

Die Zusammensetzung der Zytokine in humanen Perikardergüssen

**Untersuchungen an gepoolter und
erkrankungsgruppenspezifischer Perikardflüssigkeit**

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereiches Medizin
der Justus-Liebig-Universität Giessen

vorgelegt von Peters, Negin
aus Friedberg

Bad Nauheim 2002

Aus dem Max-Planck-Institut für
Physiologische und Klinische Forschung
Abteilung Experimentelle Kardiologie
Leiter: Prof. Dr. Dr. h. c. W. Schaper
in Bad Nauheim

Gutachterin: Prof. Dr. Dr. h. c. J. Schaper
Gutachter: Prof. Dr. J. Lohmeyer

Tag der Disputation: 13. Mai 2003

meiner lieben Familie in Dankbarkeit

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
1.1. Fragestellung	2
2. Material und Methoden	3
2.1. Gruppenspezifische Perikardergüsse	3
2.1.1. Aufteilung der Perikardflüssigkeit in Patientengruppen	3
2.1.2. Entnahme der Perikardflüssigkeit	4
2.1.3. Versuche mit gruppenspezifischer Perikardflüssigkeit	5
2.1.3.1. Versuch 1: Messung der LDH-Aktivität in der Perikardflüssigkeit	5
2.1.3.2. Messungen der Zytokinkonzentrationen mittels ELISA	
2.1.3.2. Versuch 2: Interleukin 4 (IL-4)	6
2.1.3.3. Versuch 3: Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor (GM-CSF)	8
2.1.3.4. Versuch 4: Interleukin 6 (IL-6)	9
2.1.3.5. Versuch 5: Interleukin 1 alpha (IL-1 α)	9
2.1.3.6. Versuch 6: Interleukin 10 (IL-10)	9
2.1.3.7. Versuch 7: Tumor Necrosis Factor - alpha (TNF- α)	10
2.1.3.8. Versuch 8: Interleukin 13 (IL-13)	10
2.1.3.9. Versuch 9: Transforming Growth Factor - beta 1 (TGF- β 1)	11
2.1.3.10. Versuch 10: Endothelin-1 (ET-1)	12
2.1.3.11. Versuch 11: Interleukin 1 beta (IL-1 β)	12
2.1.3.12. Versuch 12: Monocyte Chemoattractant Protein 1 (MCP-1)	12
2.1.4. Auswertung der ELISAs	13
2.2. Gepoolte Perikardflüssigkeit	13
2.2.1. Perikardflüssigkeitspool	13
2.2.2. High Salt Precipitation	13
2.2.3. SDS-Seite (Sodium Dodecyl Sulfate - Polyacrylamide Gel)	14
2.2.4. Silberfärbung der Polyacrylamidgele	15
2.2.5. Isolation der neonatalen Myozyten	16
2.2.6. Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)	19

2.2.7. Versuche mit gepoolter Perikardflüssigkeit	20
2.2.7.1. Versuch 1: Auftrennung der Perikardflüssigkeit mit Hilfe der High Salt Precipitation	20
2.2.7.1.1. Versuch 1.1: Auftrennung der acht Fraktionen mit Hilfe einer SDS-Seite	21
2.2.7.1.2. Versuch 1.2: Die Wirkung der Fraktionen auf die Myozyten	22
2.2.7.2. Versuch 2: Auftrennung der Perikardflüssigkeit über eine Heparinsäule der HPLC	22
2.2.7.2.1. Versuch 2.1: Auftrennung der 13 Fraktionen mit Hilfe einer SDS-Seite	23
2.2.7.2.2. Versuch 2.2: Untersuchung der Wirkung der Fraktionen auf neonatale Myozyten	23
2.2.7.3. Versuch 3: Auftrennung der Perikardflüssigkeit mit Hilfe eines Kationen-Anionen-Austauschers der HPLC bei verschiedenen pH-Werten der mobilen Phase	24
2.2.7.3.1. Versuch 3.1: Untersuchung der Wirkung der bei pH 5,5 aufgetrennten Fraktionen auf neonatale Myozyten	24
2.2.7.3.2. Versuch 3.2: Untersuchung der Wirkung der bei pH 6,5 aufgetrennten Fraktionen auf neonatale Myozyten	24
2.2.7.3.3. Versuch 3.3: Auftrennung der 11 Fraktionen mit Hilfe einer SDS-Seite	24
3. Ergebnisse	27
3.1. Ergebnisse der Versuche mit gruppenspezifischen Perikardergüssen	27
3.1.1. Versuch 1: Messung der LDH-Aktivität in der Perikardflüssigkeit	27
3.1.2. Versuch 2: Interleukin 4 (IL-4)	27
3.1.3. Versuch 3: Granocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor (GM-CSF)	28
3.1.4. Versuch 4: Interleukin 6 (IL-6)	28
3.1.5. Versuch 5: Interleukin 1 alpha (IL-1 α)	29
3.1.6. Versuch 6: Interleukin 10 (IL-10)	30
3.1.7. Versuch 7: Tumor Necrosis Factor - alpha (TNF- α)	31
3.1.8. Versuch 8: Interleukin 13 (IL-13)	31

3.1.9. Versuch 9: Transforming Growth Factor - beta 1 (TGF- β 1)	32
3.1.10. Versuch 10: Endothelin-1 (ET-1)	33
3.1.11. Versuch 11: Interleukin 1 beta (IL-1 β)	34
3.1.12. Versuch 12: Monocyte Chemoattractant Protein 1 (MCP-1)	35
3.2. Ergebnisse der Versuche mit gepoolter Perikardflüssigkeit	36
3.2.1. Versuch 1: Auftrennung der Perikardflüssigkeit mit Hilfe der High Salt Precipitation	36
3.2.1.1. Versuch 1.1: Auftrennung der acht Fraktionen mit Hilfe einer SDS-Seite	36
3.2.1.2 Versuch 1.2: Wirkung der Fraktionen auf die Myozyten	37
3.2.2. Versuch 2: Auftrennung der Perikardflüssigkeit mit Hilfe einer Heparinsäule der HPLC	40
3.2.2.1. Versuch 2.1: Auftrennung der 13 Fraktionen mit Hilfe einer SDS-Seite	41
3.2.2.2. Versuch 2.2: Untersuchung der Wirkung der Fraktionen auf neonatale Myozyten	42
3.2.3. Versuch 3: Auftrennung der Perikardflüssigkeit mit Hilfe eines Kationen-Anionen-Austauschers der HPLC bei verschiedenen pH-Werten der mobilen Phase	43
3.2.3.1. Versuch 3.1: Untersuchung der Wirkung der bei pH 5,5 aufgetrennten Fraktionen auf neonatale Myozyten	43
3.2.3.2. Versuch 3.2: Untersuchung der Wirkung der bei pH 6,5 aufgetrennten Fraktionen auf neonatale Myozyten	45
3.2.3.3. Versuch 3.3: Auftrennung der elf Fraktionen aus Versuch 3.1 und 3.2 mit Hilfe einer SDS-Seite	47
4. Diskussion	49
4.1. Endothelin-1	53
4.2. Monocyte Chemoattractant Protein 1	57
4.3. Granulocyte Macrophage - Colony Stimulating Factor (GM-CSF)	58
4.4. Interleukine	60
4.4.1. Interleukin 1 (IL-1)	61
4.4.2. Interleukin 6 (IL-6)	64
4.4.3. Interleukin 10 (IL-10)	66

