung [ms].

$RT_{50\%}$ = Dauer der Relaxation auf 50% [ms].

SMD = maximale Verkürzungsgeschwindigkeit [-Ldia/s].

SMU = maximale Relaxationsgeschwindigkeit [Ldia/s].

Ldia = diastolische Länge [μ m].

* = signifikante Veränderung des Parameters gegenüber dem Ausgangswert.

III.3 Wirkung der Crataegus-Subextrakte Crs-Blr 80242 A, B und C auf isolierte rechtsatriale Myozyten

III.3.1 Funktionelle Effekte von Crs-Blr 80242 A auf rechtsatriale Myozyten

Die Wirkung des Crataegus-Subextraktes Crs-Blr 80242 A wurde ebenfalls an rechtsatrialen Myozyten untersucht. Dabei fand die Untersuchung von Crs-Blr 80242 A nicht wie die des Gesamtextraktes in Form einer Dosis-Wirkungs-Analyse, sondern als Einzeldosis in einer Konzentration von 10^{-8} [g/ml] statt.

Crs-Blr 80242 A wurde an insgesamt sieben Myozyten, die aus vier Vorhöfen der in Tabelle 3 genannten Patienten isoliert wurden, untersucht.

Die mittlere Verkürzung der Myozyten lag zu Versuchsbeginn bei $4,64 \pm 1,04\%$ und steigerte sich unter Anwesenheit von Crs-Blr 80242 A auf $7,77 \pm 1,23\%$. In Abbildung 11 sind die Originalregistrierungen zweier Kontraktionen eines Kardiomyozyten dargestellt. Dabei fällt neben der Zunahme der Verkürzungsfraction vor allem ein Anstieg der SMD auf.

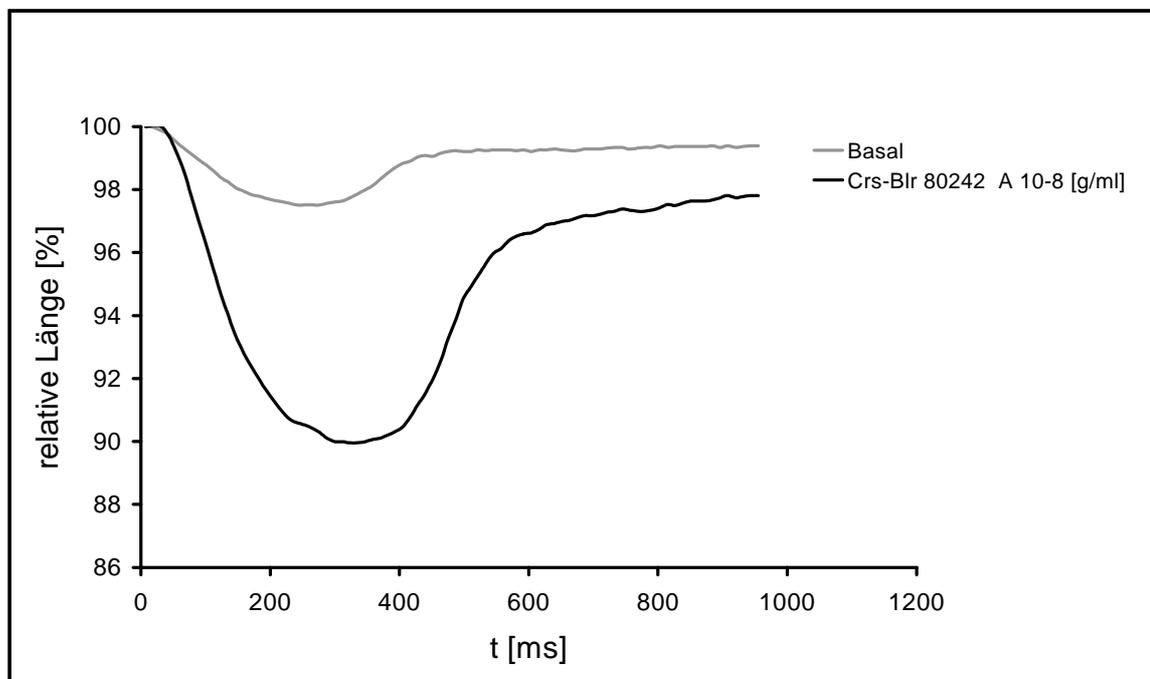


Abbildung 11: Relative Längenänderung bei der Kontraktion eines Kardiomyozyten vor und nach der Behandlung mit Crs-Blr 80242 A.

Die zur basalen Verkürzung signifikante Steigerung der Kontraktilität nach der Verabfolgung einer Einzeldosis von Crs-Blr 80242 A (10^{-8} [g/ml]) ist in Abbildung 12 dargestellt, die Steigerung gegenüber den auf 100% berechneten Ausgangswerten beträgt $184,70 \pm 23,12\%$.

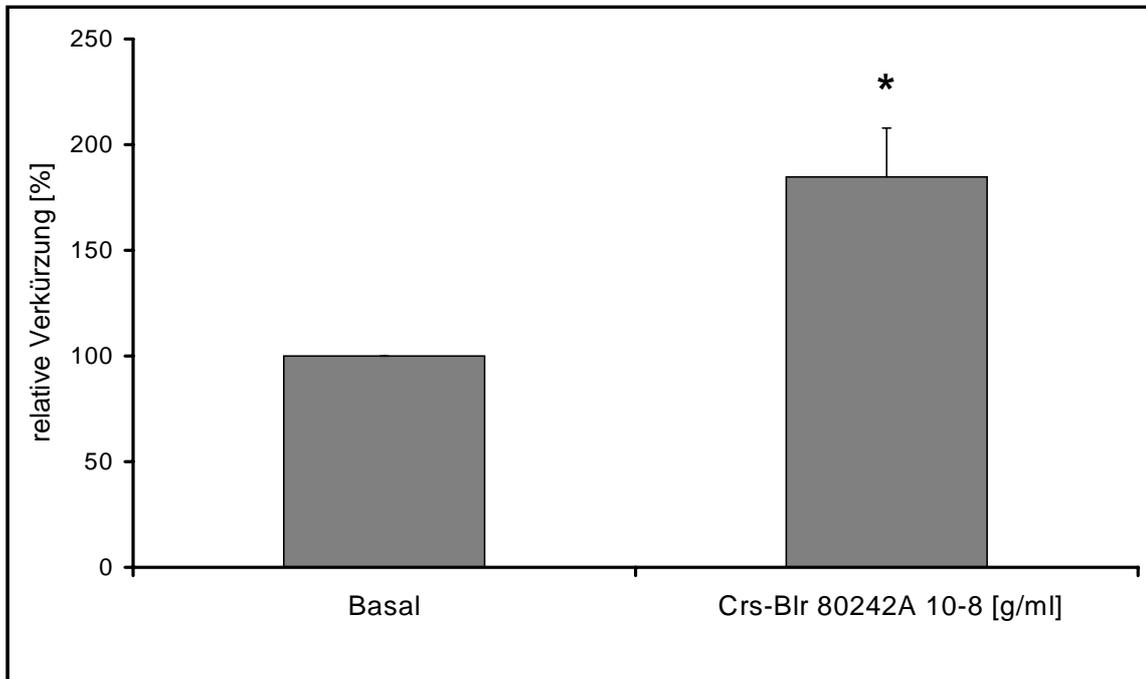


Abbildung 12: Säulendiagramm zur Verdeutlichung der Kontraktilitätssteigerung, die durch Crs-Blr 80242 A hervorgerufen wird.

* = signifikante Zunahme der Kontraktilität gegenüber den Ausgangswerten.

Mit Ausnahme der diastolischen Länge und der maximalen Relaxationsgeschwindigkeit veränderten sich alle übrigen Parameter signifikant. Die Absolutwerte sind in Tabelle 7 dargestellt.

	Kontrolle	Crs-Blr 80242 A 10⁻⁸
relV	4,64±1,04	7,77*±1,22
INT	2262,19±578,16	3743,29*±830,50
TTP	188,67±20,59	234,99*±28,19
T_{10%P}	149,84±19,33	193,83*±26,16
RT_{50%}	315,19±42,99	378,99*±49,76
SMD	-68,65±20,30	-94,44*±25,61
SMU	39,14±9,08	60,65±17,19
Ldia	136,45±10,82	124,25±44,78

Tabelle 7: Mittelwerte ± Standardfehler der Mittelwerte der Versuchsreihe, die mit Crs-Blr 80242 A in einer Konzentration von 10⁻⁸ [g/ml] durchgeführt wurde.

relV = relative Verkürzung [%].

INT = Verkürzungs-Zeit-Integral [$\Delta l/\Delta t$].

TTP = Dauer bis zur maximal entwickelten Verkürzung [ms].

T_{10%P} = Dauer von der 10%igen bis zur maximal entwickelten Verkürzung [ms].

RT_{50%} = Dauer der Relaxation auf 50% [ms].

SMD = maximale Verkürzungsgeschwindigkeit [-Ldia/s].

SMU = maximale Relaxationsgeschwindigkeit [Ldia/s].

Ldia = diastolische Länge [μm].

* = signifikante Veränderung gegenüber dem Kontrollwert.

III.3.2 Funktionelle Effekte von Crs-Blr 80242 B auf rechtsatriale Myozyten

Die Effekte von 10^{-8} [g/ml] Crs-Blr 80242 B auf Vorhofmyozyten wurden an acht Myozyten aus den in Tabelle 3 genannten Patienten untersucht.

Abbildung 13 zeigt das Kontraktionsverhalten eines Myozyten vor und nach der Verabfolgung von Crs-Blr 80242 B.

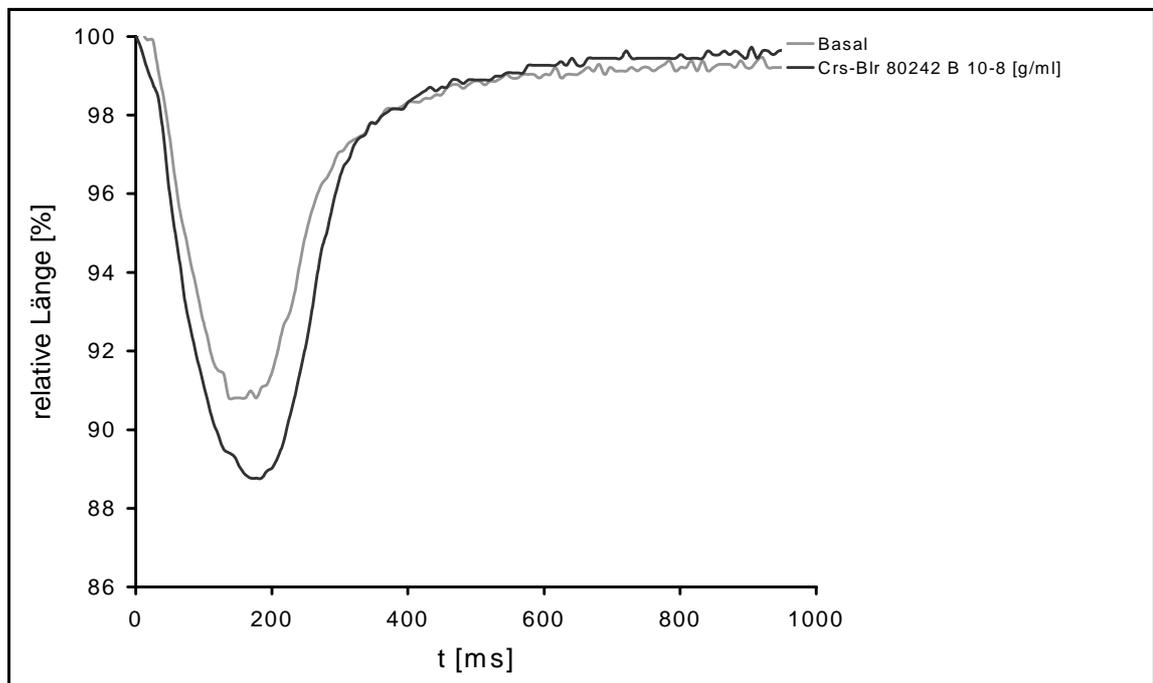


Abbildung 13: Kontraktionsverhalten eines rechtsatrialen Myozyten ohne die zu prüfenden Substanz und in Gegenwart von Crs-Blr 80242 B (10^{-8} [g/ml]).

Abbildung 14 stellt die nur geringe Zunahme der Verkürzungsfraction gegenüber dem Ausgangswert dar. Sie beträgt gegenüber den 100% der Kontrollmessungen lediglich $116,4 \pm 8,6\%$.

Die Kontraktilitätsänderung erreichte sowohl in den Absolutwerten als auch in den auf 100% errechneten Werten keine statistische Signifikanz.

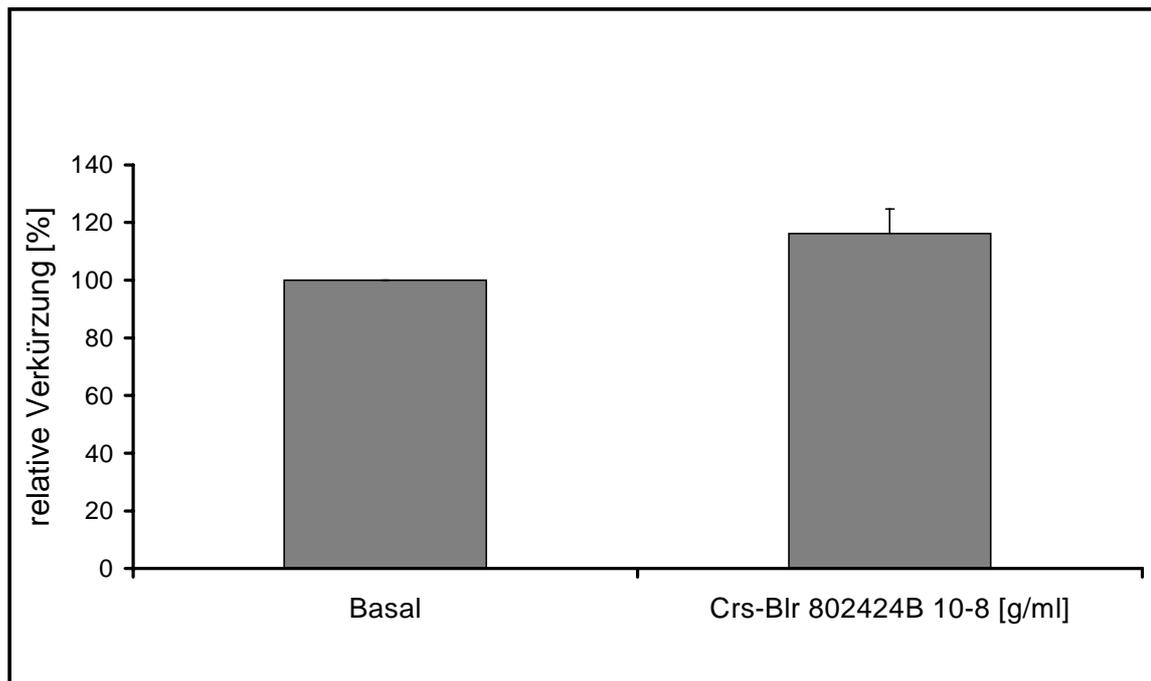


Abbildung 14: Mittelwerte \pm Standardfehler der Mittelwerte der relativen Verkürzung vor und nach der Zugabe von Crs-Blr 80242 B.

Auch die übrigen Kontraktilitätsparameter änderten sich erwartungsgemäß nur geringfügig, wobei die Irrtumswahrscheinlichkeit stets deutlich über $p=0,05$ lag, die Alterationen sind also nicht signifikant. Tabelle 8 zeigt die absoluten Werte.

	Kontrolle	Crs-Blr 80242 B 10^{-8}
relV	5,09±1,10	5,82±1,24
INT	2869,50±639,44	2625,91±366,80
TTP	216,94±14,33	195,66±14,95
T_{10%P}	171,20±15,26	155,87±12,55
RT_{50%}	439,93±65,08	359,69±34,38
SMD	-63,05±16,50	-76,95±16,36
SMU	41,64±22,66	41,16±11,71
Ldia	116,52±12,12	115,33±12,20

Tabelle 8: Änderungen der Kontraktilitätsparameter nach der Zugabe von Crs-Blr 80242 B in einer Konzentration von 10^{-8} [g/ml].

relV = relative Verkürzung [%].

INT = Verkürzungs-Zeit-Integral [$\Delta l/\Delta t$].

TTP = Dauer bis zur maximal entwickelten Verkürzung [ms].

T_{10%P} = Dauer von der 10%igen bis zur maximal entwickelten Verkürzung [ms].

RT_{50%} = Dauer der Relaxation auf 50% [ms].

SMD = maximale Verkürzungsgeschwindigkeit [-Ldia/s].

SMU = maximale Relaxationsgeschwindigkeit [Ldia/s].

Ldia = diastolische Länge [μm].

III.3.3 Funktionelle Effekte von Crs-Blr 80242 C auf rechtsatriale Myozyten

Der dritte Subextrakt Crs-Blr 80242 C konnte an sieben Zellen, die aus fünf Vorhöfen isoliert wurden, untersucht werden. Die Patientendaten sind in Tabelle 3 zusammengefaßt.

Die Untersuchung erfolgte, wie bei den anderen Subextrakten auch, nicht als Dosis-Wirkungs-Analyse, sondern als Gabe einer Einzeldosis in der Konzentration von 10^{-8} [g/ml]. Dabei steigerte sich die Kontraktionsamplitude von anfangs $5,5 \pm 1,5\%$ ohne Crs-Blr 80242 C auf $9,4 \pm 2,0\%$ nach Zugabe des Extraktes. Wenn man die Zunahme der Verkürzungsfraction auf die auf 100% normierten Ausgangswerte bezieht, so ergibt sich eine Steigerung von 100% auf $194,0 \pm 19,6\%$.

Die zwei Originalregistrierungen, die in Abbildung 15 dargestellt sind, repräsentieren die typische Veränderung des Kontraktionsverhaltens nach der Verabfolgung von Crs-Blr 80242 C. Die SMD bleibt dabei nahezu konstant, sie sinkt von $65,07 \pm 41,74$ auf $64,16 \pm 15,52$ [Ldia/s].

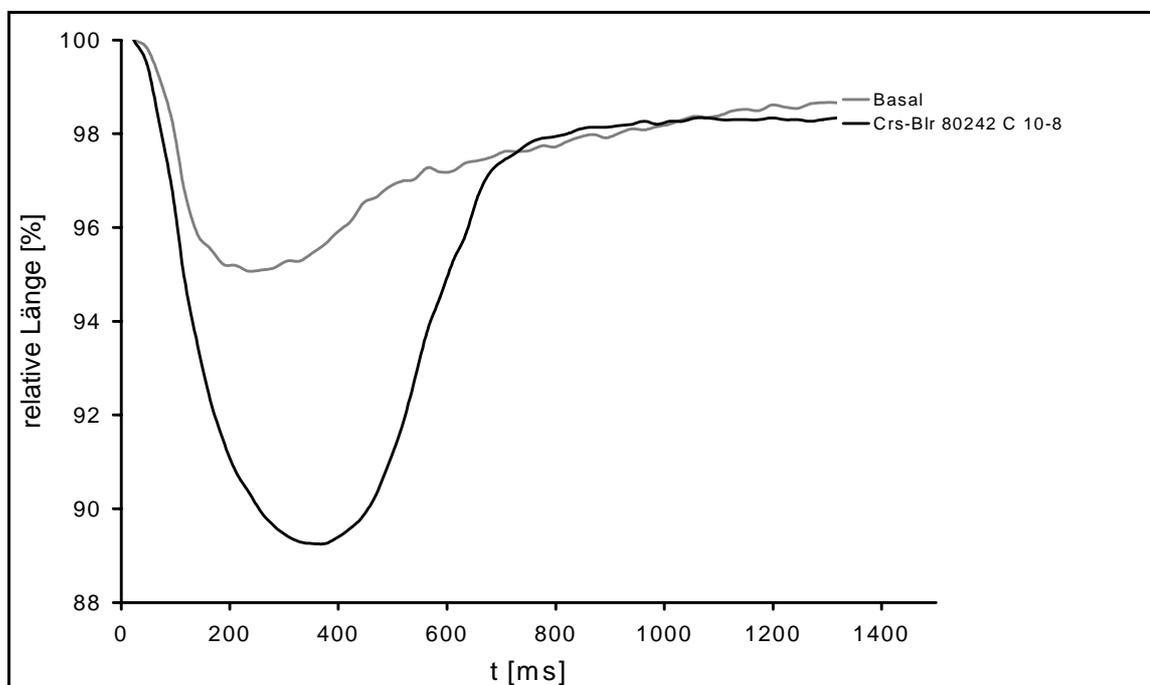


Abbildung 15: Relative Längenänderung eines Kardiomyozyten, die durch Crs-Blr 80242 C hervorgerufen wird.

Abbildung 16 zeigt die zum Ausgangswert signifikant erhöhte Zunahme der Verkürzung durch Crs-Blr 802442 C.

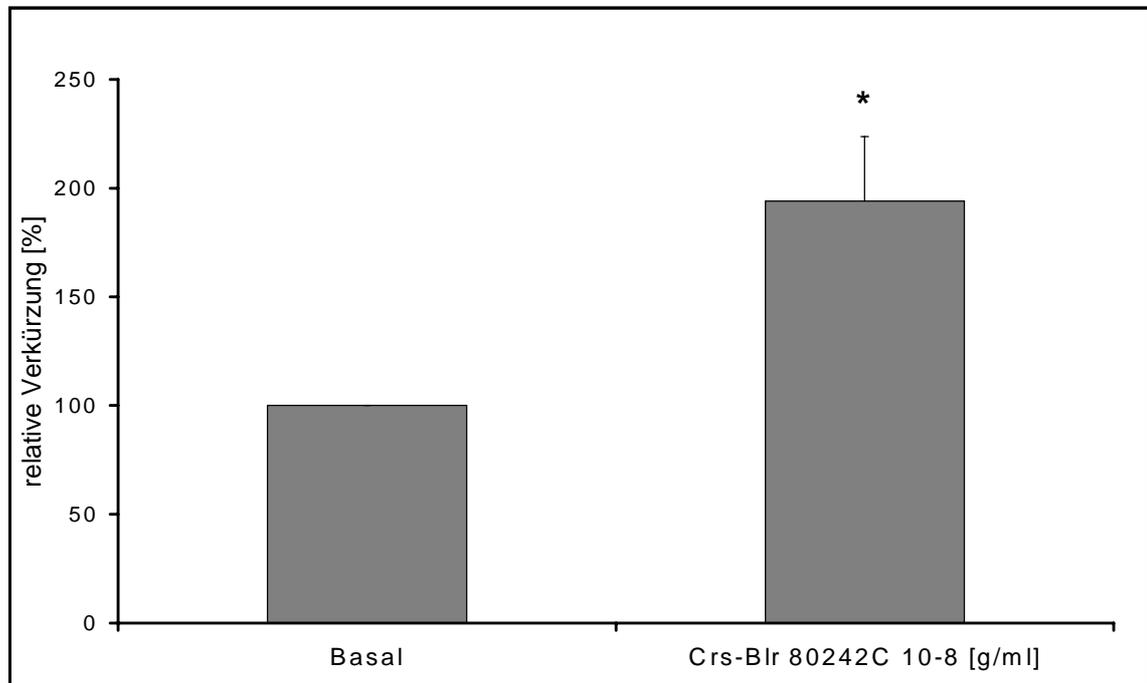


Abbildung 16: Steigerung der Kontraktilität von rechtsatrialen Zellen nach der Verabfolgung von Crs-Blr 80242 C in einer Konzentration von 10^{-8} [g/ml].

* = signifikant gegenüber dem Basalwert

Mit $p=0,002$ ist die relative Verkürzung die einzige Messgröße, die sich signifikant veränderte. Die übrigen Parameter zeigten keine signifikanten Veränderungen. Dabei wiesen die Größen TTP und $T_{10\%P}$ kaum Differenzen zu ihren Ausgangswerten auf, die SMD blieb nahezu konstant. Tabelle 9 faßt die Werte zusammen.

	Kontrolle	Crs-Blr 80242 C 10^{-8}
relV	5,48±1,48	9,36*±2,07
INT	2726,41±612,62	3686,09±755,23
TTP	185,00±19,01	195,82±22,33
$T_{10\%P}$	144,43±18,23	149,35±20,85
RT _{50%}	427,89±77,13	332,43±36,39
SMD	-113,96±54,11	-141,47±36,45
SMU	65,07±41,47	64,16±15,52
Ldia	113,29±11,82	108,76±12,72

Tabelle 9: Mittelwerte ± Standardfehler der Kontraktilitätsparameter der mit Crs-Blr 80242 C (10^{-8} [g/ml]) untersuchten atrialen Myozyten.

relV = relative Verkürzung [%].

INT = Verkürzungs-Zeit-Integral [$\Delta l/\Delta t$].

TTP = Dauer bis zur maximal entwickelten Verkürzung [ms].

$T_{10\%P}$ = Dauer von der 10%igen bis zur maximal entwickelten Verkürzung [ms].

RT_{50%} = Dauer der Relaxation auf 50% [ms].

SMD = maximale Verkürzungsgeschwindigkeit [-Ldia/s].

SMU = maximale Relaxationsgeschwindigkeit [Ldia/s].

Ldia = diastolische Länge [μm].

* = signifikant verschieden vom Ausgangswert.

IV Diskussion

Die Untersuchung von positiv inotrop wirkenden Stoffen ist auf dem Gebiet der Herzinsuffizienzforschung nach wie vor ein zentraler Bestandteil. Dabei bereitet bereits die Auswahl der Spezies die ersten Schwierigkeiten. Im Tiermodell lassen sich unter kontrollierten Bedingungen alle Methoden in praktisch beliebiger Versuchszahl durchführen. Will man jedoch insuffiziente Herzen untersuchen, ist man auf Modelle angewiesen, die die menschliche Herzinsuffizienz nur partiell repräsentieren. Weiterhin ist zu berücksichtigen, daß die Wirkung von pharmakologischen und physiologischen Wirkstoffen durchaus speziesabhängig sein kann [57], [34], [108]. Die Untersuchung der myokardialen Funktion kann je nach Anforderung und gewünschter Aussage mit verschiedenen Methoden, die jeweils ihre Vor- und Nachteile haben, durchgeführt werden, und es stellt sich dabei die Frage, inwieweit die verschiedenen Methoden auf den Gesamtorganismus übertragbar sind.

Die Testung positiv inotroper Substanzen kann durchaus in vivo durchgeführt werden, jedoch ist die Beurteilung schwierig, denn es können zwar die klinischen Parameter wie maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit (dP/dt_{max}), die linksventrikuläre Ejektionsfraktion (EF) und das Herzminutenvolumen (HMV) bestimmt werden. Allerdings sind diese Kriterien von der Vor- und der Nachlast abhängig und diese werden wiederum durch die Inotropie und den Gefäßtonus bestimmt.

Bei der Verwendung isolierter Streifenpräparate oder isolierter Kardiomyozyten werden diese Probleme umgangen. Leider unterliegen auch diese Methoden, die die Verwendung humanen Myokards vorsehen, einigen Beschränkungen:

Während menschliches Vorhofmyokard an jedem Zentrum mit koronarer Bypass-Chirurgie in ausreichender Menge zu Verfügung steht, kann Ventrikelmyokard nur in wenigen transplantierenden Zentren gewonnen werden. Wegen der nur begrenzten Transplantationsfrequenz des einzelnen Zentrums ist es außerdem notwendig, das Myokard zum Teil über weite Strecken zu

transportieren. Dies ist erst durch die Einführung der Kardioplegie mit BDM möglich geworden.

Noch wesentlich problematischer ist die Verwendung von Kontrollmyokard, so konnten für die vorliegende Arbeit nur drei Kontrollherzen verwendet werden.

Prinzipiell gibt es zwei verschiedene Möglichkeiten, das Myokard in vitro zu untersuchen: Entweder im Muskelstreifen-Präparat oder in Form von Einzelzellen.

Am Streifenpräparat kann die Veränderung der Spitzenkraft gemessen werden. Dabei sollten möglichst physiologische Bedingungen gelten, also eine Frequenz von 1 Hz bei einer Temperatur von 37°C. Das Hauptproblem bei Muskelstreifen liegt darin, daß auch im innersten des Streifens eine optimale Versorgung mit Sauerstoff und den zu testenden Pharmaka gewährleistet sein muß. Da dies nur durch Diffusion geschieht, darf der Durchmesser eines solchen Streifens maximal 0,6 mm² betragen. Werden die Präparate aus atrialem Gewebe gewonnen, so stellt dies kein Problem dar, weil sich im Vorhofgewebe genügend kleine Trabekel befinden, die ohne große Mühe in toto herauspräpariert werden können. Anders sieht es jedoch bei ventrikulären Myokardstreifen aus. Dort sind die Trabekel so groß, daß man aus diesen kleine Streifen ausschneiden muß. Diese mechanische Verletzung des Myokards geht mit einer massiven lokalen Calciumfreisetzung einher, die konsekutiv zu Kontrakturen und Zelluntergängen führt. Hierdurch wird das Kontraktionsverhalten des Myokardstreifens beeinträchtigt. Glücklicherweise hat sich dieses Problem seit der Einführung von BDM minimiert.

Ein nächstes Problem bei der Verwendung von Muskelstreifen besteht nun darin, daß es sich hierbei um multizelluläre Präparate handelt. Das heißt also, daß neben den Kardiomyozyten, deren Funktion untersucht werden soll, auch andere Zellen in dem Streifen existieren. Dabei handelt es sich in der Mehrheit um Endothelzellen und Fibroblasten, und Brutsaert et al. konnten zum Beispiel demonstrieren, daß Endothelzellen die myokardiale Funktion beeinflussen können [16]. Darüber hinaus kann es durch intramyokardiale Veränderungen wie etwa Fibrosierung und Zellnekrosen zu verändertem Kontraktionsverhalten des Myokardstreifens kommen und so die Messung verfälscht werden. Von daher

fällt es letztendlich schwer zu sagen, ob eine herabgesetzte Kontraktilität bei Streifenpräparaten aus terminal-insuffizientem Myokard im Vergleich mit denen aus gesundem Myokard in einer Veränderung des Gesamtgewebes oder auf der Stufe der Myozyten zu suchen ist.

Die Beseitigung zumindest einiger dieser Unsicherheitsfaktoren bringt die Methode der Einzelzelluntersuchung aus humanem linksventrikulärem Myokard. 1981 gelang es Powell et al. [82] erstmals, humane ventrikuläre Myozyten aus Myokard von Kindern und Erwachsenen zu isolieren. Bereits ein Jahr später gelang es Bustamente et al., aus atrialem Gewebe Myozyten isolieren und elektrisch zu stimulieren [17]. Darauf verbesserten verschiedene Arbeitsgruppen die Isolationsmethode durch die Modifizierung des Isolationsvorganges mit Collagenase [5], [17], [24], [70], unspezifischer Protease [18] und Hyaluronidase [52].