4.4.4.	Interleukin 4 (IL-4)	66
4.4.5.	Interleukin 13 (IL-13)	67
4.5.	Tumor Necrosis Factor - alpha (TNF- α)	68
4.6.	Transforming Growth Factor- beta 1 (TGF- β 1)	70
4.7.	Laktatdehydrogenase (LDH)	72
4.8.	Zusammenfassende Interpretationen der Befunde	73
5.	Zusammenfassung	79
6.	Abkürzungen	81
7.	Literaturverzeichnis	83
8.	Danksagung	103
9.	Curriculum vitae	105

1. Einleitung

Die Bedeutung der Perikardflüssigkeit in der Pathogenese von kardialen Erkrankungen ist bis heute weitgehend unerforscht. Auch sonst gibt es keine Flüssigkeit des menschlichen Körpers, über die so wenig bekannt ist. Dies ist wohl zu allererst durch die Risiken bedingt, die mit dem Gewinnen der Perikardflüssigkeit verbunden sind. Dadurch scheidet die Perikardflüssigkeit als Diagnosemittel der klinischen Routine aus. Im Rahmen von Operationen am offenen Herzen kann aber die Perikardflüssigkeit ohne zusätzliches Risiko für den Patienten entnommen und untersucht werden. Dadurch steht den Kardiologen zusätzliches Material zur Verfügung, das von diagnostischem Nutzen sein kann und gegebenenfalls sogar neue Möglichkeiten zur therapeutischen Interventionen eröffnet.

Damit diese neue Möglichkeit, einen Einblick in die Geschehnisse des menschlichen Körpers zu gewinnen, in Zukunft genutzt werden kann, muss die Perikardflüssigkeit umfassend untersucht, die Substanzen, die sie enthält analysiert und die gewonnenen Informationen nach bestimmten Kriterien, die noch festgesetzt werden müssen, klassifiziert werden.

In dieser Arbeit soll erstens untersucht werden, ob die Perikardflüssigkeit per se einen direkten Effekt auf Kardiomyozyten ausübt und zweitens, ob sie ein Indikator für die diversen Geschehnisse im Myokard bei Herzerkrankungen verschiedener Genese ist.

Der erste Teil dieser Arbeit befaßt sich mit interindividuellen Schwankungen der Zusammensetzung der Zytokine in der Perikardflüssigkeit und Ergüssen von einzelnen Patienten. Dazu wurde intraoperativ Perikardflüssigkeit von 27 Patienten entnommen. Die so gewonnen Perikardergüsse werden nach den Grunderkrankungen der Patienten in die vier Erkrankungsgruppen „Herzinsuffizienz“, „koronare Herzkrankheit“, „Niereninsuffizienz“ und „Klappenfehler“ unterteilt.

Verschiedene Gruppen von Substanzen, darunter Enzyme wie Kراتinin-kinase (CK) und Laktatdehydrogenase (LDH), Wachstumsfaktoren wie basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) oder Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) und Nukleoside wie Adenison oder Inosin sind in der Perikardflüssigkeit vorhanden. In dieser Arbeit sollen nun Substanzen aus der Familie der Zytokine untersucht werden.

Für bestimmte Zytokine wurde in anderen Arbeiten gezeigt, dass sie bei Herzkreislauferkrankungen eine Rolle spielen. Für manche wurden in

Zusammenhang mit bestimmten Erkrankungsursachen erhöhte Werte im Serum beobachtet.

Diese Arbeit untersucht für weitere Zytokine, ob sie in der Perikardflüssigkeit nachweisbar sind und ob gruppenspezifische Unterschiede in der Zytokin-zusammensetzung der Perikardflüssigkeit dieser Patientengruppen vorliegen.

Da es keine Kontrollgruppe mit Perikardergüssen von gesunden Patienten gibt, erhebt diese Arbeit nicht den Anspruch, absolute Aussagen über die Konzentrationen der Stoffe in der Perikardflüssigkeit zu machen, sondern beschränkt sich auf krankheitsspezifische Unterschiede und diskutiert die mögliche pathophysiologische Bedeutung der einzelnen Zytokine für die Pathogenese am Herzen.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde die Perikardflüssigkeit verschiedener Patienten ungeachtet der Ursache ihres Herzleidens gepoolt und mittels Salzpräzipitation und HPLC in verschiedene Fraktionen unterteilt. Es wurde untersucht, ob diese Fraktionen eine Wirkung auf die Entwicklung von kultivierten neonatalen Myokardzellen ausüben und ob man diese Wirkung differenzieren kann.

1.1. Fragestellung

Zusammenfassend kann man die dieser Arbeit zugrundeliegende Fragestellung in die fünf unten angeführten Fragen unterteilen:

- Hat Perikardflüssigkeit per se eine Wirkung auf Myozyten?
- Lässt sich diese Wirkung differenzieren?
- Welche Zytokine sind in der Perikardflüssigkeit vorhanden?
- Beeinflusst die zugrundeliegende Erkrankung die spezifische Zusammensetzung der Zytokine in der Perikardflüssigkeit?
- Kann die Perikardflüssigkeit Krankheitsgeschehnisse zuverlässig reflektieren?

2. Material und Methoden

2.1. Gruppenspezifische Perikardergüsse

2.1.1. Aufteilung der Perikardflüssigkeit in Patientengruppen

Die Perikardflüssigkeit von 27 Patienten, die sich einer Operation zur Korrektur von Klappendefekten oder dem Anlegen von Bypässen zur Behandlung der KHK unterzogen, wurden in dieser Arbeit untersucht. Sieben Patienten hatten eine KHK, sieben eine Herzinsuffizienz, weitere sieben waren Klappenersatzpatienten und sechs gehörten zu einer der oben genannten Gruppen und hatten zusätzlich eine Niereninsuffizienz.

Die Aufteilung in Gruppen erfolgte wie folgt:

KHK-Gruppe

Patienten mit koronarer Herzkrankheit, die an mindestens zwei Gefäßen operationsbedürftig waren, deren Ejektionsfraktion aber jeweils über 70% lag:

Patienten-Nr.	Alter in Jahren	Geschlecht	Gewicht in kg	Größe in cm	LV-EF	Diagnose
703	69	w	56	152	o.B.	KHK, 2GE, NYHA III
745	75	m	100	172	o.B.	KHK, 3GE, NYHA III, 40% HSS
754	75	m	82	173	0,8	KHK, 2GE, NYHA III, Z.n. VWI
762	58	m	76	180	o.B.	KHK, 3GE, NYHA I, 50% HSS
941	71	w	93	172	0,7	KHK, 2GE, NYHA III, HSS
978	73	m	100	190	o.B.	KHK, 3GE, VHF
980	54	m	90	179	o.B.	KHK, 3GE

HI-Gruppe

Patienten mit KHK oder Kardiomyopathie, deren Ejektionsfraktion unter 50% lag:

Patienten-Nr.	Alter in Jahren	Geschlecht	Gewicht in kg	Größe in cm	LV-EF	Diagnose
755	62	m	100	175	0,20	KHK, 1GE, NYHA III, 2 x HWI
761	64	m	90	180	0,45	KHK, 3GE, NYHA II, 2 x HWI
789	61	m	83	184	0,15	DCM, NYHA III, Indikation zur HTX
809	68	m	72	171	0,45	KHK, 3GE, NYHA II, Z.n. Infarkt, mittelgr. HSS
825	72	w	85	169	0,40	KHK, 2GE, NYHA III, 2 x HWI
952	61	m	90	173	0,45	KHK, Z.n. Anterolateralinfarkt, HSS
982	59	m	68	172	0,40	KHK, 3GE, VWI

VP-Gruppe

Patienten mit einem Klappenvitium:

Patienten-Nr.	Alter in Jahren	Geschlecht	Gewicht in kg	Größe in cm	LV-EF	Diagnose
703	69	w	56	152	o.B.	KHK, 2GE, NYHA III
745	75	m	100	172	o.B.	KHK, 3GE, NYHA III
754	75	m	82	173	0,7	KHK, 2GE, NYHA III, Z.n. VWI
762	58	m	76	180	o.B.	KHK, 3GE, NYHA I
941	67	w	93	172	0,7	KHK, 2GE, NYHA III
978	63	m	100	190	o.B.	KHK, 3GE, VHF
980	54	m	90	179	o.B.	KHK, 3GE

NI-Gruppe

Patienten, die zusätzlich zu ihrer Herzerkrankung an einer Niereninsuffizienz leiden:

Patienten-Nr.	Alter in Jahren	Geschlecht	Gewicht in kg	Größe in cm	LV-EF	Diagnose
712	61	m	83	170	o.B.	hochgr. subakute AI bei Endokarditis, NYHA IV
716	73	m	76	176	o.B.	KHK, 3GE, NYHA I
741	64	m	81	183	0.57	KHK, 3GE, NYHA III
766	78	m	87	186	0.55	KHK, 3GE, NYHA III, Z.n. VWI
794	62	w			0.16	KHK, 3GE, HWI (verstorben)
844	84	m	70	168	o.B.	KHK, 2GE, NYHA III, Mitralinsuff. mit Prolaps

2.1.2. Entnahme der Perikardflüssigkeit

Die Perikardflüssigkeiten wurden den Patienten während einer Operation am offenen Herzen entnommen. Dies geschah direkt nach dem Eröffnen des Herzbeutels mittels einer Einwegspritze. Die Patienten waren zu diesem Zeitpunkt der Operation heparinisiert. Die Aufbewahrung der Perikardflüssigkeiten erfolgte bei -70 °C bis zu 12 Monaten.

Da bei dieser Methode die Perikardflüssigkeit mit Blut verunreinigt werden kann, wurden Ergüsse mit verschiedenem Farbcharakter gewonnen. Diese wurden in drei verschiedenen Kategorien eingeteilt:

<i>hell:</i>	keine Beimengung von Blut
<i>mittel:</i>	etwas Beimengung von Blut erkennbar, Verfärbung eher zartrosa
<i>dunkel:</i>	eindeutige Blutbeimengung, Farbe orange bis rot

Es werden in dieser Arbeit nur Ergüsse der Farbkategorien „hell“ und „mittel“ verwendet.

2.1.3. Versuche mit gruppenspezifischer Perikardflüssigkeit

2.1.3.1. Versuch 1: Messung der LDH-Aktivität in der Perikardflüssigkeit

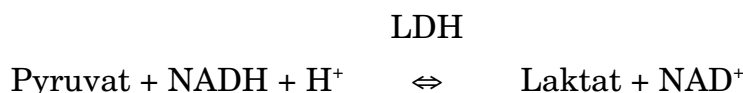
Laktatdehydrogenase katalysiert die Interkonversion von Laktat und Pyruvat. Diese Reaktion ist ein Teilschritt der anaeroben Glykolyse und läuft bei Sauerstoffmangel ab. Das Enzym ist ein tetrameres Protein und besitzt fünf Isoforme. Das Herz, die Niere, das Gehirn und Erythrozyten haben die höchsten Anteile an LDH-1 und LDH-2. In der Leber und in der Skelettmuskulatur befinden sich hingegen die höchsten Konzentrationen an LDH-5. Bei einem Myokardinfarkt ist die Konzentration an LDH signifikant erhöht, wobei das Konzentrationsmaximum etwa 48 Stunden nach Schmerzeintritt erreicht wird und ca. 10 Tage anhält.

Eine Erhöhung der LDH-Konzentration kann jedoch auch andere Ursachen haben, wie zum Beispiel Lebererkrankungen oder eine perniziöse Anämie.

Testprinzip:

Die LDH-Aktivität innerhalb der verschiedenen Perikardergüsse wurde mittels eines Testsets der Firma Sigma Diagnostics gemessen.

Dem Testprinzip liegt die folgende Reaktion zugrunde:



Bei der Reduktion von Pyruvat durch LDH wird eine equimolare Menge an NADH zu NAD^+ ionisiert. Diese Oxidation bewirkt eine Abnahme der Absorption bei 340 nm, für die NADH verantwortlich ist. Daher ist die Abnahme der Absorption bei 340 nm direkt proportional zur LDH-Aktivität in den Proben.

Der Versuchsablauf wird hier nicht nochmals aufgeführt, da der Versuch genau nach der Anleitung der Firma Sigma durchgeführt wurde und die Prozedur in der Versuchsanleitung zum Testset nachgelesen werden kann.

Messungen der Zytokinkonzentrationen mit Hilfe der ELISA

2.1.3.2. Versuch 2: Interleukin 4 (IL-4)

Zur Messung der Menge an freiem IL-4 in der PCF der verschiedenen Patienten, wurde das „CYTELISA human IL-4 ELISA-Kit“ der Firma Cytimmune verwendet.

Sensitivität	0,87 pg/ml
Detektionsspanne:	8 pg/ml bis 500 pg/ml
Kreuzreaktionen:	<0,5% gegen Zytokinstandards
Variabilität innerhalb eines Assays:	7,9%
Variabilität unter verschiedenen Assays:	11,4%

Prinzip:

Die Proben werden in Wells gegeben, die mit monoklonalen Anti-human-IL-4-Antikörpern von der Maus überzogen sind. An diesen Antikörpern haftet das freie menschliche IL-4. Weiterhin werden IL-4-spezifische polyklonale Ratten-anti-human-Antikörper hinzugefügt, die menschliches IL-4 in Lösung binden. Durch das Hinzugeben von Ziegen-anti-Ratten-alkalische-Phosphatase, die an den polyklonalen Ratten-anti-human-Antikörper bindet und die weitere Zugabe einer Farbreagenzlösung, kann die Menge an Zytokin in der Probelösung ermittelt werden. Dazu wird eine Standardkurve erstellt, die den direkten Zusammenhang zwischen optischer Dichte und Zytokinkonzentration angibt.

Die Farbreagenzlösung ist ein Zweiphasensystem. In diesem System dephosphoryliert die alkalische Phosphatase das Substrat NADPH zu NADH. Das NADH wirkt dann als Kofaktor, der die Redoxreaktion zwischen Alkoholdehydrogenase und Diaphorase aktiviert. Diese Redoxreaktion erzeugt Formazan, einen tiefroten Stoff, der Licht der Wellenlänge 492 nm absorbiert.