IV. 1 Methode zur Gewinnung von isolierten Kardiomyozyten

IV.1.1 Isolation

In unserem Labor geschah die Isolierung von Myozyten in Anlehnung an ein Protokoll von Harding [42] (s. Kapitel II). Der Gehalt an morphologisch intakten Zellen, die unseren Auswahlkriterien entsprachen, lag zumeist bei 10%, selten waren jedoch auch 50-70% zu verwenden. Die Versuchstemperatur lag bei 32,5°C und die Stimulationsfrequenz lag bei 0,2 Hz. Die Stärke des Stimulus betrug im Mittel $30,34 \pm 0,66$ Volt, die extrazelluläre Calciumkonzentration lag bei 1,25 mM. Das Kontraktionsverhalten der Myozyten verhielt sich unter diesen Umständen sicher und kontinuierlich, und die basale Verkürzung von ventrikulären Myozyten lag bei $3,30 \pm 0,60\%$, die der atrialen bei $4,99 \pm 0,53\%$. Der klare Vorteil dieser Methode liegt zum einen darin, daß die Myozyten frei von Einflüssen der Fibroblasten und der Endothelzellen sind. Zum anderen liegt ein für die Zelle ausreichendes Sauerstoffangebot vor und die Konzentration des zu testenden Pharmakons und der pH-Wert entsprechen genau den in der Tyrode eingestellten Werten.

Eine Übertragung der mit Hilfe der Einzelzellmethode erzielten Ergebnisse auf Streifenpräparate ist jedoch nur bedingt möglich, weil die Myozyten nicht unter physiologischen Bedingungen stimuliert werden. Ein weiterer Unterschied besteht darin, daß Myokardstreifen zu Versuchszwecken eingespannt werden und isometrisch kontrahieren, während die Kontraktion von Einzelzellen isotonisch erfolgt. Gegenwärtig wird diskutiert, ob die Spannung, der die Streifenpräparate ausgesetzt sind, zu Alterationen des Calciumstoffwechsels und damit zu veränderten Meßergebnissen führt. So konnten nämlich Harding et al. eine geringere statistische Streubreite der Kontraktilitätsparameter an isolierten Myozyten im Vergleich zu Muskelstreifenpräparaten nachweisen [41]. Holubarsch et al. konnten allerdings keine prinzipiellen Unterschiede zwischen isometrischem und isotonischem Kontraktionsverhalten feststellen.

Insgesamt ist die Untersuchung isolierter Kardiomyozyten eine wertvolle Methode zur Charakterisierung der Myokardfunktion.

IV.1.2 Kontraktile Reserven und Rezeptoren.

Für die Arbeit mit isolierten Myozyten ist es wichtig, sich über die Morphologie hinaus Klarheit über den Zustand der Zellen zu verschaffen und sicherzustellen, daß während des Isolationsvorganges die Membranen, die Rezeptoren und die intrazellulären Organellen nicht beschädigt wurden und so ihre Funktion beibehalten haben. Zu diesem Zweck wurden die kontraktile Reserven der Zellen durch ansteigende extrazelluläre Calciumkonzentrationen charakterisiert und die Rezeptorfunktion durch Stimulation von β -Rezeptoren mittels Isoprenalin überprüft.

IV.1.2.1 Calcium-Konzentrations-Wirkungs-Analyse

Bei schrittweise ansteigenden Calciumkonzentrationen von 1,25 bis maximal 15 mmol/l nahm die relative Verkürzung auf 369% der Kontrolle zu. Dabei erhöhten sich auch die Kontraktionsgeschwindigkeiten kontinuierlich, ebenso aber auch die Zeiten TTP und $RT_{50\%}$. Obwohl also die Kontraktionsgeschwindigkeit zunahm, stieg die Dauer des gesamten Kontraktionszyklus an. Die an der Sequestrierung der Calciumionen beteiligten Apparate benötigen diese Zeit, um das erhöhte Calciumangebot zu verarbeiten. Diese Ergebnisse zeigen das Vorhandensein eines funktionsfähigen kontraktilem Apparates, kontraktile Reserven und intakter Membranen.

IV.1.2.2 Isoproterenol-Konzentrations-Wirkungsanalyse

Um zu überprüfen, ob nach dem Isolationsvorgang die membranständigen Rezeptoren und die nachgeschalteten second messenger Systeme noch intakt sind, wurden die Myozyten mit dem β -rezeptorspezifischem Agens Isoproterenol stimuliert. Isoproterenol weist die gleiche Affinität zu β_1 - und β_2 -Rezeptoren auf.

Nach der Bindung von Isoproterenol an den Rezeptor kommt es zu einer Bindung von GTP an das stimulierende GTP-bindende Protein, G_s . Aufgrund der darauffolgenden Konformationsänderung des G_s -Proteins kommt es zu einer Stimulation der Adenylatzyklase mit vermehrter intrazellulärer Bildung von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP). Die dadurch aktivierten Proteinkinasen führen durch Phosphorylierung intrazellulärer Proteine wie Ca^{2+} -Kanälen, der Ca^{2+} -ATPase, Troponin I und Phospholamban zu positiv inotropen, dromotropen, chronotropen und lusitropen Effekten [14].

Der positiv inotrope Effekt ließ sich auch an isolierten Myozyten nachweisen, wo Isoproterenol die relative Verkürzung der Myozyten bei einer Konzentration von 10^{-7} M auf 239% der Kontrolle steigerte [S. Kamenzin, Med. Diss., 1998].

Abbildung 17 macht den Unterschied der Kontraktilitätssteigerungen, die durch erhöhtes Calciumangebot oder durch cAMP hervorgerufen werden, anhand von Originalregistrierungen deutlich.

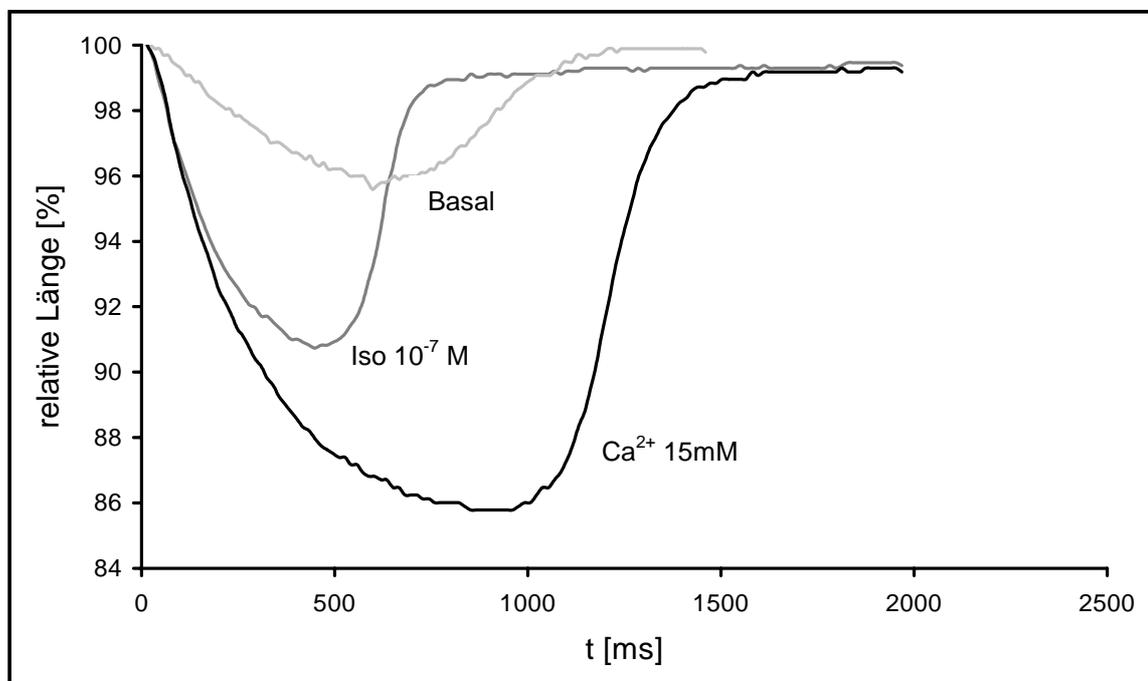


Abbildung 17: Originalregistrierungen aus Versuchen mit Isoprenalin (10^{-7} M) und Calcium (15 mM).

Die Daten aus diesen Versuchen belegen, daß der kontraktile Apparat der isolierten Zellen funktionsfähig ist und die kontraktilen Reserven erhalten sind. Weiterhin wird bestätigt, daß die Membranen intakt sind und der Rezeptorapparat und die nachgeschalteten Systeme funktionieren. Somit ist das vorliegende Modell der Isolierung menschlicher Kardiomyozyten eine übliche Methode zur Messung funktioneller Effekte am menschlichen Vorhof- und Ventrikelmyokard und wurde daher zur Überprüfung der Effekte von WS 1442 und der Subextrakte verwendet.

IV.2 Funktionelle Effekte des Crataegus-Gesamtextraktes WS 1442 auf die Kontraktilität isolierter linksventrikulärer humaner Myozyten

IV.2.1 Wirkung von WS 1442 an isolierten linksventrikulären humanen Kardiomyozyten aus terminal-insuffizientem Myokard (NYHA IV)

WS 1442 wirkt an isolierten linksventrikulären humanen Myozyten aus terminal-insuffizientem Myokard positiv inotrop. Die Zunahme der relativen Verkürzung ist dabei dosisabhängig und zeigt eine Signifikanz ab 10^{-9} [g/ml], die maximale Verkürzung beträgt $210,68 \pm 20,18\%$ bei einer Konzentration von 10^{-7} [g/ml]. Setzt man diesen Wert in Bezug zu der maximalen durch Calciumerhöhung erreichten Inotropiezunahme von 369%, so beträgt die durch WS 1442 ausgelöste Zunahme 57,14%, die durch Isoproterenol verursachte Inotropiesteigerung 64,79% (10^{-7} M). Das Verhältnis von maximaler Calciumwirkung zu maximaler Isoproterenolwirkung steht in gutem Einklang mit den Ergebnissen von Feldmann et al. In dieser Arbeit konnte ebenfalls demonstriert werden, daß Acetylstrophanthidin, ein Herzglykosid, das seine positiv inotrope Wirkung unabhängig von cAMP entfaltet [75], in einer Konzentration von $4 \cdot 10^{-7}$ M eine Inotropiezunahme von 61% im Vergleich zur maximalen Calciumwirkung hervorruft. Diese Werte zeigen, daß es sich bei WS 1442 um eine potente positiv inotrop wirkende Substanz handelt, die am insuffizienten linken Ventrikel eine ähnlich starke Wirkung wie Isoproterenol (10^{-7} M) und dem Herzglykosid Acetylstrophanthidin ($4 \cdot 10^{-7}$ M) entfaltet.

IV.2.2 Wirkung von WS 1442 an isolierten linksventrikulären humanen Myozyten aus nicht insuffizientem Myokard

WS 1442 wirkt an isolierten linksventrikulären Myozyten aus nicht terminal-insuffizientem Myokard positiv inotrop. Die Inotropiesteigerung ist nahezu genau so groß wie die an Myozyten aus terminal-insuffizientem Myokard. Das bedeutet, daß WS 1442 unabhängig vom Schweregrad der Herzinsuffizienz wirksam ist. Das könnte den Einsatzbereich von Crataegus-Extrakten ausdehnen, bislang ist die Indikation für den Einsatz von Weißdornpräparaten auf die milde bis

mittelgradige Herzinsuffizienz (NYHA I-II) beschränkt. Eine statistische Signifikanz konnte jedoch bei keinem der Kontraktilitätsparameter erreicht werden, was allerdings auf die geringe Anzahl von drei Versuchen zurückzuführen ist. Wie schon im Vorfeld besprochen, sind solche Spenderherzen eine Rarität.

IV.3 Wirkung von WS 1442 an isolierten rechtsatrialen humanen Myozyten

WS 1442 wirkt an isolierten rechtsatrialen humanen Kardiomyozyten ebenfalls deutlich positiv inotrop im Sinne einer Zunahme der Verkürzungsfraktion, ab einer Konzentration von 10^{-9} [g/ml] war die Inotropiezunahme signifikant. Abbildung 18 faßt die Konzentrationsabhängige Inotropiezunahme an Ventrikel und Vorhof zusammen.

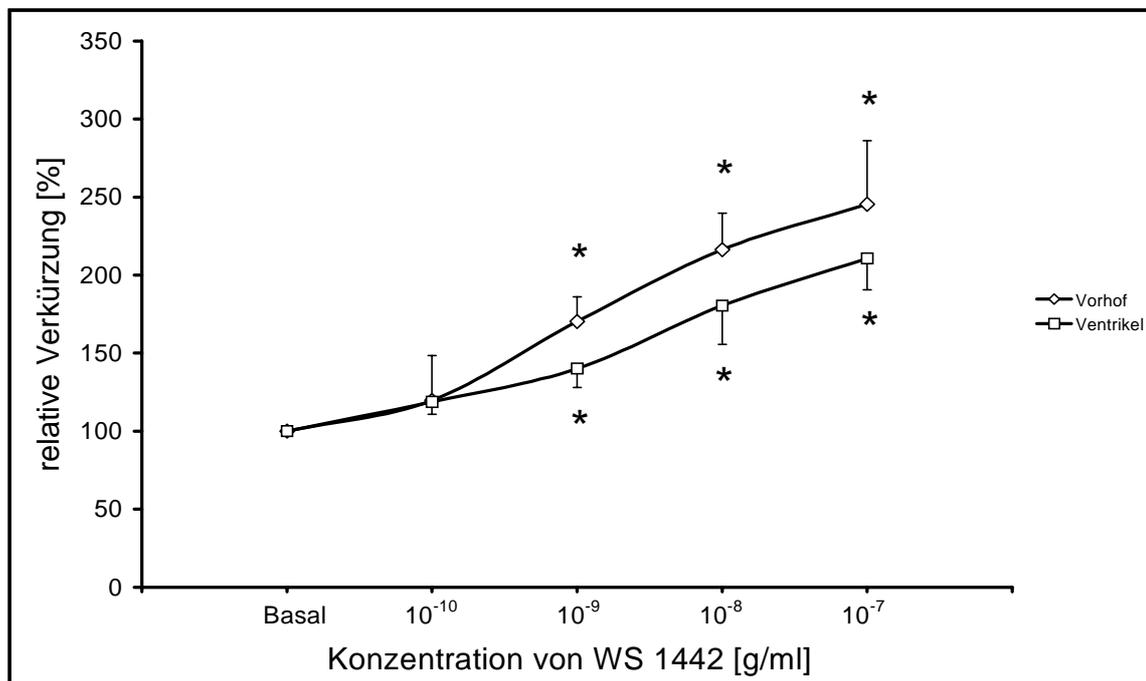


Abbildung 18: Vergleichende Darstellung der Inotropiezunahme durch WS 1442 an linksventrikulären Myozyten aus terminal-insuffizientem Myokard und rechtsatrialen Myozyten. * = signifikant vs. Basal.

Wird ein t-Test für unverbundene Stichproben durchgeführt, so zeigt sich allerdings, daß sich das Kontraktionsverhalten von rechtsatrialen und insuffizienten linksventrikulären Myozyten lediglich hinsichtlich der TTP und der $T_{10\%P}$ signifikant unterscheiden. Während also am Ventrikel die TTP konstant bleibt und sich bei zunehmender Verkürzung die SMD steigert, ist das Verhältnis am Vorhof genau umgekehrt: Die SMD wird nicht signifikant verändert, die TTP verlängert sich bei steigender Kontraktilität der Myozyten signifikant.

Das Verhältnis von oligomeren Procyanidinen (OPCs) zu Flavonoiden beträgt im Gesamtextrakt 3,9 : 1, so daß die OPCs quantitativ überwiegen. Dies könnte von Bedeutung sein, da die OPCs auch für andere für WS 1442 nachgewiesene kardioprotektive Wirkungen wie zum Beispiel die Erhöhung des koronaren Blutflusses, die Verringerung von Reperfusionsarrhythmien und Radikalfängereigenschaften hauptverantwortlich zu sein scheinen [19]. Um nun zu untersuchen, ob die OPCs tatsächlich auch für die positive Inotropie verantwortlich sind, wurde der Gesamtextrakt so aufgetrennt, daß in der Fraktion C (Crs-Blr 80242 C) fast keine Flavonoide sondern nur OPCs enthalten sind. Es gilt nun zu zeigen, welche Konsequenzen die Auftrennung des Gesamtextraktes WS 1442 auf den positiv inotropen Effekt hat (s. Abbildung 19).