Die Standardlösung wird zur Kontrolle jeweils in zweifacher Ausführung aufgetragen, die Perikardflüssigkeitsproben der jeweiligen Patienten in dreifacher Ausführung. Weiterhin wird auch die gepoolte Perikardflüssigkeit in dreifacher Ausführung getestet.

Kitmaterial:

- | | |
|--|---------------------------------------|
| 1. Waschpuffer: | 20 fach konzentriert (50 ml-Flasche) |
| 2. Assay Lösungsmittel: | eine gebrauchsfertige Flasche (50 ml) |
| 3. IL-4 Standard: | in lyophilisierter Form |
| 4. poliklonaler IL-4 -Antikörper: | in lyophilisierter Form |
| 5. Farbreagenz A: | 12 ml-Flasche |
| 6. Farbreagenz B: | 12 ml-Flasche |
| 7. Ziegen-anti-Ratten-alkalische-Phosphatase: | in lyophilisierter Form |
| 8. Stopplösung | 10 ml 0,5 molare schweflige Säure |
| 9. eine mit Anti-human-IL-4 bezogene Mikrotitrierplatte mit 96 Wells | |
| 10. zwei Verschlussfolien | |

Vorgehensweise:Vorbereitung:*Herstellung der Standardverdünnungsreihe:*

Der lyophilisierte Standard wird in 1000 μl Assaylösungsmittel aufgelöst. Es wird eine Verdünnungsreihe erstellt, wobei der Standard weiterhin in Assaylösungsmittel verdünnt wird. Der Standard #5 enthält dann nur noch Assaylösungsmittel (siehe Tabelle):

Standard #	lyophilisierter Standard	#1	#2	#3	#4	#5
	davon 50 μl in #1	davon 250 μl in #2	davon 250 μl in #3	davon 250 μl in #4		
Anfangsvolumen (μl) an Assaylösungsmittel	1000	950	750	750	750	750
Konzentration (pg/ml):	10.000	500	125	31,25	7,81	0,0

polyklonale Ratten-anti-human-IL-4-Antikörper:

Die lyophilisierten polyklonalen Ratten-anti-human-IL-4-Antikörper werden in 3,5 ml Assaylösungsmittel aufgelöst.

Waschpuffer:

Der Waschpuffer wird in 1,0 l aqua dest. aufgelöst.

Ziegen-anti-Ratten-alkalische-Phosphatase:

Die lyophilisierte Ziegen-anti-Ratten-alkalische-Phosphatase wird in 6,0 ml Assaylösungsmittel aufgelöst.

Versuchsablauf:

Die Standards #1-5 werden in doppelter Ausführung in die dafür vorgesehenen Wells gegeben. Weiterhin werden jeweils 50 μ l der verschiedenen Perikardflüssigkeitsproben in je ein Well gegeben. Jede dieser Proben wird dreifach aufgetragen.

In alle bearbeiteten Wells werden 25 μ l Ratten anti-polyklonale Human-IL-4-Ak gegeben. Die Platte wird abgedeckt und für drei Stunden bei Raumtemperatur stehengelassen.

Anschließend wird die Platte fünfmal mit je 250 μ l Waschpufferlösung pro Well gewaschen, wobei die Waschlösung jeweils 10 min einwirken muss, bevor sie sorgfältig abgesaugt werden kann. Je sorgfältiger gewaschen wird, desto weniger artifizielle Verfärbungen sind zu erwarten.

Nun wird 50 μ l Ziegen-anti-Ratten-alkalische-Phosphatase in jedes Well gegeben und 45 min bei Raumtemperatur abgedeckt und stehengelassen.

Wieder wird die Platte fünfmal wie oben beschrieben gewaschen.

Die Farbreagenzien A und B wurden kurz vor ihrem Gebrauch vermischt, wobei es wichtig ist, dass sie zu diesem Zeitpunkt von Kühlschranktemperatur auf Raumtemperatur aufgewärmt sind. 200 μ l der Mischung werden in jedes Well gegeben.

Nach 10 min werden die Extinktionen mittels eines Photometers (Filter 492 nm, Referenzfilter 620 nm) gemessen.

2.1.3.3. Versuch 3: Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor (GM-CSF)

Zur Messung der Menge an freiem GM-CSF in der Perikardflüssigkeit der verschiedenen Patienten wird der „CYTELISA human GM-CSF ELISA-Kit“ der Firma Cytimmune verwendet.

Sensitivität:	0,80 pg/ml
Detektionsspanne:	8 pg/ml bis 500 pg/ml
Kreuzreaktionen:	<0,5% gegen Zytokinstandards
Variabilität innerhalb eines Assays:	7,7%
Variabilität unter verschiedenen Assays:	10,5%

In allen weiteren Punkten entspricht dieser Kit dem unter IL-4 beschriebenen Kit.

2.1.3.4. Versuch 4: Interleukin 6 (IL-6)

Zur Messung der Menge an freiem IL-6 in der Perikardflüssigkeit der verschiedenen Patienten wird der „CYTELISA human IL-6 ELISA-Kit“ der Firma Cytime verwendet.

Sensitivität:	3,4 pg/ml
Detektionsspanne:	8 pg/ml bis 500 pg/ml
Kreuzreaktionen:	<0,5% gegen Zytokinstandards
Variabilität innerhalb eines Assays:	8,1%
Variabilität unter verschiedenen Assays:	10,4%

In allen weiteren Punkten entsprach dieser Kit dem unter IL-4 beschriebenen Kit.

2.1.3.5. Versuch 5: Interleukin 1 alpha (IL-1 α)

Zur Messung der Menge an freiem IL-1 α in der Perikardflüssigkeit der verschiedenen Patienten wird der „CYTELISA human IL-1 α ELISA-Kit“ der Firma Cytime verwendet.

Sensitivität:	0,8 pg/ml
Detektionsspanne:	8 pg/ml bis 500 pg/ml
Kreuzreaktionen:	<0,5% gegen Zytokinstandards
Variabilität innerhalb eines Assays:	8,3%
Variabilität unter verschiedenen Assays:	11,2%

In allen weiteren Punkten entspricht dieser Kit dem unter IL-4 beschriebenen Kit.

2.1.3.6. Versuch 6: Interleukin 10 (IL-10)

Zur Messung der Menge an freiem IL-10 in der Perikardflüssigkeit der verschiedenen Patienten wird der „CYTELISA human IL-10 ELISA-Kit“ der Firma Cytime verwendet.

Sensitivität:	1,6 pg/ml
Detektionsspanne:	8 pg/ml bis 500 pg/ml
Kreuzreaktionen:	<0,5% gegen Zytokinstandards
Variabilität innerhalb eines Assays:	8,4%
Variabilität unter verschiedenen Assays:	10,2%

In allen weiteren Punkten entspricht dieser Kit dem unter IL-4 beschriebenen Kit.

2.1.3.7. Versuch 7: Tumor Necrosis Factor - alpha (TNF- α)

Zur Messung der Menge an freiem TNF- α in der Perikardflüssigkeit der verschiedenen Patienten wird der „CYTELISA human TNF- α ELISA-Kit“ der Firma Cytimmune verwendet.

Sensitivität:	4,8 pg/ml
Detektionsspanne:	15,6 pg/ml bis 1000 pg/ml
Kreuzreaktionen:	<0,5% gegen Zytokinstandards
Variabilität innerhalb eines Assays:	8,3%
Variabilität unter verschiedenen Assays:	10,8%

Außer der Standardverdünnungsreihe des TNF- α -Kits unterscheidet sich dieser Kit weder in den sonstigen Materialien noch in der Vorgehensweise vom IL-4-Kit.

Verdünnungsreihe

Standard #	lyophilisierter Standard	#1	#2	#3	#4	#5
	davon 80 μ l	davon 250 μ l in #2	davon 250 μ l in #3	davon 250 μ l in #4		
Anfangsvolumen (μ l) an Assaylösungsmittel	1000	920	750	750	750	750
Konzentration (pg/ml):	12.500	1000	250	62,5	15,6	0,0

2.1.3.8. Versuch 8: Interleukin 13 (IL-13)

Zur Messung der Menge an freiem IL-13 in der Perikardflüssigkeit der verschiedenen Patienten wird der „CYTELISA human IL-13 ELISA-Kit“ der Firma Cytimmune verwendet.

Sensitivität:	7,6 pg/ml
Detektionsspanne:	15,6 pg/ml bis 1000 pg/ml
Kreuzreaktionen:	<0,5% gegen Zytokinstandards
Variabilität innerhalb eines Assays:	8,4%
Variabilität unter verschiedenen Assays:	11,9%

Der IL-13-Kit unterscheidet sich weder in den verwendeten Materialien noch in der Vorgehensweise vom IL-4-Kit. Nur die Standardverdünnungsreihen dieser zwei Kits unterscheiden sich.

Verdünnungsreihe

Standard #	lyophilisierter Standard	#1	#2	#3	#4	#5
	davon 100 μ l	davon 250 μ l in #2	davon 250 μ l in #3	davon 250 μ l in #4		
Anfangsvolumen (μ l) an Assaylösungsmittel	1000	900	750	750	750	750
Konzentration (pg/ml):	10.000	1000	250	62,5	15,6	0,0

2.1.3.9. Versuch 9: Transforming Growth Factor - beta 1 (TGF- β 1)

Zur Messung von TGF- β 1 steht uns ein „Biotrak cellular communication assay“ der Firma Amersham Pharmacia Biotech zur Verfügung.

TGF- β 1 wird von den Zellen als latenter Komplex sezerniert. Damit es an den Maus-anti-TGF- β 1-Antikörper des ELISA -Kits binden kann, muss es aktiviert werden, das bedeutet, aus diesem Komplex gelöst werden. In vitro erreichen wir diese Aktivierung durch eine Säurebehandlung.

Ansonsten wird strikt nach der Anleitung des Kits verfahren, was hier nicht mehr detailliert aufgeführt wird, da das Prinzip sich nicht wesentlich von der unter IL-4 angeführten Methode und Vorgehensweise unterscheidet.

Sensitivität:	4 pg/ml
Detektionsspanne:	15,6 pg/ml bis 1000 pg/ml
Kreuzreaktionen:	<1% in Abwesenheit von TGF- β 1
Variabilität innerhalb eines Assays:	3,3 - 3,9%
Variabilität unter verschiedenen Assays:	7,7 - 13,4%

2.1.3.10. Versuch 10: Endothelin-1 (ET-1)

Die Messung wurde mittels eines „Biotrak cellular communication assays“ der Firma Amersham Pharmacia Biotech durchgeführt. Er wurde sich strikt an die Prozedur, die der Anleitung zum Kit entnommen werden kann und daher hier nicht nochmals aufgeführt wird gehalten.

Sensitivität:	12,46 pg/ml
Detektionsspanne:	24,8 pg/ml bis 797,4 pg/ml
Kreuzreaktionen:	5,9% in Abwesenheit von ET-1
Variabilität innerhalb eines Assays:	<6,6%
Variabilität unter verschiedenen Assays:	<20,3%

2.1.3.11. Versuch 11: Interleukin 1 - beta (IL-1 β)

Die Messung wird mittels eines „Biotrak cellular communication assays“ der Firma Amersham Pharmacia Biotech durchgeführt.

Sensitivität:	<1 pg/ml
Detektionsspanne:	10 pg/ml bis 400 pg/ml
Kreuzreaktionen:	keine bekannt
Variabilität innerhalb eines Assays:	<10%
Variabilität unter verschiedenen Assays:	<10%

In allen weiteren Punkten entspricht dieser Kit dem bei Versuch 10 verwendeten Kit.

2.1.3.12. Versuch 12: Monocyte Chemoattractant Protein 1 (MCP-1)

Die Messung wird mittels eines „Biotrak cellular communication assays“ der Firma Amersham Pharmacia Biotech durchgeführt.

Sensitivität:	<10 pg/ml
Detektionsspanne:	51 pg/ml bis 2000 pg/ml
Kreuzreaktionen:	keine bekannt
Variabilität innerhalb eines Assays:	<10%
Variabilität unter verschiedenen Assays:	<10%

In allen weiteren Punkten entspricht dieser Kit dem bei Versuch 10 verwendeten Kit.

2.1.4. Auswertung der ELISAs

Die Meßergebnisse werden anhand von Mittelwert $\pm$ Standardfehler beschrieben. Zum Vergleich der Patientengruppen wird die einfaktorielle Varianzanalyse mit nachfolgenden multiplen Vergleichen nach Bonferroni benutzt. Bei nicht gegebenen Voraussetzungen (Normalverteilung, homogene Varianzen) wird alternativ der Kruskal-Wallis-Test mit anschließenden multiplen Vergleichen nach Dunn eingesetzt. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit kleiner 5% ($p < 0,05$) wird als statistisch signifikant angesehen.

Verwendete Computersoftware: SigmaStat für Windows bzw. GraphPad Prism für Macintosh.

2.2. Gepoolte Perikardflüssigkeit

2.2.1. Perikardflüssigkeitspool

Um festzustellen, ob die Perikardflüssigkeit eine direkte Wirkung auf Myozyten ausübt, werden Ergüsse der Kategorien „hell“ und „mittel“ von 30 Patienten ungeachtet der jeweils spezifischen Erkrankung gepoolt, mittels verschiedener unten angeführter Methoden aufgetrennt und die Wirkung der einzelnen Fraktionen auf neonatale Myozyten getestet.

2.2.2. High Salt Precipitation

Material:

Medium 199 der Firma c.c.pro (mit Earle's Salzen, 25 mM HEPES, ohne Phenolrot & L-Glutamin)

Methode:

Mit der Methode der Salzpräzipitation können die Proteine in der Perikardflüssigkeit grob aufgeteilt werden. Salz in einer Lösung verringert das Lösungsvermögen des Wassers für Proteine, denn durch Interaktion der Wassermoleküle mit den Salzionen werden diese von den Proteinoberflächen abgezogen. Abhängig vom Grad der Hydrophobie der Proteinoberfläche, z. B. durch ein gehäuftes Auftreten der Aminosäuren Leucin, Valin, Phenylalanin, verbinden

sich die hydrophoben Anteile schneller und fallen jeweils bei einer bestimmten Salzkonzentration aus. So fallen die hydrophoberen Proteine schon bei einer niedrigen Salzkonzentration aus, während die hydrophilen erst bei höheren Konzentrationen aggregieren. Auch spielt die Größe der Proteine eine Rolle. Größere Proteine fallen schneller aus als kleine mit ansonsten ähnlichem Löslichkeitsverhalten.