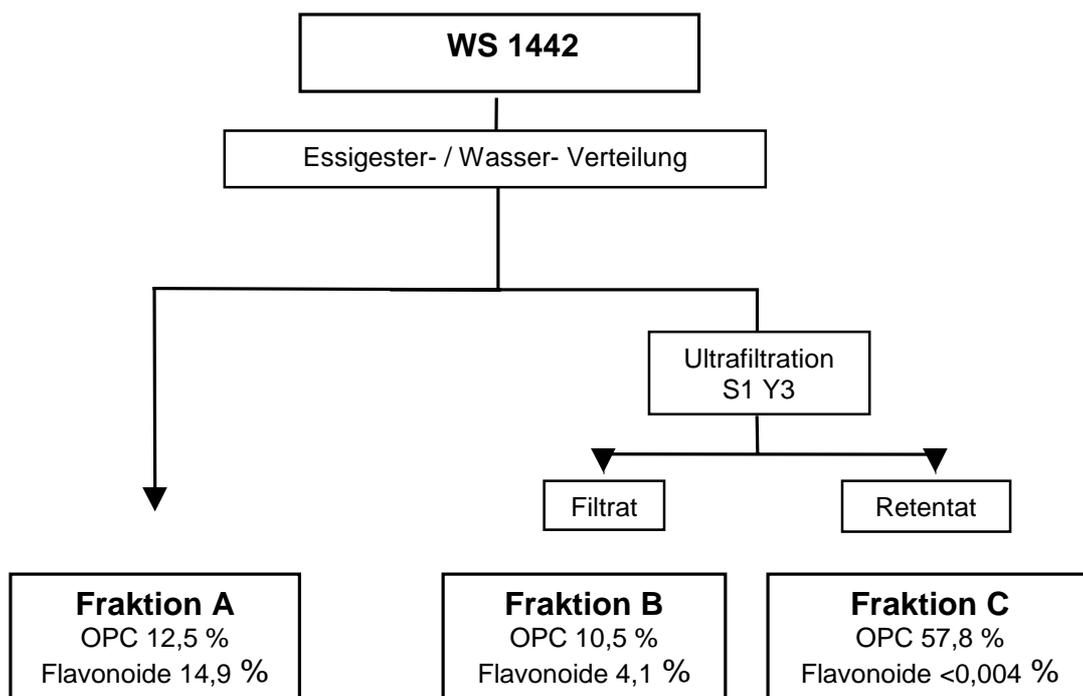


Abbildung 19: Fraktionierung von WS 1442.

IV.4 Funktionelle Effekte der Subextrakte Crs-Blr 80242 B, A und C auf die Kontraktilität rechtsatrialer Myozyten

Wie Abbildung 20 erkennen lässt, wirkt nicht nur der Gesamtextrakt WS 1442 an rechtsatrialen Myozyten positiv inotrop, sondern auch die Subextrakte Crs-Blr 80242 A und C in einer Konzentration von 10^{-8} [g/ml].

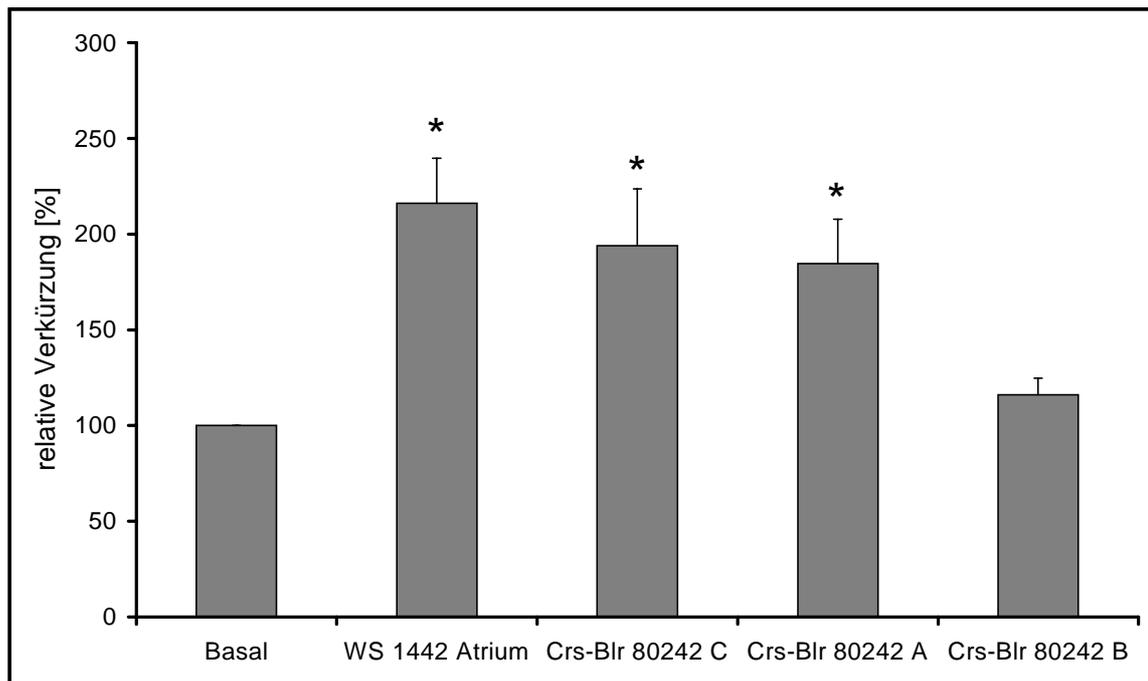


Abbildung 20: Vergleich der durch WS 1442 und den Fraktionen Crs-Blr 80242 A, B und C an rechtsatrialen Myozyten hervorgerufenen positiven inotropen Effekte.

Crs-Blr 80242 B wirkt in einer Konzentration von 10^{-8} [g/ml] nicht signifikant positiv inotrop, ebenso wird keiner der anderen Kontraktilitätsparameter signifikant verändert. Doch im Gegensatz zu den anderen am Vorhof untersuchten Extrakten zeigt sich hier bei einer Konzentration von 10^{-8} [g/ml], daß, selbst wenn es sich hierbei um keinesfalls signifikante Veränderungen handelt, die Zeiten, die zur Kontraktion und zur halbmaximalen Relaxation benötigt werden, abnehmen. Es ist also nicht auszuschließen, daß Crs-Blr 80242 B in deutlich höheren Konzentrationen wie zum Beispiel 10^{-6} oder 10^{-5} [g/ml] deutliche Effekte aufweisen könnte. Angenommen, der oben beschriebene Trend zur Verkürzung des Kontraktionszyklus würde sich fortsetzen, so entspräche dies einer durch Erhöhung des intrazellulären Gehaltes von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) verursachten Alteration der Kontraktionsmechanik [44].

Tatsächlich konnten Schüssler et al. nachweisen, daß die in Crataegus enthaltenen Flavonoide die intrazelluläre Konzentration von cAMP durch Inhibition der Phosphodiesterase ansteigen lassen [92].

Davon ausgehend, daß Crs-Blr 80242 B in hohen Konzentrationen cAMP-vermittelt positiv inotrop wirken könnte, stellt sich die Frage nach der oralen Bioverfügbarkeit von Flavonoiden. Während Graefe et al. in einer Übersichtsarbeit von 0-50% Resorption berichten [39], konnten Gugler et al. [40] nach der oralen Verabfolgung des Flavonoids Quercetin keine meßbaren Plasmaspiegel von Quercetin detektieren. Auch im Urin der Probanden konnten weder die unveränderte noch metabolisierte Formen nachgewiesen werden. Wenn Flavonoide generell schlecht resorbierbar sein sollten, so ist in der Praxis eine wirksame Plasmakonzentration von 1 mg/l nur schwer oder nicht zu erreichen. Aus diesem Grunde wurde Crs-Blr 80242 B nicht in höherer Konzentration getestet. Weiterhin kann davon ausgegangen werden, daß die in Crs-Blr 80242 B enthaltenen Substanzen eine für die Wirkung des Gesamtextraktes WS 1442 zu vernachlässigende Bedeutung haben. Dies ist aus therapeutischer Sicht besonders wichtig, da nachgewiesen ist, daß sich eine Erhöhung des cAMP-Gehaltes in der Herzmuskelzelle in der Therapie der Herzinsuffizienz als prognostisch ungünstig erwiesen hat [49].

Auch der Subextrakt Crs-Blr 80242 A wirkt an atrialen Kardiomyozyten positiv inotrop, die Zunahme der Verkürzungsfraction liegt jedoch unter der des

Gesamtextraktes. Neben der Verkürzungsfraction nehmen alle anderen Parameter bis auf die diastolische Länge und die maximale Relaxationsgeschwindigkeit zu. Der Unterschied zu dem Gesamtextrakt besteht nun darin, daß auch die SMD und $RT_{50\%}$ bei einer Konzentration von 10^{-8} [g/ml] zunimmt. Hieraus läßt sich ableiten, daß die in Crs-Blr 80242 A enthaltenen Substanzen eine oder mehrere Wirkkomponenten enthalten, deren Effekt(e) innerhalb des Wirkspektrums des Gesamtextraktes zumindest teilweise überspielt werden. Entscheidend hierbei ist, daß eine im Vergleich zum Gesamtextrakt etwa dreifach höhere Konzentration an Flavonoiden vorliegt. Dieser erhöhte Flavonoidgehalt könnte zu einer etwas veränderten Mechanik der Kardiomyozyten beitragen.

Somit scheint die Auftrennung sehr hohe funktionelle Konsequenzen zu haben, was die Unterschiede hinsichtlich des Wirkstoffgehalts und der Wirksamkeit der verschiedenen Fraktionen betrifft. Dabei muß jedoch hypothetisch davon ausgegangen werden, daß OPCs *oder* Flavonoide die Wirkkomponente in WS 1442 ist. Der OPC-Gehalt beträgt im Gesamtextrakt 18,75%, in Crs-Blr 80242 A 12,5%. Der OPC-Gehalt in Crs-Blr 80242 A beträgt demnach 66,67% des Gesamtextraktes. Das heißt also, daß bei einer Konzentration von 10^{-9} [g/ml] des Gesamtextraktes und 10^{-8} [g/ml] des Subextraktes Crs-Blr 80242 A in der Lösung mir Crs-Blr 80242 A eine insgesamt 6,7-fach höhere Konzentration an OPCs vorliegt. Da aber die relative Verkürzung bei WS 1442 in einer Konzentration von 10^{-9} [g/ml] von $4,73 \pm 0,68\%$ auf $7,85 \pm 1,23\%$ zunimmt und bei Crs-Blr 80242 A bei einer Konzentration von 10^{-8} [g/ml] von $4,64 \pm 1,04\%$ auf $7,77 \pm 1,22\%$ ansteigt, also eine etwa gleich große Zunahme der Verkürzungsfraction bei fast siebenfach höherer OPC-Konzentration in Crs-Blr 80242 A, ist davon auszugehen, daß sich die OPCs in Crs-Blr 80242 A in ihrer Zusammensetzung von denen im Gesamtextrakt unterscheiden. Die gilt jedoch nur für den Fall, daß OPCs als alleinige wirksamkeitsbestimmende Anteile angesehen werden. Dies kann nun so interpretiert werden, daß sich OPCs und auch Flavonoide nach ihrem Löslichkeitsverhalten und ihrer Größe entsprechend auftrennen lassen, denn sonst müßte ja die Effektivität des Subextraktes Crs-Blr 80242 A gleich der des Gesamtextraktes sein.

Ginge man nun im umgekehrten Falle davon aus, daß *nur* die Flavonoide den wirksamen Bestandteil von WS 1442 ausmachen würden, so müßte die

Zunahme der relativen Verkürzung ebenfalls größer sein als die des Gesamtextraktes, da der Anteil an Flavonoiden im Extrakt Crs-Blr 80242 A gut das dreifache des Gesamtextraktes beträgt. Dieses diskrepante Verhalten von Substanzgehalt und Wirksamkeit kann auf zwei Ursachen zurückgeführt werden:

- 1) Es gibt eine Reihe von strukturell verwandten Molekülen in WS 1442, die alle über *einen* Mechanismus an der Herzmuskelzelle wirken, sich aber aufgrund ihrer Eigenschaften wie zum Beispiel Größe (Polymerisationsgrad?) oder ihrer Polarität (Substitution von funktionellen Gruppen?) in ihrer Affinität unterscheiden und sich aufgrund eben dieser unterschiedlichen Eigenschaften auch in dem Fraktionierungsvorgang unterschiedlich auftrennen.
- 2) Verschiedene Substanzen, die alle im Gesamtextrakt enthalten sind, wirken auf verschiedene Weisen an den Kardiomyozyten und werden bei der Fraktionierung voneinander getrennt. Dazu könnten jedoch die unter 1) genannte Punkte hinzutreten, wie zum Beispiel unterschiedlich Affinität, aber auch Antagonismus oder Synergismus, was die Interpretation erschwert.

Die zweite Möglichkeit ist wahrscheinlich die richtigere, da es bei einem derart komplexem Stoffgemisch, wie es ein Auszug aus Pflanzenbestandteilen darstellt, nicht sehr wahrscheinlich ist, daß nur eine wirksame Komponente vorliegt, die frei von den Einflüssen der übrigen Bestandteile ist. Dafür spricht auch der veränderte zeitliche Ablauf der Kontraktion von Myozyten, der sich jeweils unter der Anwesenheit von WS 1442, Crs-Blr 80242 A oder Crs-Blr 80242 C ändert, was auf jeweils verschiedenen Wirkmechanismen und deren gegenseitige Beeinflussung beruhen könnte. Als letzten Punkt gilt es hierbei anzuführen, daß WS 1442 die insgesamt stärkste Wirkung von allen vier am Vorhof getesteten Extrakten hinsichtlich der Inotropie entfaltet, so daß anzunehmen ist, daß sich hier verschiedene Mechanismen überlagern und addieren.

Der Crataegus-Subextrakt Crs-Blr 80242 C bewirkt in einer Konzentration von 10^{-8} [g/ml] an isolierten rechtsatrialen humanen Kardiomyozyten eine signifikante Zunahme der Verkürzungsfraktion. Dabei bleiben die Änderungen der übrigen Kontraktilitätsparameter ohne Signifikanz. Die TTP bleibt sogar nahezu unverändert, sie steigt lediglich von $185 \pm 19,01$ auf $195,92 \pm 22,33$ ms an.

Der Flavonoidanteil in Crs-Blr 80242 C beträgt weniger als 0,004%, der OPC-Gehalt dagegen 57,8%. Aufgrund des Verhältnisses von OPCs zu Flavonoiden von 14450 : 1 kann davon ausgegangen werden, daß die positive inotrope Wirkung, die Crs-Blr 80242 C an isolierten humanen rechtsatrialen Kardiomyozyten hervorruft, alleine durch OPCs vermittelt wird. Doch obwohl der Anteil an OPCs in Crs-Blr 80242 C etwa dreimal höher ist als in dem Gesamtextrakt WS 1442, ist die Zunahme der Verkürzungsfraktion, die WS 1442 bei einer Konzentration von 10^{-8} [g/ml] entfaltet, größer als die von Crs-Blr 80242 C bei gleicher Konzentration. Daraus läßt sich ableiten, daß die in Crs-Blr 80242 C enthaltenen OPCs wahrscheinlich den Löwenanteil der durch WS 1442 hervorgerufenen positiv inotropen Wirkung ausmachen, jedoch nicht die alleinigen Wirkstoffe sind.