Ammoniumsulfat wird für die Aussalzungsversuche verwendet, da es eine hohe Löslichkeit und eine geringe Dichte besitzt. Weiterhin hat es die Eigenschaft, dass es bei der Auflösung kaum Hydratationswärme freisetzt, was in Bezug auf die hitzeempfindlichen Proteine sehr vorteilhaft ist.

2.2.3. SDS-Seite (Sodium Dodecyl Sulfate - Polyacrylamide Gel)

Prinzip:

Die SDS-Gelelektrophorese ist eine Methode, um Proteine in Lösung aufzutrennen, zu charakterisieren, zu vergleichen und zu quantifizieren. Dazu werden die Proben auf das Gel aufgetragen. An das Gel wird eine Spannung angelegt. Die Aufteilung erfolgt hauptsächlich aufgrund des Molekulargewichts der Proteine. Je kleiner das Protein, desto schneller durchläuft es das Gel, desto weiter unten ist die Bande, die es nach der Färbung auf dem Gel bildet. Die Dicke der Banden ist ein Maß für die semiquantitative Menge der Proteine in der Lösung.

Der Acrylamidgehalt der Gele besagt, wie stabil die Gele sind und in welcher Bandbreite die Proteine aufgeteilt werden. Es werden zehnprozentige Gele verwendet, da sie so reißfest sind, dass man sie gut handhaben kann. Man geht davon aus, dass die Proteine, die man sucht, ein Molekulargewicht zwischen 8 und 40 kDa haben und auch als Polymere in der Lösung vorhanden sein können. Daher wird das zehnprozentige Acrylamidgel bei einer Laufzeit von 1,5 Stunden gewählt. Die angelegte Spannung beträgt 300 V.

Die Proteine werden vor dem Auftragen auf das Gel denaturiert.

Über das „seperating gel“, in dem sich die Proteine später verfangen und aufteilen, wird das „stacking gel“ gegossen, in dem sich die größeren Proteine verfangen. In diesem „stacking gel“ befinden sich Mulden, in die die Proben aufgetragen werden. Durch das Durchlaufen des „stacking gels“ wird die Probe sozusagen gereinigt, bevor sie in das eigentliche „seperating gel“ gelangt.

Materialien:

separating gel (10%):	Acrylamid (40%)	5 ml
	TrisHCl (1 molar, pH 8,8)	7,5 ml
	Aqua dest.	6,9 ml
	SDS (10%)	0,2 ml
	Ammonium persulfat (1,5%)	0,34 ml
	TEMED	45 μ l
stacking gel (5%):	Acrylamid (40%)	1,25 ml
	TrisHCl (1 molar, pH 6,8)	1,25 ml
	Aqua dest.	7,0 ml
	SDS (10%)	0,1 ml
	Ammonium persulfat (1,5%)	0,36 ml
	TEMED	15 μ l
GLB:	Laemmlipuffer	950 μ l
	Merkaptoethanol	50 μ l

„BenchMark Protein Ladder“ und „BenchMark Prestained Protein Ladder“ der Firma GIBCO BRL

Vorgehensweise:

Die Proben werden bei 95 °C denaturiert und im Verhältnis von 1:9 mit GLB angefärbt. Pro Well werden 20 μ l der angefärbten Probelösungen zugegeben. Die Elektrophorese wird mittels des „Protean II xi 2-D Cell“-Gerätes der Firma Bio-Rad und der dazugehörigen Kühlung nach deren Anweisung durchgeführt.

2.2.4. Silberfärbung der Polyakrylamidgele**Material:****Fixative Enhancer Lösung:**

Fixative enhancer Konzentrat der Firma Biorad	80 ml
Methanol	400 ml
Essigsäure	80 ml
Aqua dest.	240 ml

Staining-Lösung:

destiliertes Wasser	70 ml
Silver Complexlösung der Firma Biorad	5 ml
Redcution Moderatorlösung der Firma Biorad	5 ml
Image Developmentlösung der Firma Biorad	5 ml
Development Acceleratorlösung	50 ml

Bei der Herstellung der Staining Lösung ist es von großer Wichtigkeit, dass die Reihenfolge, in der die verschiedenen Stoffe hinzugegeben werden, eingehalten wird. Die Lösung muß unmittelbar vor dem Gebrauch hergestellt werden und darf nicht stehengelassen werden. Weiterhin muß die Temperatur der Lösung der Raumtemperatur entsprechen.

Versuchsablauf:

1. Fixation:

Nach der Gelelektrophorese wird das Gel vorsichtig in die Fixative Enhancer Lösung gegeben und unter sanfter Bewegung 20 min lang fixiert.

2. Auswaschen:

Die Fixierlösung wird abgossen und das Gel unter sanfter Bewegung für 10 min in 800 ml destilliertem Wasser ausgewaschen. Dieser Schritt wird noch zweimal wiederholt.

3. Entwickeln:

Das Gel wird unter ständiger Bewegung ca. 20 min lang in die Staining-Lösung gegeben, bis die gewünschte Farbintensität erreicht ist.

4. Stopreaktion:

Ungefähr 15 min lang wird das Gel unter fortwährender Bewegung in eine Stoplösung bestehend aus fünfprozentiger Essigsäure gegeben. Danach kann das Gel mit destilliertem Wasser ausgewaschen und fotografiert werden.

2.2.5. Isolation der neonatalen Myozyten

Material:

Neonatale Rattenmyozyten:

Es wurden Ratten im Alter von zwei bis drei Tagen verwendet, da in diesem Alter die Myozyten noch neonatalen Teilungscharakter haben. Sie reagieren schneller auf Reize, sind nicht ausdifferenziert und sind widerstandsfähig gegen mechanische Belastungen, so dass sie den Zerkleinerungsprozess des Ventrikelgewebes relativ gut überstehen.

Brutschrank: 37,0°C
94% Luftfeuchtigkeit
4,9% CO₂-Gehalt

NBS 1% der Firma Gibco mit Medium 199 verdünnt

FCS 1% der Firma Gibco mit Medium 199 verdünnt

ADS-Puffer: 6,80 g/l NaCl
1,50 g/l NaH₂PO₄
0,40 g/l KCl
4,76 g/l HEPES
1,00 g/l Dextrose
0,10 g/l MgSO₄

Kollagenaselösung: 10 ml Kollagenase
50 ml ADS-Puffer

Fibronektinlösung: 100 µl Fibronektin auf 10 ml Medium 199
für die 6-Well-Platte: 750 µl/well
für die 12-Well-Platte: 300 µl/well
für die 24-Well-Platte: 150 µl/well

Die Lösungen werden vor Anwendung steril gefiltert.

Methode:

Im folgenden Teil beziehen sich die Mengenangaben auf ca. 20 Tiere. Alle Arbeiten an Zellkulturen müssen unter sterilen Bedingungen durchgeführt werden.

Entnahme und Freipräparation der Herzen:

Die Ratten werden dekapitiert, wobei die Köpfe in flüssigen Stickstoff fallen, dann werden die Herzen herauspräpariert.