Wie Abbildung 20 zeigt, ist die Effektivität von Crs-Blr 80242 A gegenüber der von Crs-Blr 80242 C nicht wesentlich abgeschwächt, obwohl in Crs-Blr 80242 A deutlich weniger OPCs enthalten sind als in Crs-Blr 80242 C. Das heißt also, daß entweder die in Crs-Blr 80242 A enthaltenen OPCs potenter sind als die der Fraktion Crs-Blr 80242 C, oder aber daß die in Crs-Blr 80242 A vorliegenden Flavonoide eine modulierende Wirkung zu haben scheinen, wenngleich sie auch keine Voraussetzung für eine Steigerung der Kontraktionskraft sind.

Im Hinblick auf die klinische Relevanz der OPC-reichen Fraktion C stellt sich auch hier die Frage nach der oralen Bioverfügbarkeit. Anders als bei den Flavonoiden konnte Hecker-Niedeck [46] nachweisen, daß sich OPCs vergleichsweise gut resorbieren lassen. Die mittlere Absorptionsrate einer OPC-Gesamtfraktion lag bei 20-31%, die individuellen Raten für unterschiedliche Substanzen reichten von 16% bis 81% je nach Substanz. Weiterhin konnte bewiesen werden, daß Crs-Blr 80242 C im Tierversuch ebenso wie WS 1442 das Auftreten von Reperfusionsarrhythmien drastisch verringerte. Die Ergebnisse der beiden Studien sind weitgehend identisch, was so interpretiert werden kann, daß die OPCs aus Crs-Blr 80242 C wiederum den Hauptanteil der

durch WS 1442 hervorgerufenen Wirkung ausmachen oder aber daß nur die OPCs aus WS 1442 resorbiert und wirksam werden, da Flavonoide wie oben bereits diskutiert, eine nur schlechte orale Bioverfügbarkeit aufweisen.

Davon ausgehend, daß während der Ischämiezeit am Herzen durch Ligieren der Koronargefäße Sauerstoffradikale gebildet werden und die Spiegel an freien Fettsäuren ansteigen und diese Ereignisse an der Entstehung von Reperfusionarrhythmien beteiligt sein sollen [1], [83], wurde in einer Arbeit von Chatterjee et al. die Hemmung der Lipidperoxidation als Maß der Radikalbildung durch WS 1442 und die drei Fraktionen ebenso getestet wie die Inhibition der Humanen Neutrophilen Elastase (HNE), die als Maß der Proteolyse während der Ischämie gelten soll. Es zeigte sich, daß die Hemmung sowohl der HNE als auch der Lipidperoxidation durch Crs-Blr 80242 C am größten war und diese Hemmeigenschaften deutlich mit dem Gehalt an OPCs korrelierten, nicht jedoch mit dem an Flavonoiden [19]. Anhand dieser Ergebnisse läßt sich jedoch nicht sagen, ob die Steigerung der Inotropie mit der Verminderung von Reperfusionarrhythmien verknüpft ist. Wenn dem jedoch so wäre, so müßte die durch Crs-Blr 80242 C hervorgerufene positiv inotrope Wirkung analog zur Hemmung der Lipidperoxidation und der HNE am stärksten sein. Selbst wenn also die Reduktion von Reperfusionarrhythmien und die positive Inotropie gleichermaßen durch OPCs vermittelt werden, so enthält WS 1442 jedoch weitere Substanzen, die zwar eine Steigerung der Kontraktionskraft bewirken, aber kein antiarrhythmisches Potential besitzen.

Crs-Blr 80242 C wäre also eine therapeutisch geeignete Substanz, da sie neben der Verbesserung der Auswurfleistung des Herzens weitere kardioprotektive Eigenschaften besitzt.

IV.5 Zusammenfassende Beurteilung

Nachdem gezeigt werden konnte, daß Crataegus-Spezialextrakt WS 1442 sowohl an isolierten humanen rechtsatrialen wie auch linksventrikulären Myozyten deutlich positiv inotrop wirkt, stellt sich die Frage nach der Wirkungsweise von WS 1442 auf zellulärer Ebene. Um den Wirkmechanismus determinieren zu können, ist es hilfreich, einzelne pharmakologische Wirkprinzipien der Inotropiesteigerung genauer zu betrachten, um dann Rückschlüsse auf den Mechanismus von WS 1442 ziehen zu können.

1) cAMP-vermittelte positive Inotropie.

Der intrazellulär erhöhte Gehalt von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) aktiviert unter anderem die Proteinkinase A (PKA), die ihrerseits wiederum sarkolemmale und intrazelluläre Proteinen durch Phosphorylierung modifiziert. Dazu zählen unter anderem der L-Typ- Ca^{2+} -Kanal und Phospholamban. Während sich durch die Phosphorylierung des L-Typ- Ca^{2+} -Kanal dessen Offenwahrscheinlichkeit während der Depolarisation erhöht und so der Calciumeinstrom in die Zelle während der Erregung vermehrt ist, reguliert Phospholamban die Ca^{2+} -Pumpe des SR (SERCA). Phosphoryliertes Phospholamban führt zu einer gesteigerten Aktivität der SERCA und es erfolgt eine schnellere Eliminierung von Ca^{2+} aus dem Zytosol. Ein Anstieg von cAMP in der Herzmuskelzelle führt somit zu einer beschleunigten Kontraktion durch vermehrten Ca^{2+} -Einstrom während der Depolarisation und zu einer beschleunigten Relaxation [76]. In unserem Versuchsaufbau bedeutet dies eine Zunahme von SMD und SMU bei Abnahme der TTP und der $\text{RT}_{50\%}$.

Der cAMP-Gehalt kann auf zwei Wegen erhöht werden, entweder durch vermehrte Bildung oder durch verringerten Abbau. Zu einer gesteigerten Bildung von cAMP kommt es u. a., wenn die Adenylatcyclase durch eine β -adrenerge Stimulation zu einer vermehrten Produktion von cAMP aus ATP (Adenosintriphosphat) angeregt wird. Der Abbau von cAMP geschieht durch die Phosphodiesterasen. Eine Hemmung dieser Enzyme führt ebenfalls zu einer intrazellulär erhöhten cAMP-Konzentration.

2) Sensitivierung der Myofilamente gegenüber Calciumionen.

Eine andere, erst seit kurzem bekannte Methode ist die Erhöhung der Empfindlichkeit des kontraktiven Apparates gegenüber Ca^{2+} . Das heißt, bei gleicher Ca^{2+} -Konzentration werden mehr kontraktile Elemente aktiviert. Der Wirkmechanismus der sogenannten Calcium-Sensitizer ist noch unklar, aber es wird von einer direkten Interaktion der Substanzen mit den Myofilamenten ausgegangen [80], eine Alkalisierung des Zellinneren führt allerdings ebenfalls zu einer Sensitivierung der Filamente gegenüber Ca^{2+} [4]. In den von Neumann et al. durchgeführten Versuchen resultierten Calcium-Sensitizer in einer signifikanten Verlängerung von TTP und $\text{RT}_{50\%}$ [74].

3) Erhöhung des intrazellulären Calciumgehaltes durch Hemmung der Natrium-Kalium-ATPase.

Das Ausmaß der Kontraktion hängt maßgeblich von dem systolischen Calciumgehalt der Zelle ab, und von daher ist es wichtig, das Calcium in der Diastole aus dem Zytosol zu entfernen. Während der größere Teil durch die SERCA in das SR gepumpt wird, gelangt der andere Teil wieder in den Extrazellulärraum. Der Natrium-Calcium-Austauscher (NCX), bei dem es sich um einen Antiporter von Natrium und Calcium handelt, spielt eine große Rolle. Voraussetzung für einen auswärtsgerichteten Transport von Calciumionen ist jedoch ein ausreichend großer Natriumgradient von extra- nach intrazellulär. Dieser wichtige Gradient wird durch die Natrium-Kalium-ATPase aufrecht erhalten. Wird die Natrium-Kalium-ATPase durch Digitalis-Glykoside, zum Beispiel Ouabain, in ihrer Funktion gehemmt, steigt die Natriumkonzentration im Zellinneren an und der Gradient reicht nicht mehr aus, Calciumionen nach außen zu transportieren [95]. Hasenfuss et al. konnten zeigen, daß Ouabain am Myokardstreifenpräparat bei verkürzter TTP zu einer signifikanten Zunahme der Kontraktionsgeschwindigkeit führt, während die $\text{RT}_{50\%}$ hingegen nur geringgradig beeinflusst wurde [44].

Diese Möglichkeiten, die auch prinzipiell für WS 1442 zu diskutieren sind, werden in der Abbildung 21 vereinfacht zusammengefaßt.

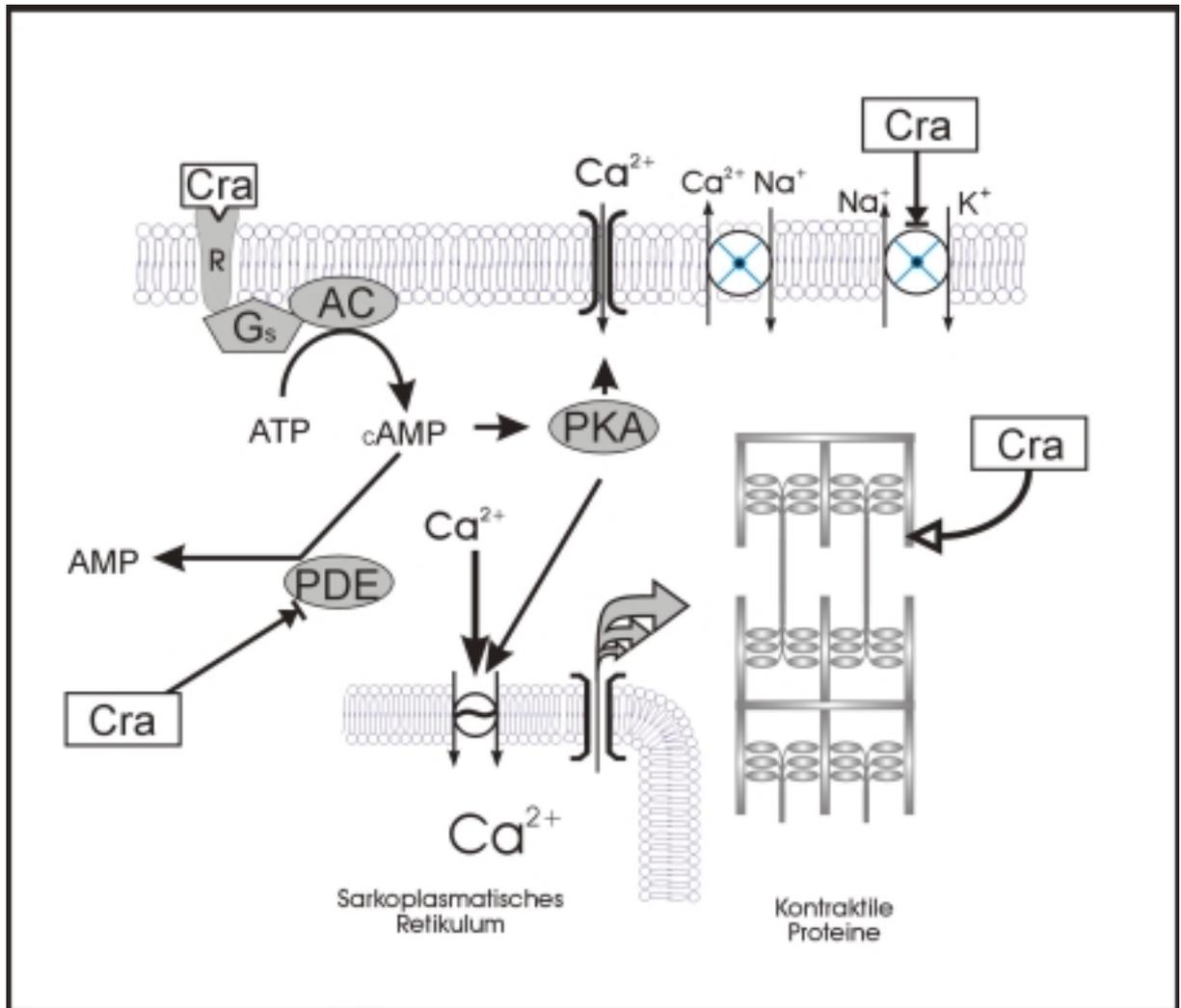


Abbildung 21: Mögliche Angriffspunkte von Crataegus-Spezialextrakt WS 1442 (Cra) an Kardiomyozyten.

Aufgrund der in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse liegen keine Anhaltspunkte für eine durch cAMP vermittelte Wirkungsweise von WS 1442 vor, auch wenn breites andere Autoren [81] [93] eine partielle β -sympathomimetische Aktion diskutierten. Wie Hasenfuss et al. zeigen konnten, steigt die SMU bei verkürzter $RT_{50\%}$ am ventrikulären Myokardstreifenpräparat unter Einfluß von Isoprenalin, bei Anwesenheit von WS 1442 zeigt sich aber kein positiv lusitroper Effekt. Weiterhin spricht die Tatsache, daß die inotrope Antwort, die durch WS 1442 ausgelöst wird, an terminal-insuffizientem und nicht terminal-insuffizientem Myokard gleich stark ist gegen einen durch β -adrenerge Stimulation ausgelösten positiven inotropen Effekt. Ginsburg et al. [36] konnten einen gegenüber dem gesunden Myokard signifikant abgeschwächten β -adrenergen Effekt an terminal-insuffizientem Myokard feststellen.

Darüber hinaus stellten Holubarsch et al. einen signifikant erhöhten Energieverbrauch des Myokards bei einer durch β -Rezeptoren gesteigerten Inotropie fest [51], für Crataegus-Extrakte konnte jedoch ein ökonomisierender Effekt auf die Myozyte beobachtet werden [81].

Allein durch diese Befunde kann der Schluß gezogen werden, daß WS 1442 die kardialen β -Rezeptoren nicht stimuliert. Darüber hinaus konnten Brixius et al. eine Aktivierung der Adenylatzyklase direkt ausschließen [13].

Obgleich Schüssler et al. in mehreren Arbeiten eine Hemmung der kardialen PDE durch Flavonoide diskutierten [91], [92], scheidet auch diese Möglichkeit nahezu aus: Erhöhung des cAMP-Gehaltes führt im Gegensatz zu WS 1442 zu einer Verkürzung des Kontraktionsablaufs bei drastischer Erhöhung des Energieverbrauchs. Weiterhin geht man davon aus, daß es neben einer Herunterregulierung von β -Adrenozeptoren zu einer insgesamt defizienten Produktion von cAMP in der Herzmuskelzelle kommt [32]. Dies bedeutet eine verminderte inotrope Antwort bei Erhöhung des cAMP-Gehaltes in terminal-insuffizientem Myokard gegenüber dem gesunden und widerspricht dem Befund der gleich großen Inotropiezunahme an terminal-insuffizientem und nicht terminal-insuffizientem Myokard durch WS 1442. Es gilt jedoch zu berücksichtigen, daß WS 1442 weitere kardioprotektive Eigenschaften wie die Steigerung des koronaren Blutflusses und die Reduktion von Reperfusionsarrhythmien aufweist. Während letzteres wiederum gegen eine

Beteiligung von cAMP spricht, so kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, daß eine Erhöhung von cAMP in den Leiomyozyten der Koronargefäße durch WS 1442 eine Rolle spielen könnte, da cAMP eine Relaxation von glatten Muskelzellen bedingt [94].

Es stellt sich also weiterhin die Frage nach dem zugrundeliegenden Wirkmechanismus von WS 1442.

DuToit et al. prüften das Auftreten von Reperfusionsarrhythmien bei gleichzeitiger Verabreichung des Calcium-Sensitizer Levosimendan, der allerdings auch PDE-inhibitorische Qualitäten aufweist: Mit Levosimendan behandelte Herzen zeigten post reperfusionem weder ventrikuläre Tachykardien noch Fibrillationen genau wie WS 1442 [25]. Bowman et al. konnten unter der Gabe von Levosimendan sowohl eine Zunahme der Inotropie durch Calciumsensitivierung des Myokards als auch eine Relaxation der glatten Muskelzellen der Koronarien, eventuell durch Calciumdesensitivierung, beobachten. Erhöhung von cAMP in der glatten Myozyte induziert im Gegensatz zu der kardialen Myozyte eine Relaxation durch Calciumauswärtstransport. In der Arbeit von Bowman konnte jedoch eindrücklich gezeigt werden, daß die Relaxation in Gegenwart von Levosimendan ohne nennenswerte Änderungen des intrazellulären Calciumgehaltes erfolgte [10].

Auch wenn die Verringerung von Reperfusionsarrhythmien und die Steigerung des koronaren Blutflusses durch Levosimendan den Wirkungen von WS 1442 sehr ähnlich sind, so ist es dennoch unwahrscheinlich, daß ein calciumsensitivierender Effekt von WS 1442 im Rahmen der Inotropiesteigerung eine bedeutende Rolle spielt.

Wie Neumann et al. berichten [74], steigert Calciumsensitivierung an humanen Myokardstreifenpräparaten die TTP auf $175 \pm 4\%$, die $RT_{50\%}$ auf das doppelte ($205 \pm 15\%$) der Ausgangswerte. TTP und $RT_{50\%}$ verändern sich unter dem Einfluß von WS 1442 am Ventrikel nur geringfügig.

Brixius et al. konnten neben der Tatsache, daß WS 1442 die Adenylatzyklase nicht aktiviert, eine Verdrängung von ^3H -Oubain aus der Digitaloidbindungsstelle feststellen [13]. Es wird bislang davon ausgegangen, daß die Hemmung der Natrium-Kalium-ATPase ein wesentlicher Bestandteil der durch WS 1442

verursachten Inotropiezunahme ausmacht. Schmidt et al. [88] konnten darüber hinaus demonstrieren, daß keine Adaptation gegenüber Digitalis-Glykosiden am terminal-insuffizientem im Vergleich zu nicht insuffizientem Myokard besteht. Dieser Befund ist also konform mit der Tatsache, daß die inotrope Antwort an terminal-insuffizientem und nicht terminal-insuffizientem Myokard gleich ist.

Außerdem spricht der zeitlich Ablauf der Kontraktion dafür, daß WS 1442 ähnlich wie die Digitalis-Glykoside über eine Hemmung der Natrium-Kalium-ATPase wirken könnte. Allerdings widersprechen sich hier die Angaben in der Literatur ein wenig: Während Hasenfuss et al. berichten, daß sich unter der Anwendung von Ouabain die SMD erhöht, SMU und $RT_{50\%}$ sich nur geringfügig verändern und die TTP abnimmt [44], so stellten Tatsukawa et al. keine Veränderung der TTP feststellen [100]. Diese Differenz könnte allerdings darauf beruhen, daß sich Hasenfuss et al. ventrikulärer humaner Myokardstreifen bedienen, Tatsukawa et al. verwenden dagegen isolierte ventrikuläre Rattenzellen. Übereinstimmend mit dem Kontraktionsverhalten, das durch WS 1442 hervorgerufen wird, ist jedoch die Inotropiesteigerung bei nicht signifikanten Veränderungen von SMU und $RT_{50\%}$. Tabelle 10 faßt diese Ergebnisse zusammen.

	Oubain (Hasenfuss) 10^{-7} - 10^{-6} M	Oubain (Tatsukawa) 10^{-7} - 10^{-5} M	WS 1442 10^{-7} [g/ml]
SMD	↑	k. A.	↑
TTP	↓	~	~
SMU	~	k. A.	~
$RT_{50\%}$	~	~	~

Tabelle 10: Vergleichende Zusammenfassung der zeitlichen Veränderung des Kontraktionsablaufs, hervorgerufen durch Ouabain und WS 1442. ↑ = signifikante Zunahme; ~ = konstant bis geringfügige Veränderung; ↓ = signifikante Abnahme. k. A. = keine Angabe.

Die Hypothese, WS 1442 wirke an isolierten Kardiomyozyten wie Digitalis über eine Hemmung der Natrium-Kalium-ATPase wirft jedoch viele Fragen auf:

- Warum bewirkt WS 1442 eine Steigerung des koronaren Blutflusses, Digitalis aber eine Vasokonstriktion isolierter Blutgefäße [99]?
- Wie ist die antiarrhythmische Wirkung von WS 1442 auf das Myokard nach einer Ischämie zu verstehen, obwohl Digitalis durch Erhöhung des intrazellulären Calciumgehaltes auf zellulärer Ebene proarrhythmogen wirkt [95] ?

Wie bereits diskutiert, liegen in Crataegus Substanzen vor, die durch Hemmung der Proteolyse und der Radikalbildung während der Ischämiezeit der Entstehung von Reperfusionarrhythmien entgegenwirken. Möglicherweise sind diese Effekte so stark ausgeprägt, daß sie den proarrhythmogenen Einfluß von Digitalis-Glykosiden überspielen. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit ist, daß, da es sich bei Crataegus-Spezialextrakt WS 1442 um ein bisher nicht genauer untersuchtes Stoffgemisch handelt, unabhängig voneinander wirkende einzelne Substanzen mit vasodilatatorischem, antiarrhythmischen und antiischämischen Potential vorliegen.

Zusammenfassend soll festgehalten werden, daß WS 1442 mit großer Sicherheit über eine Hemmung der Natrium-Kalium-ATPase positiv inotrop wirkt. cAMP-vermittelte Effekte können in dieser Arbeit ausgeschlossen werden.

Das heißt aber nicht, daß die Hemmung der Natrium-Kalium-ATPase an der Herzmuskelzelle der einzige Wirkmechanismus ist, es können weitere, bislang auch unbekannte Angriffspunkte von WS 1442 vorliegen.

IV.6 Klinische Bedeutung

Die Bedeutung von WS 1442 im klinischen Alltag ist nicht zu unterschätzen: Als positiv inotrop wirkende Substanz vermag WS 1442 die Symptomatik sowohl anhand objektiver Parameter, wie zum Beispiel der Belastungstoleranz und der Ejektionsfraktion, als auch die subjektive Empfindung über den Zustand des Patienten zu verbessern [28],[61],[105],[104].

Hierbei drängt sich die Frage nach der Mortalität auf, denn wenn WS 1442 über die Digitaloidbindungsstelle wirkt, dann sind auch scheinbar ähnliche Wirkungen auf den Krankheitsverlauf und die Mortalität, wie sie bei dem Einsatz von Digitalis-Glykosiden auftreten, zu erwarten. Konkret bedeutet dies eine Verringerung der Hospitalisierungsfrequenz bei gleicher Mortalität. Dabei ist es wichtig zu berücksichtigen, daß Digitalis scheinbar einen fördernden Effekt auf die Genese von Arrhythmien hat [102]. Da Crataegus-Extrakte erwiesenermaßen aber auch Substanzen enthalten, die antiarrhythmische, antiischämische, antioxidative sowie vasodilatierende Effekte aufweisen [58],[93], ist davon auszugehen, daß WS 1442 die Morbidität und Mortalität ausgesprochen günstig beeinflussen wird.

IV.7 Ausblick

Es ist sehr schwierig, pflanzliche Arzneistoffe zu beurteilen, da es sich nicht um isolierte, in Reinform vorliegende bekannte chemischen Verbindungen, sondern vielmehr um ein komplexes Stoffgemisch handelt. Es erscheint durchaus möglich, daß Crataegus-Extrakte über verschiedene Mechanismen und auch auf unterschiedliche Organgebiete in differenzierter Weise wirken, was die Interpretation erschwert. Möglicherweise liegt der positiv inotropen Wirkung auch ein bislang unbekannter Mechanismus zugrunde.

Es gilt nun, bei der Untersuchung von WS 1442 zweigleisig zu fahren: Einerseits müssen die Wirkmechanismen durch Laboratoriumsarbeiten genauer erfaßt werden. Eine elegante Methode stellt hierbei die Messung des intrazellulären Calciumgehaltes mittels Fura2-AM, einem calciumsensitiven Farbstoff, dar.

Andererseits muß die klinische Wirksamkeit von WS 1442 bewiesen werden. Bereits in Studien mit geringeren Fallzahlen [28], [61], [105] zeigten sich sowohl subjektive wie auch objektive Verbesserungen des Zustandes der Patienten. Um tatsächlich positive Effekte auf die Lebensqualität, objektive Verbesserung des Krankheitszustandes und auch eine verminderte Mortalität durch WS 1442 feststellen zu können, wurde bereits mit der SPICE-Studie (Survival and Prognosis: Investigation of Crataegus Extract WS 1442 in congestive heart failure) begonnen. Dabei handelt es sich um eine multizentrische, randomisierte, placebokontrollierte Doppelblindstudie, die Aufschluß über die Mortalität unter der Anwendung von WS 1442 bringen soll und voraussichtlich im Jahre 2002 endet.

Es bleibt zu hoffen, daß die bislang für WS 1442 sprechenden experimentellen Ergebnisse in der Praxis bestätigt werden können und damit ein neues, effektives Mittel zur Behandlung der chronischen Herzinsuffizienz zur Verfügung steht.

V Zusammenfassung

Neben der kausalen Therapie der chronischen Herzinsuffizienz, die der neurohumoralen Überstimulation entgegenwirken soll, ist es wichtig, die bereits eingeschränkte Pumpleistung des Herzens durch die Gabe von positiv inotropen Substanzen zu verbessern.

Dabei sind die von Withering erstmals im 18. Jahrhundert eingesetzten Digitalis-Glykoside nach wie vor von erheblicher Bedeutung. Allerdings zeigen neuere Ergebnisse, daß sie neben den akuten Nebenwirkungen wie zum Beispiel ventrikulären Fibrillationen auch in der Langzeittherapie nicht unbedenklich sind. Mit einer deutlich schlechteren Prognose ist der Einsatz von Medikamenten, die den intrazellulären Gehalt von cAMP erhöhen, behaftet. Dies gilt für β -Rezeptoragonisten und Phosphodiesterasehemmstoffe. Die Suche nach einem positiv inotrop wirkenden, langfristig einsetzbaren Wirkstoff ist also noch nicht abgeschlossen.

Einen neueren Aspekt könnte der Weißdorn-Extrakt WS 1442 liefern, der bislang in die Therapie der milden bis moderaten Herzinsuffizienz (NYHA I-II) Eingang gefunden hat. Wie der Extrakt allerdings auf isolierte Kardiomyozyten wirkt, ist bislang noch ungenügend geklärt. Die vorliegende Arbeit untersucht deswegen den Einfluß von WS 1442 und der Fraktionen A, B und C auf die Kontraktilität isolierter Kardiomyozyten aus Vorhofgewebe sowie aus gesundem und terminal-insuffizientem linksventrikulärem Myokard. Der Gesamtextrakt WS 1442 zeigte an rechtsatrialen Myozyten die stärkste Wirkung, Fraktion B zeigte keine Wirkung. Fraktion A und C wiesen eine ähnlich starke Inotropiezunahme auf. Flavonoide scheinen keine Voraussetzung für die positiv inotrope Wirkung von WS 1442 zu sein, könnten diese aber beeinflussen. WS 1442 steigert die Kontraktilität an Myozyten aus gesundem wie terminal-insuffizientem Myokard im gleichen Umfang. WS 1442 scheint nicht über eine Erhöhung des cAMP-Gehaltes zu agieren, denn dies würde eine Verkürzung der Kontraktions- und Relaxationszeit hervorrufen, was bei WS 1442 aber nicht der Fall ist. Die Hypothese, WS 1442 wirke an ventrikulären Myozyten über eine Hemmung der Natrium-Kalium-ATPase steht in Einklang mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen und mit der Tatsache, das WS 1442 die Kontraktionszeit verkürzt, die halbmaximale Relaxationszeit aber nur minimal beeinflusst. Im Gegensatz zu den Digitalis-Glykosiden erhöht WS 1442 den koronaren Blutfluß und verhindert Reperfusionsarrhythmien.

Die Eigenschaften von WS 1442 als Inodilator mit weiteren kardioprotektiven Effekten machen WS 1442 zu einer interessanten therapeutischen Alternative. Dies bedarf jedoch genauer Prüfung in großangelegten klinischen Studien.

VI **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: Fraktionierungsschema von WS 1442

Abbildung 2: Anlage zur Messung des Kontraktionsablaufs isolierter Kardiomyozyten

Abbildung 3: Küvettensystem mit Organbad

Abbildung 4: Zelleinstellung

Abbildung 5: Detektion der Zellenden

Abbildung 6: Originalregistrierungen aus einem Versuch mit WS 1442 an Myozyten aus terminal-insuffizientem linksventrikulärem Myokard

Abbildung 7: Konzentrations-Wirkungs-Analyse mit WS 1442 an linksventrikulären Zellen aus terminal-insuffizientem Myokard

Abbildung 8: Vergleich der Wirkungen von WS 1442 an linksventrikulären Myozyten aus terminal-insuffizientem Myokard und aus nicht terminal-insuffizientem Myokard

Abbildung 9: Originalregistrierungen aus einem Versuch mit WS 1442 an isolierten rechtsatrialen Myozyten

Abbildung 10: Konzentrations-Wirkungs-Analyse mit WS 1442 an isolierten rechtsatrialen Zellen

Abbildung 11: Originalregistrierungen aus einem Versuch mit Crs-Blr 80242 A an isolierten rechtsatrialen Myozyten

Abbildung 12: Steigerung der relativen Verkürzung rechtsatrialer Myozyten durch Crs-Blr 80242 A

- Abbildung 13: Originalregistrierungen aus einem Versuch mit Crs-Blr 80242 B an isolierten rechtsatrialen Myozyten
- Abbildung 14: Änderung der relativen Verkürzung rechtsatrialer Myozyten durch Crs-Blr 80242 B
- Abbildung 15: Originalregistrierungen aus einem Versuch mit Crs-Blr 80242 C an isolierten rechtsatrialen Myozyten
- Abbildung 16: Steigerung der relativen Verkürzung rechtsatrialer Myozyten durch Crs-Blr 80242 C
- Abbildung 17: Originalregistrierungen aus Versuchen mit Isoprenalin (10^{-7} M) und Ca^{2+} (15 mM) an isolierten linksventrikulären Myozyten aus terminal-insuffizientem Myokard
- Abbildung 18: Vergleich der Wirkungen von WS 1442 an linksventrikulären Myozyten aus terminal-insuffizientem Myokard und rechtsatrialen Zellen
- Abbildung 19: Fraktionierungsschema von WS 1442
- Abbildung 20: Vergleich der Wirkungen von WS 1442 und den Subextrakten Crs-Blr 80242 A, B und C an rechtsatrialen Myozyten
- Abbildung 21: Potentielle Wirkmechanismen von WS 1442 an isolierten Myozyten

VII Tabellenverzeichnis

- Tabelle 1 Zusammensetzung des Crataegus-Gesamtextraktes WS 1442 und der gewonnenen Subextrakte Crs-Blr 80242 A, B und C hinsichtlich des Gehalts an oligomeren Procyanidinen und Flavonoiden
- Tabelle 2: Daten von Patienten, aus deren terminal-insuffizienten linken Ventrikeln Myozyten für die Untersuchungen mit WS 1442 isoliert wurden
- Tabelle 3: Daten von Patienten, aus deren Vorhöfen Myozyten für Untersuchungen mit WS 1442 oder den Subextrakten Crs-Blr 80242 A, B oder C isoliert wurden
- Tabelle 4: Änderung der Kontraktilitätsparameter im Rahmen der Konzentrations-Wirkungs-Analyse mit WS 1442 an linksventrikulären Myozyten aus terminal-insuffizientem Myokard (n=7)
- Tabelle 5: Änderungen der Kontraktilitätsparameter unter Anwendung von WS 1442 an linksventrikulären Myozyten aus nicht terminal-insuffizientem Myokard (n=3)
- Tabelle 6: Änderung der Kontraktilitätsparameter im Rahmen der Konzentrations-Wirkungs-Analyse mit WS 1442 an isolierten rechtsatrialen Myozyten (n=7)
- Tabelle 7: Änderung der Kontraktilitätsparameter von rechtsatrialen Myozyten unter Anwendung von Crs-Blr 80242 A (10^{-8} [g/ml]; n=7)