Die großen Gefäße werden sorgfältig entfernt und die Ventrikel in einen Behälter mit ca. 3 ml ADS-Puffer gegeben. Mit Hilfe einer Schere werden die Ventrikel nun so weit zerkleinert, dass eine homogene dickflüssige Lösung entsteht.

Reinigung der Myozytenlösung:

Um die Myozytenlösung von anderen Zellen zu reinigen, wird diese Myozytenlösung mit 10 ml der Kollagenaselösung in einen verschließbaren 100 ml-Erlenmeyerkolben gegeben, gut vermischt und 20 min unter Schütteln im Brutschrank

aufbewahrt. Danach wird der Überstand, indem sich vermehrt Fibroblasten und Endothelzellen befinden, entfernt und erneut 10 ml Kollagenaselösung hinzugegeben. Diese Lösung steht nun für weitere 45 min unter Schütteln im Brutschrank.

Der Überstand wird danach fünf Minuten lang mit 400 Umdrehungen/min zentrifugiert, während die verbleibende Lösung wieder mit 10 ml Kollagenaselösung versetzt und weitere 45 min im Brutschrank geschüttelt wird.

Der Überstand der zentrifugierten Lösung wird nun verworfen, das Präzipitat mit 10 ml einprozentigem NBS-Medium aufgefüllt, in einer Triangelflasche verschlossen und ohne Schütteln in den Brutschrank gestellt.

Die letzten drei Schritte werden nun 3-4 mal wiederholt, bis sich in der Triangelflasche 30-40 ml Myozytenmedium ansammelt.

Das Myozytenmedium wird nun auf zwei große Kulturschalen verteilt und für weitere zwei Stunden im Brutschrank stengelassen. Dadurch wird das Medium nochmals gereinigt, da die Nichtmyozyten am Plastik anhaften.

Dann wird das Myozytenmedium aus den Kulturschalen entnommen. Die Schalen werden mit einprozentiger NBS-Lösung gespült und die Spüllösung wird auch zu den Myozyten gegeben. Dadurch werden die Myozyten herausgespült und können weiterverwertet werden, während die Fibroblasten an der Plastikschale haftenbleiben.

Die Myozytenlösung wurde nochmals fünf Minuten bei 400 Umdrehungen/min zentrifugiert, der Überstand entsorgt und das Präzipitat mit einprozentiger FCS-Lösung versetzt. Es wird 1 ml FCS-Lösung pro neonatale Ratte verwendet.

Vorbereitung der Wellplatten:

Die Wellplatten werden in der Zwischenzeit mit der entsprechenden Menge Fibronectin bearbeitet, sodass der ganze Wellboden mit der Lösung bedeckt ist. Sie werden daraufhin 30 min bei 37 °C stengelassen. Danach wird das Fibronectin mit Medium 199 3-4 mal herausgewaschen und die Platte wird bei 37 °C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

Ermitteln der richtigen Myozytenkonzentration mittels Neubauer-Zählkammer:

50 µl Myozytenmedium wird mit 10 µl 4,0% Tryptophanblau gefärbt. In vier Quadranten mit je 16 Kammern werden die angefärbten Myozyten ausgezählt. Die vier Werte werden gemittelt. Dieser Mittelwert multipliziert mit einer Konstante ($1,25 \cdot 10^4$) ergibt die Konzentration der Myozyten pro ml.

Die optimale Zelldichte, die empirisch ermittelt wurde, beträgt $1,5 \cdot 10^5$ Zellen/ml. Das Myozytenmedium wird also entsprechend mit einprozentiger FCS-Lösung verdünnt.

Auftragen der Myozyten auf die Wellplatten:

Die Spüllösung wird aus den Wells abgesaugt und die entsprechende Menge Myozytenlösung in die Wells gegeben. Die Wells werden vorsichtig in zwei Richtungen geschüttelt, damit sich die Myozyten auf dem gesamten Wellboden verteilen.

Die Platten werden vor der Beimpfung 24 h stehengelassen. Dann wird die Lösung aus den Wells abgesaugt. Die lebenden Myozyten bleiben am Fibronektin kleben, während die toten auf diese Weise entfernt werden. Damit die Zellen nicht austrocknen, werden jeweils nur vier Wells gleichzeitig abgesaugt und dann schnellstmöglich mit „Medium 199“ gefüllt. Dieser Vorgang wird 3-4 mal wiederholt. Nun sind die Zellen vorbereitet beimpft zu werden.

2.2.6. Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie ist eine Auftrennungsmethode für Moleküle, basierend auf der Interaktion einer mobilen (flüssigen) Phase mit einer soliden stationären Phase. Die mobile Phase, die die zu untersuchende Probe enthält, fließt an der stationären Phase vorbei. Dabei bleiben durch molekulare Interaktionen die Probesubstanzen an spezifischen Positionen der stationären Phase hängen. Diese können dann während des Waschvorgangs nach und nach herausgelöst und detektiert werden.

Der UV-Detektor registriert optisch, wann eine Substanzbande aus der Säule eluiert wird. Er stellt also die Änderung der Zusammensetzung der mobilen Phase entsprechend der verschiedenen Absorptionen des ultravioletten Lichtes fest.

Diese Zusammenhänge werden graphisch festgehalten. Dabei sind die gemessenen Absorptionswerte relativ zueinander. Das heißt man kann von einem Wert nicht auf einen Stoff schließen, sondern nur Vergleiche innerhalb eines Laufes anstellen.

Für die Versuche wurde das HPLC-Gerät der Firma PerSeptive „Biosystems Modell BioCAD 700E“ verwendet.

Mobile Phase:

Dem Gerät stehen zwei Lösungen mit verschiedenen pH-Werten zur Verfügung. Aus diesen mischt sich die Maschine die mobile Phase mit dem benötigten pH-Wert.

Die erste Lösung hat einen pH-Wert von 4,5. Sie besteht aus den folgenden Substanzen, gelöst in einem Liter destilliertem Wasser:

33,3 mM	MES	(entspricht 7,20 g)
33,3 mM	HEPES	(entspricht 7,94 g)
33,3 mM	Natriumazetat	(entspricht 4,53 g)

Die zweite Lösung unterscheidet sich von der ersten durch den pH-Wert. Er beträgt 7,5.

Stationäre Phase:

Für die folgenden Versuche wurden drei verschiedene stationäre Phasen verwendet:

- „POROS Heparinsäule“ der Firma Perceptive Biosystems (Länge: 100 mm, Durchmesser: 4,6 mm, Packvolumen: 1,66 ml = 1 CV, Partikelgröße 20)
- „POROS HS starker Kationenaustauscher“ der Firma Perceptive Biosystems (Länge: 100 mm, Durchmesser: 4,6 mm, Packvolumen: 1,66 ml = 1 CV, Partikelgröße 20)
- „POROS QS starker Anionenaustauscher“ der Firma Perceptive Biosystems (Länge: 100 mm, Durchmesser: 4,6 mm, Packvolumen: 1,66 ml = 1 CV, Partikelgröße 20)

2.2.7. Versuche mit gepoolter PCF

2.2.7.1. Versuch 1: Auftrennung der Perikardflüssigkeit mit Hilfe der High Salt Precipitation

Jeweils 0,5 ml Perikardflüssigkeit werden zu je 0,5 ml 20%, 40%, 60% und 80% Ammoniumsulfatlösung gegeben. Die vier Lösungen wurden ca. 30 min lang geschüttelt und bei 4 °C eine Stunde lang bei 1000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert.