-
- Tabelle 8: Änderung der Kontraktilitätsparameter von rechtsatrialen Myozyten unter Anwendung von Crs-Blr 80242 B (10^{-8} [g/ml]; n=8)
- Tabelle 9: Änderung der Kontraktilitätsparameter von rechtsatrialen Myozyten unter Anwendung von Crs-Blr 80242 C (10^{-8} [g/ml]; n=7)
- Tabelle 10: Vergleichende Zusammenfassung der zeitlichen Veränderungen des Kontraktionsablaufs, hervorgerufen durch Ouabain und WS 1442

VIII Literaturverzeichnis

1. **Ajioka M, Nagai S, Ogawa K, Satake T, Sugiyama S, Ozawa T** (1986): The role of phospholipase in the genesis of reperfusion arrhythmia. *J Electrocardiol* **19**(2): p. 165-172.
2. **Allen D G, Kentish J C** (1985): The cellular basis of the length tension relation in cardiac muscle. *J Mol Cell Cardiol* **17**: p. 821-840.
3. **Allen D G, Kurihara S** (1982): The effects of muscle length on intracellular calcium transients in mammalian cardiac muscle. *Eur Heart J* **1**(A): p. 5-15.
4. **Allen D, Orchard C** (1983): The effects of changes of pH on intracellular calcium transients in mammalian myocardium. *J Physiol* **335**: p. 555-567.
5. **Altschuld R, Gibb R, Ansel A, Hohl C, King F, Brierly G** (1980): Calcium tolerance of heart cells. *J Mol Cell Cardiol* **12**: p. 1383-1395.
6. **Anonym** (1996): Rationale, design, implementation and baseline characteristics of patients in the DIG-trial: A large, simple, long-term trial to evaluate the effect of digitalis on mortality in heart failure. *Contolled Clinical Trials* **17**(1), p. 77-97.
7. **Anonym** (1998): 3-year follow-up of patients randomized in the metoprolol in dilated cardiomyopathy trial. The Metoprolol in Dilated Cardiomyopathy (MDC) Study trial group *Lancet* **351**: p. 1180-1181.
8. **Baylis J, Norell M, Canepa-Anson R, Sutton G, Poole-Wilson P** (1987): Untreated heart failure: clinical and neuroendocrine effects of introducing diuretics. *Br Heart J* **22**: p. 409-413.

9. **Bertel O** (1993): Epidemiologic aspects of heart failure: Incidence, causes and follow-up. *Ther Umsch* **50**(6): p. 388-442.
10. **Bowman P, Haikala H, Paul R J** (1999): Levosimendan, a calcium sensitizer in cardiac muscle, induces relaxation in coronary smooth muscle through calcium desensitization. *J Pharmacol Exp Ther* **288**(1): p. 316-325.
11. **Bristow M R** (1984): The adrenergic nerve system in heart failure. *New Eng J Med*. **311**: p. 810-811.
12. **Bristow M R, Ginsburg R, Minobe W, Cubicciotti R S, Sageman W S, Lurie K, Billingham M E, Harrison D C, Stinson E B** (1982): Decreased catecholamine sensitivity and b-adrenergic-receptor density in failing human heart. *New Eng J Med* **307**: p. 205-211.
13. **Brixius K, Frank K, Müller-Ehmsen J, Schwinger R H G** (1998): WS 1442 (Crataegus-Spezialextrakt) wirkt am insuffizienten menschlichen Myokard kontraktionskraftsteigernd. *Herz/Kreislauf* **30**: p. 28-33.
14. **Brodde O** (1991): Beta 1 and beta 2 adrenoceptors in the human heart: properties, function and alteration in chronic heart failure. *Pharmacol rev* **43**: p. 203-242.
15. **Brooksby P, Cowley A J, Segal R, Robison P J, Klinger G H, Pitt B** (1998): Effects of Losartan and Captopril on QT-dispersion in elderly patients with heart failure in the ELITE-Study: an initial assessment. *Eur Heart J* **19**: p. 150.
16. **Brutsaert D, Franssen P, Andries L, DeKeulenaer G, Sys S** (1998): Cardiac endothelium and myocardial function. *Cardiovasc Res* **38**(2): p. 281-290.

17. **Bustamente O, Watanabe T, Murphy D, McDonald T** (1982): Isolation of single atrial and ventricular cells from the human heart. *CMA J* **126**: p. 791-793.
18. **Bustamente O, Watanabe T, McDonald T** (1982): Nonspecific Protease: a new approach to isolation of adult cardiocytes. *Can J Physiol Pahrmacol* **60**: p. 997-1002.
19. **Chatterjee S S, Koch E Jaggy H und Krzeminski T** (1997): In-vitro- und in-vivo-Untersuchungen zur kardioprotektiven Wirkung von oligomeren Procyanidinen in einem Crataegus-Extrakt aus Blättern mit Blüten. *Arzneim.-Forsch/Drug Research* **47(2)**: p. 821-825.
20. **Cheng W, Li B, Kajstura J, Li P, Wolin M S, Sonnenblick E H, Hintze T H, Olivetti G, Anversa P** (1995): Srtetch-iduced programmed myocyte cell death. *J Clin Invest* **96**: p. 2247-2259.
21. **Cohn J N, Arcibald D G, Ziesche S et al** (1986): Effect of vasodilator therapy on mortality in chronic congestive heart failure. *New Eng J Med* **314(24)**: p. 1547-1552.
22. **Cohn J N, Johnson G, Ziesche S, Cobb F et al.** (1991): A comparison of Elanapril with Hydralazine-Isorbide Dinitrate in the treatment of chronic congestive heart failure. *New Eng J Med* **325**: p. 303-310.
23. **Dhalla N, Wang S, Beamish R** (1996): Intracellular calcium-handling in normal and failing hearts. *Exp Clin Cardiol* **1**: p. 7-20.
24. **Dow J, Harding N, Powell T** (1982): Isolated myocytes. First preparations of adult myocytes and their homology in the intact tissue. *Cradiovasc Res* **60**: p. 997-1002.

25. **DuToit E F, Muller C A, McCarthy J, Opie L H**, (1999): Levosimendan: Effects of a calcium sensitizer on function and arrhythmias and cyclic nucleotide levels during ischemia/reperfusion in the Langendorff-perfused guinea pig heart. *J Pharmacol Exp Ther* **290**(2): p. 505-514.
26. **Dzau V J, Colucci W S, Hollenberg N K, Williams G H** (1981): Relation of the renin-angiotensin-aldosterone system to clinical state of congestive heart failure. *Circulation* **63**: p. 645-651.
27. **Dzau V J, Packer M, Lilly L S, Swartz S L, Hollenberg N K, Williams G H** (1984): Prostaglandins in severe congestive heart failure: relation to activation of the renin-angiotensin system and hyponatremia. *N Engl J Med* **310**: p. 347-352.
28. **Eichstädt H, Bäder M, Danne O, Kaiser W, Stein U, Felix R** (1989): Crataegus-Extrakt hilft dem Patienten mit NYHA II-Herzinsuffizienz. *Therapiewoche* **39**: p. 3288-3296.
29. **Engemeier R, S O'Connell J B, Walsh R et al.** (1985): Improvement in symptoms and exercise tolerance by metoprolol in patients with dilated cardiomyopathy: a doubleblind, randomized, placebo-controlled trial. *Circulation* **72**: p. 56-542.
30. **Fabiato A** (1980): Sarcomere length dependence of calcium release from the sarcoplasmic reticulum of skinned cardiac cells demonstrated by differential microspectrophotometry with Arsenazo III *J Gen Physiol* **76**: p. 15a.
31. **Fabiato A** (1983): Calcium-induced release of Calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. *Am J Physiol* **245**: p. C1-C14.

32. **Feldman M D, Copelas L, Gwathmey J K, Phillips P, Warren S E, Schoen F J, Grossmann W, Morgan J P** (1987): Deficient production of cyclic AMP: pharmacologic evidence of an important cause of contractile dysfunction in patients with end-stage heart failure. *Circulation* **75**(2): p. 331-339.

33. **Frank O** (1895): Die Dynamik des Herzmuskels *J Biol* **32**: p. 370-447.

34. **Fujita S, Endoh M** (1996): Effects of endothelin-1 on calcium-shortening trajectory and calcium sensitivity in rabbit single ventricular cardiomyocytes loaded with indo-1/AM: comparison with the effects of phenylephrine and angiotensin II. *J Card Fail* **2**(suppl. 4): p. 45-57.

35. **Gillman M W, Kannel W B, Delanger A, D'Agostino R B** (1993): Influence of heart rate mortality among persons with hypertension: The Framingham Study. *Am Heart J* **125**: p. 1148-1154.

36. **Ginsburg R, Bristow M R, Billingham M E, Stinson E B, Schroeder J S, Harrison D C** (1983): Study of the normal and failing isolated human heart: decreased response of failing heart to isoproterenol. *Am Heart J* **106**(3): p. 535-540.

37. **Goodwin J F, Oakley C M** (1972): The Cardiomyopathies. *Br Heart J* **34**: p. 545-552.

38. **Gottlieb S S, McCarter R J, Vogel R A** (1998): Effect of Betablockade on mortality among high-risk and low-risk patients after myocardial infarction. *New Eng J Med* **339**(8): p. 551-553.

39. **Graefe E U, Derendorf H, Veit M** (1999): Pharmacokinetics and bioavailability of the flavonol Quercetin in humans. *Intern J Clin Pharm Ther* **37**(5): p. 219-233.

40. **Gugler R, Leschik M, Dengler H J** (1975): Disposition of Quercetin in man after single oral and intravenous doses. *Eur J Clin Pharmacol* **9**(2-3): p. 229-234.
41. **Harding S, Brown L, del Monte F, Davies C, O´Gara P, Vescovo G, Wynnw D, Poole-Wilson P** (1996): Acceleration of contraction by beta-adrenoceptor stimulation is greater in ventricular myocytes from failing than non-failing human hearts. *Bas Res Cardiol* **2**: p. 53-56.
42. **Harding S, Jones S, O´Gara P, Vescovo G, Poole-Wilson P** (1990): Reduced beta-agonist sensitivity in single atrial cells from failing human hearts. *Am J Physiol* **259**: p. H1009-H1014.
43. **Hasenfuss G, Mulieri LA, Blanchard EM, Holubarsch Ch, Leavitt B, Ittleman F, Alpert NR** (1991): Energetics of force development in control and volume overload human myocardium. Comparison with animal species. *Circ Res* **68**: p. 836-846.
44. **Hasenfuss G, Mulieri L A, Allen P D, Just H, Alpert N R** (1996): Influence of Isoproterenol and Ouabain on excitation-contraction coupling, cross-bridge function, and energetics in failing human myocardium. *Circulation* **94**: p. 3155-3160.
45. **Hassapoyannes C A, Bergh M E, Mohaved M R, Easterling B M, Omoigui N A** (1998): Diastolic effects of chronic digitalization in systolic heart failure. *Am Heart J* **136**(4): p. 687-695.
46. **Hecker-Niedeck A E** (1983): Untersuchungen zur Biogenese, Markierung und Pharmakokinetik der Procyanidine aus Crataegus-Spezies. Dissertation Marburg .

47. **Heilbrunn S M, Shah P, Bristow M R** (1988): Increased Betareceptor density and improved hemodynamic response to catecholamine stimulation during long-term Metoprolol therapy in heart failure form dilated cardiomyopathy. *Circulation* **78**: p. 1373-1381.
48. **Hobbs R E** (1997): Digoxin's effect on mortality and hospitalisation in heart failure: implications of the DIG-Study. Digitalis Investigation Group Cleveland Clinic J Med **64**(5): p. 234-237.
49. **Holubarsch C** (1997): New inotropic concepts: rationale for and differences between calcium sensitizers and phosphodiesterase inhibitors. *Cardiology* **88**(Suppl 2): p. 12-20.
50. **Holubarsch C, Hasenfuss G, Schmidt-Schweda S, Knorr A, Pieske B, Ruf T, Fasol R, Just H** (1993): Angiotensin I and II exert inotropic effects in atrial but not in ventricular human myocardium: An in vitro study under physiological experimental conditons. *Circulation* **88**: p. 1228-1237.
51. **Holubarsch C, Hasenfuss G, Just H, Alpert N R** (1994): Positive inotropism and myocardial energetics: influence of betareceptor agonist stimulation, phosphodiesterase inhibition, and ouabain. *Cardiovasc Res* **28**: p. 994-1002.
52. **Isenberg G, Klockner K** (1982): Calcium tolerant ventricular myocytes prepared by incubation in a KB medium. *Pfluegers Arch* **395**: p. 6-18.
53. **Ito H Hiroe M, hirata Y, Fujisaka H, Adachi S, et al.** (1994): Endothlein ETA-receptor antagonist blocks cardiac hypertrophy provoked by hemodynamic overload. *Circulation* **89**: p. 2198-2203.
54. **Just H** (1992): The myocardium in heart failure: Cellular and subcellular alterations in failing human myocardium. *Bas Res Cardiol* **87**, Suppl 1: IX-XII

55. **Kentish J C** (1986): The effect of inorganic phosphate and creatine phosphate on force production in skinned muscles from rat ventricle. *J Physiol* **370**: p. 585-604.
56. **Kohl C, Schmitz W, Scholz H, Scholz W, Toth M, Döring V, Kalmar P** (1989): Evidence for alpha1-mediated increase of inositol triphosphate in the human heart. *J Cardiovasc Pharmacol* **13**: p. 324-327.
57. **Krämer B, Smith T, Kelly R** (1991): Endothelin and increased contractility in adult rat ventricular myocytes. Role of intracellular alkalosis induced by activation of the protein kinase c-dependent NHE. *Circ Res* **68**: p. 269-279.
58. **Krzeminski T, Chatterjee S S** (1993): Ischemia and early reperfusion induced arrhythmias: beneficial effects of an extract of *Crataegus oxyacantha* L. *Pharm Pharmacol Lett* **3**: p. 45-48.
59. **Lechat P, Escolano S, Golmard J L, Lardoux H, Witchiz S, Henneman J A, Maisch J A, Hetzel M, Jaillon P, Boissel J P, Mallet A** (1997): A prognostic value of bisoprolol-induced hemodynamic effects in heart failure during the cardiac insufficiency bisoprolol study. *Circulation* **96**(7): p. 2197-2205.
60. **Leri A, Claudio P P, Li Q, Wang X, Reiss K, Wang S, Malhotra A, Kajstura J, Anversa P.** (1998): Stretch-mediated release of angiotensin II induces myocyte apoptosis by activating p53 that enhances the local renin-angiotensin system and decreases the Bcl2-to-Bax-protein ratio in the cell. *J Clin Invest* **101**: p. 1326-1342.
61. **Leuchtgens H, Noh H S** (1993): *Crataegus*-Spezialextrakt WS 1442 bei Herzinsuffizienz NYHA II. *Fortschr. Med.* **111**: p. 352-354.

62. **Lindsay S J, Kearny M T, Prescott R J, Fox K A A, Nolan J, for the UK Heart Investigation** (1999): Digoxin and mortality in chronic heart failure. *The Lancet* **354**: p. 1003.
63. **Loew D** (1994): Crataegus-Spezialextrakte bei Herzinsuffizienz. *Der Kassenarzt* **15**: p. 43-52.
64. **Lowes B D, Minobe W, Abraham W T, Rizeq M N, Bohimeyer T J, Quaife R A, Rode R L, Robertson A D, Voelkl N F, Badesch D B, Groves B M, Gilbert E M, Bristow M R** (1997): Changes in gene expression in the intact human heart. Downregulation of α -myosin heavy chain in hypertrophied, failing ventricular myocardium. *J Clin Invest*. **100**: p. 2315-2324.
65. **Mann D L, Kent R L, Parsons B, Cooper G** (1992): Adrenergic effect on the biology of the adult mammalian cardiocyte. *Circulation* **85**: p. 790-804.
66. **Mason DT, Braunwald E** (1964): Studies on digitalis. X. Effects of Ouabain on forearm vascular resistance and venous tone in normal subjects and in patients in heart failure. *J Clin Invest* **43**: p. 532-543.
67. **Matsumori A, Igata H, Ono K, Iwasaki A, Miyamoto T, Nishio R, Sasayama** (1999): High dose of digitalis increase the myocardial production of cytokines and worsen myocardial injury in viral myocarditis: a possible mechanism of digitalis toxicity. *Jap Circ J* **63**(12): p. 934-940.
68. **McKee P A, Castelli W P, McNamara P M, Kannel W B** (1971): The natural history of congestive heart failure, The Framingham Study. *New Engl J Med* **285**: p. 1441-1446.

69. **Meyer M, Lehnhart S, Pieske B, Schlottauer K, Munk S, Holubarsch C, Just H, Hasenfuss G** (1995): Influence of endothelin 1 on human atrial myocardium - myocardial function and subcellular pathways. *Basic Res Cardiol* **91**: p. 86-93.
70. **Mitra R, Morad M** (1985): A uniform enzymatic method for dissociation of myocytes from hearts and stomach of vertebrates. *Am J Physiol* **245**: p. H1056-H1060.
71. **Möllmann H** (2001): Einfluss von Angiotensin II und Endothelin-1 auf die Kontraktilität isolierter Kardiomyozyten aus gesundem und terminal insuffizientem Myokard. Medizinische Dissertation Universität Freiburg .
72. **Mulieri LA, Hasenfuss G, Ittleman F, Blanchard EM, Alpert NR** (1989): Protection of human left myocardium from cutting injury with 2,3-butadione-monoxime. *Circ res* **65**: p. 1441-1444.
73. **Nakashima Y, Fouad F M, Tarazi R C** (1984): Regression of left ventricular hypertrophy from systemic hypertension by elanapril. *Am J Cardiol* **53**: p. 1044-1049.
74. **Neumann J, Eschenhagen T, Grupp I L, Haverich A, Herzig J W, Hirt S, Kalmar P, Schmitz W, Scholz H, Stein B, Wenzlaff H, Zimmerman N** (1996): Positive inotropic effects of the calcium sensitizer CGP 48506 in failing human myocardium. *J Pharmacol Exp Ther* **277**(3): p. 1579-1585.
75. **Noble D** (1980): Mechanism of action of therapeutic levels of cardiac glycosides. *Cardiovasc Res* **14**: p. 495.
76. **Opie L H**, Mechanisms of cardiac contraction and relaxation., in *Heart Disease*, Braunwald E, Editor. 1997, W. B. Saunders: Philadelphia. p. 360-393.

77. **Packer M** (1993): How should physicians view heart failure? - The philosophical and physiological evolution of three conceptual models of disease. *Am J Cardiol.* **71**: p. C3 - C11.
78. **Packer M** (1999): Neurohumoral interactions and adaptations in congestive heart failure. *Circulation* **77**: p. 721-731.
79. **Plotnick G D, Becker L C, Fisjer M L, Gerstenblith G, Renlund D G, Fleg J L, Weisenfeldt M L, Lakatta E G** (1986): Use of the Frank-Starling mechanism during submaximal versus maximal upright exercise. *Am J Physiol* **251**(H1): p. 1101-1105.
80. **Pollesello P, Ovaska M, Kaivola J, Tilgmann C, Lundstrom K, Kalkkinen N, Ulmanen I, Nissinen E, Taskinen, J** (1994): Binding of a new Ca⁺⁺-sensitizer, levosimendan, to recombinant human troponin C. A molecular modeling, fluorescence probe and proton nuclear magnetic resonance study. *J Biol Chem* **269**: p. 28584-28590.
81. **Pöpping S, Fischer Y, Kammermeier H** (1994): Crataegus-Wirkung auf Kontraktion und O₂-Verbrauch isolierter Herzzellen. *Münch Med Wschr.* **136**(Suppl 1): p. 39-46.
82. **Powell E, Sturridge M, Suvarna S, Terrar D, Twist, V** (1981): Intact individual heart cells isolated from human ventricular tissue. *Br Med J* **283**: p. 1013-1015.
83. **Ravingerova T, Slezak J, Tribulova N, Dzurba A, Uhrik B, Ziegelhoffer A**, (1999): Free oxygen radicals contribute to high incidence of reperfusion-induced arrhythmias in isolated rat heart. *Life Sci* **65**(18-19): p. 1927-1930.
84. **Reidl I A** (1985): The renin-angiotensin system and blood function. *Arch Intern Med* **145**: p. 1475.

85. **Riaz K, Forker A D** (1998): Digitoxin use in congestive heart failure. *Drugs* **55**(6): p. 747-758.
86. **Sadoshima J, Izumo S** (1993): Molecular characterization of angiotensin-II induced hypertrophy of cardiac myocytes and hyperplasia of cardiac fibroblasts *Circ Res* **73**: p. 413-423.
87. **Schaper J, Froede R, Hein S T, Buck A, Hashizume H, Speiser B, Friedel A, Bleese N** (1991): Impairment of the myocardial ultrastructure and changes of the cytoskeleton in dilated cardiomyopathy. *Circulation* **83**: p. 504-514.
88. **Schmidt T A, Allen P D, Colucci W S, Marsh J D, Kjeldsen K** (1992): No adaptation to digitalization as evaluated by digitalis-receptor (Na,K-ATPase) quantification in explanted hearts from donors without heart disease and from digitalis recipients with end-stage heart failure. *Am J Cardiol* **70**: p. 110-114.
89. **Schmitz W, Eschenhagen T, Mende U, Müller F U, Neumann J, Scholz H** (1992): Phosphodiesterase inhibition and positive inotropy in failing human myocardium. *Bas Res Cardiol*, **87** Suppl 1: p. 65-71.
90. **Scholz H, Eschenhagen T, Neumann J, Stein B**, Receptor-mediated regulation of cardiac contractility: Inotropic effect of alpha-adrenoceptor stimulation with phenylephrine and noradrenaline in failing human hearts. . *Molecular and cellular mechanisms of cardiovascular regulation*, ed. M.M. Endoh M, Scholz H, Ijima T. 1996, Tokyo: Springer-Verlag. 317-325.
91. **Schüssler M, Fricke U, Nikolov N, Hölzl J** (1991): Comparison of flavonoids occurring in *Crataegus* species and inhibition of 3'-5'-cyclic adenosine monophosphate phosphodiesterase. *Planta Med* **57**(8): p. A 133.

92. **Schüssler M, Hölzl J, Fricke U** (1995): Myocardial effects of Flavonoids from Crataegus Species. *Arzneim. Forsch/Drug Research* **45 (II)(8)**: p. 842-845.
93. **Siegel G, Casper U, Schnalke F, Hetzer R** (1996): Molecular physiological effector mechanisms of hawthorn extract in cardiac papillary muscle and coronary vascular smooth muscle. *Phytother Res* **10**: p. 195-198.
94. **Silver P J, Walus K, DiSalvo J** (1984): Adenosine-mediated relaxation and activation of cyclic AMP-dependent protein kinase in coronary arterial smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther* **228(2)**: p. 342-347.
95. **Smith T W, Antman E M, Friedman P L, Blatt C M, Marsh J D** (1984): Digitalis-Glycosides: Mechanisms and manifestation of Toxicity. *Prog Cardiovasc Dis* **26(5)**: p. 413-540.
96. **Solaro R J, Powers F M, Gao L, Gwathmey J K** (1993): Control of myofilament activation in heart failure. *Circulation* **87**: p. VII-38.
97. **Starling E H**, Linear lectures on the law of the heart. . 1918, London: Longmans, Green&Co.
98. **Tan L B, Jalil J E, Janicki J S, Weber K T** (1991): Cardiac myocyte necrosis induced by angiotensin II *Circ Res.* **69**: p. 1185-1195.
99. **Tanz R D** (1986): Possible contribution of digitalis-induced coronary constriction to toxicity. *Am Heart J* **111(4)**: p. 812-819.
100. **Tatsukawa Y, Arita M, Kiyosue T, Mikurya Y, Nasu M** (1993): A comparative study of effects of isoproterenol and dihydroouabain on calcium transients and contraction in cultured rat ventricular cells. *J Mol Cell Cardiol* **25(6)**: p. 707-720.

101. **Terzic A, Puceat M, Vassort G, Vogel SM** (1993): Cardiac alpha1-adrenoceptors: an overview. *Pharmacol Rev* **45**: p. 147-175.
102. **The Digitalis Investigation Group** (1997): The effect of Digoxin on mortality and morbidity in patients with heart failure. *N Engl J Med* **336**(8): p. 525-533.
103. **Wankerl M, Böhm M, Morano I, Rüegg J C, Eichhorn M, Erdmann E** (1990): Calcium sensitivity and myosin light chain pattern of atrial and ventricular skinned cardiac fibers from patients with various kinds of cardiac disease. *J Mol Cell Cardiol* **22**: p. 1425-1438.
104. **Weikl A, Noh H S** (1993): Der Einfluß von Crataegus bei globaler Herzinsuffizienz. *Herz und Gefäße* **11**: p. 516-524.
105. **Weikl A, Zapfe G, Assmus K D, Neukum-Schmidt A, Schmitz J** (1993): Multizentrische randomisierte placebokontrollierte Doppelblindprüfung zum Nachweis der Wirksamkeit von Crataegus forte bei Patienten mit Herzinsuffizienz im Stadium II nach NYHA. *Internist* **34** Beilage zu Heft 12.
106. **Yokoyama T, Yakano M, Bednarczyk J L, McIntyre B W, Entman M, Mann D L** (1997): Tumor necrosis factor-alpha provokes a hypertrophic growth response in adult cardiac myocytes. *Circulation* **95**(5): p. 1247-1252.
107. **Yusuf S, Maggioni A, Rouleau J** (1997): Effects of Candesartan, Elanapril or their combination on exercise capacity, ventricular function, clinical deterioration and quality of life in heart failure: randomized evaluation of strategies for left ventricular dysfunction (RESOLVD). *Circulation* **96** (suppl 1): p. I-452.

-
108. **Zhu Y, Yang H, Endoh M**, (1997): Negative chronotropic and inotropic effects of endothelin isopeptides in mammalian cardiac muscle. *AM J Physiol* **273**: p. H119-H127.

Eigene Veröffentlichungen

1. **Schmidt-Schweda S, Rummer C, Möllmann H, Kamenzin S, von Burstin J, Wollner S, Holubarsch Ch:** Inotropic effects of endothelin in isolated myocytes from human atrial and ventricular myocardium. *Eur Heart J*, 1999, 20: P 1194
2. **Schmidt-Schweda S, Möllmann H, Rummer C, Kamenzin S, Wollner S, von Burstin J, Holubarsch Ch:** Inotropic effects of endothelin in isolated myocytes from human atrial and ventricular failing and nonfailing myocardium. *Circulation*, 1999, 100 (suppl): P 615
3. **Schmidt-Schweda S, von Burstin J, Möllmann H, Wollner S, Holubarsch Ch:** Der positiv inotrope Effekt des Crataegus Spezialextrakts an isolierten Kardiomyozyten aus menschlichem Vorhof- und Ventrikelmyokard wird vorwiegend durch oligomere Procyanidine vermittelt. *DGK 2000*: P 797
4. **Schmidt-Schweda S, Rummer C, Möllmann H, Kamenzin S, von Burstin J, Wollner S, Holubarsch Ch:** Inotroper Effekt von Angiotensin II ab isolierten Kardiomyozyten aus menschlichem Vorhof- und Ventrikelmyokard. *DGK 2000*: P 801
5. **Schmidt-Schweda S, Möllmann H, Rummer C, Kamenzin S, Wollner S, von Burstin J, Holubarsch Ch:** Zelluläre Mechanismen des inotropen Effekts von Endothelin an isolierten menschlichen Kardiomyozyten aus Vorhofmyokard und insuffizientem sowie nicht insuffizientem Ventrikelmyokard. *DGK 2000*: V 554
6. **Fliedner A, Minami K, Möllmann H, von Burstin J, Burkard T, Dragu A, Körfer R, Holubarsch Ch:** Analysis of contractile force, time to peak and relaxation time of myocardium obtained from a heart with primary graft failure by muscle strip preparations and single cell analysis. *J Cardiovasc Engineering*, 2000 5 (4) p 253

IX Lebenslauf

Johannes von Burstin	geb. am 03. 04. 1976
Eltern	Andreas von Burstin, geb. am 15. 01. 1935 Gerharde von Burstin, geb. am 28. 07. 1945
Geschwister	Martina von Burstin, geb. am 19. 12. 1966 Alexander von Burstin, geb. am 03. 09. 1968
Schulbildung	09.82-07.86 Grundschule im Schuldorf Bergstraße 09.87-07.88 Förderstufe des Schuldorf Bergstraße 09.88-06.95 Gymnasium des Schuldorf Bergstraße Allg. Hochschulreife
Wehrdienst	07. 95 - 05. 96 4./ABCAbwBtl. 750 Bruchsal
Universität	Seit dem Wintersemester 1996 Studium der Humanmedizin an der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg.
01. 09. 98	Ärztliche Vorprüfung
23. 03. 2000	Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung.
Praktika und Famulaturen	
Mai/Juni 96	Praktikum Kreiskrankenhaus Bergstraße
März/April 1999	Famulatur Uniklinik Freiburg Innere Medizin
Juli/August 1999	Famulatur OZK Berlin – Innere Medizin
März/April 2000	Famulatur Praxis Dr. Lambert – Anästhesie
März/April 2001	Famulatur Mater Misericordiae Hospital Dublin – Innere Medizin
Doktorarbeit:	Seit September 1998 in der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Holubarsch

X Danksagungen

Herrn Dr. med. Stephan Schmidt-Schweda danke ich für die Überlassung des Dissertationsthemas sowie für die vorbildliche Betreuung und seine Diskussionsbereitschaft, die auch über die Distanz von vielen Kilometern nicht getrübt wurden.

Herrn Prof. Dr. med. Christian Holubarsch danke ich für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe. Sowohl seine erfrischende Art als auch seine fundierten Kenntnisse waren mir bei der Erstellung dieser Arbeit eine große Hilfe.

Herrn Prof. Dr. med. L. C. Rump möchte ich für die Übernahme des Zweitgutachtens danken.

Herrn Helge Möllmann und Herrn Stefan Wollner danke ich für die hervorragende Zusammenarbeit, die sich weit über den Laboralltag hinaus erstreckt.

Herrn Adrian Dragu, Herrn Thilo Burkard, Herrn Dr. med. Anselm Fliedner und Herrn Reza Wakili danke ich für die Unterstützung aus Bad Oeynhausen.

Den Mitarbeitern der Abteilung für Herzchirurgie der Chirurgischen Universitätsklinik Freiburg (Direktor: Prof. Dr. med. F. Beyersdorf) und des Herzzentrums NRW (Direktor: Prof. Dr. med. R. Körfer) danke ich für die Bereitstellung von Myokardproben. Ohne ihre Unterstützung wäre ein Zustandekommen der vorliegende Arbeit unmöglich gewesen.

Der Firma Dr. Willmar Schwabe möchte ich für die Bereitstellung der zu prüfenden Substanzen und das in die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Holubarsch gesetzte Vertrauen bedanken.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, deren Unterstützung mir das Studium und die Dissertation ermöglicht. Erst der familiäre Zusammenhalt hat es ermöglicht, so manche Herausforderung erfolgreich zu bewältigen.