Nun müssen die Proben wieder entsalzt werden, damit ihre Wirkung auf neonatale Myozyten getestet werden kann, ohne dass diese wegen des erhöhten osmotischen Gradienten platzen.

Acht Ultrafilter mit einem Trennungsvermögen von je 15 kDa, jeweils ein Filter pro Überstand und einer pro Präzipitat, werden mit je 2 ml Aqua dest. zum Waschen zentrifugiert.

Der Überstand der Lösungen wird jeweils in ein Ultrafilter gegeben und mit „Medium 199“ auf 2 ml aufgefüllt. Das Präzipitat wird in je 2 ml „Medium 199“ gelöst und in ein Ultrafilter gegeben.

Die Proben werden insgesamt vier Stunden zentrifugiert, dabei wird immer wieder „Medium 199“ zum Spülen wie folgt hinzugegeben:

- 1 h bei 1500 Umdrehungen/min
Gabe von 2 ml „Medium 199“ pro Probe
- 1 h bei 1500 Umdrehungen/min
Gabe von 1ml „Medium 199“ pro Probe
- 1 h bei 1500 Umdrehungen/min
Gabe von 1ml „Medium 199“ pro Probe
- 1 h bei 1500 Umdrehungen/min

Dies ergab acht verschiedene Proben:	20% SN	20%PR
	40% SN	40%PR
	60% SN	60%PR
	80% SN	80%PR

Um die Proben zu sterilisieren, werden sie in kleine „SPIN-X zentrifuge tube filters“ gegeben und mit „Medium 199“ auf 0,5 ml Endvolumen aufgefüllt. Diese werden 30 min bei Raumtemperatur mit 1000 Umdrehungen/min zentrifugiert.

2.2.7.1.1. Versuch 1.1: Auftrennung der acht Fraktionen mit Hilfe einer SDS-Seite

Nun werden jeweils 10 μ l der Proben für die SDS-Seite vorbereitet und in folgender Weise auf die Seite aufgetragen:

slots:	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
Menge (µl):		10		15		20				20	20	20	20	20	20	20	20		
Lösung:		bench marker		mit GLB gefärbtem silver stain marker		mit GLB gefärbte PCF				20% SN, mit GLB gefärbt	20% PR, mit GLB gefärbt	40% SN, mit GLB gefärbt	40% PR, mit GLB gefärbt	60% SN, mit GLB gefärbt	60% PR, mit GLB gefärbt	80% SN, mit GLB gefärbt	80% PR, mit GLB gefärbt		
effektive Probemenge (µl):		1.75		2		2				2	2	2	2	2	2	2	2		

Die SDS-Seite wird dann mit Hilfe der Silberfärbung gefärbt.

2.2.7.1.2. Versuch 1.2: Die Wirkung der Fraktionen auf Myozyten

Die Proben werden zur Überprüfung ihrer Wirkung auf neonatale Myozyten in folgender Weise auf eine 24-Well-Mikrotiterplatte gegeben:

Well:	1	2	3	4	5	6	7	8
	con.	con.	PCF	PCF	20% SN	20% SN	20% PR	20% PR
Well:	9	10	11	12	13	14	15	16
	40% SN	40% SN	40% PR	40% PR	60% SN	60% SN	60% PR	60% PR
Well:	17	18	19	20	21	22	23	24
	80% SN	80% SN	80% PR	80% PR	con.	con.	con.	con.

Die Proben sind jeweils fünfprozentig und werden mit „full medium“ verdünnt. Die Kontrolle (con.) enthält nur „full medium“.

Die Entwicklung der Zellen wurde jeweils nach 22 h, 46 h, 70 h fotografisch festgehalten.

2.2.7.2. Versuch 2: Auftrennung der Perikardflüssigkeit über eine Heparinsäule der HPLC

300 ml der gepoolten Perikardflüssigkeit werden auf das „BioCad 700E“ geladen und durchlaufen die Heparinsäule mit einer Flußrate von 10,00 ml/min.

Der UV-Detektor wird auf eine Wellenlänge von 280 nm gesetzt. Die Proteine werden von der Säule mit einem Gradienten von 20 mM bis 600 mM in 20 CV gelöst. Die Auftrennung dauerte 20 min. Es werden 13 verschiedene Fraktionen mit einem Volumen von ca. 700 µl ermittelt.

Sie sollten auf ca. 50 µl konzentriert und anschließend sterilisiert werden. Dazu werden sie in Ultrafilter mit einem Trennungsvermögen von 15 kDa gegeben und für eine Stunde bei 1500 Umdrehungen/min zentrifugiert.

Um die Proben zu sterilisieren, werden sie in kleine „SPIN-X zentrifuge tube filter“ gegeben. Diese werden 40 min bei Raumtemperatur mit 1000 Umdrehungen/min zentrifugiert.

2.2.7.2.1. Versuch 2.1: Auftrennung der 13 Fraktionen mit Hilfe einer SDS-Seite

Nun werden jeweils 2 µl der konzentrierten Proben für die SDS-Seite vorbereitet und in folgender Weise auf die Seite aufgetragen:

slots:	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
Lösung:		1µl gepoolte Perikardflüssigkeit + 18 µl GLB		8 µl mit GLB gefärbter silver stain marker	2 µl Fraktion #1 + 18 µl GLB	2 µl Fraktion #2 + 18 µl GLB	2 µl Fraktion #3 + 18 µl GLB	2 µl Fraktion #4 + 18 µl GLB	2 µl Fraktion #5 + 18 µl GLB	2 µl Fraktion #6 + 18 µl GLB	2 µl Fraktion #7 + 18 µl GLB	2 µl Fraktion #8 + 18 µl GLB	2 µl Fraktion #9 + 18 µl GLB	2 µl Fraktion #10 + 18 µl GLB	2 µl Fraktion #11 + 18 µl GLB	2 µl Fraktion #12 + 18 µl GLB	2 µl Fraktion #13 + 18 µl GLB		12 µl mit GLB gefärbter silver stain marker

Die SDS-Seite wird mit Hilfe der Silberfärbung gefärbt.

2.2.7.2.2. Versuch 2.2: Untersuchung der Wirkung der Fraktionen auf neonatale Myozyten

Die 13 Fraktionen werden auf eine mit „Medium 199“ vorbehandelte 48-Well-Platte mit neonatalen Myozyten aufgetragen. Dabei wird jede der Fraktionen einmal in einer niedrigen (1 µl Probe mit 250 ml Medium) und einmal in einer höheren Konzentration (3 µl Probe mit 250 ml Medium) getestet. Von den drei Kontrollen (con.) enthielt die Negativkontrolle nur „full medium“, die anderen 1 bzw. 3 µl gepoolte Perikardflüssigkeit.

Die Entwicklung der Zellen wird 70 Stunden danach fotografisch festgehalten.

2.2.7.3. Versuch 3: Auftrennung der Perikardflüssigkeit mit Hilfe eines Kationen-Anionen-Austauschers der HPLC bei verschiedenen pH-Werten der mobilen Phase

Die Fraktion Nummer 13 des Versuches 2, die einen starken wachstums- und kontraktionsfördernden Effekt auf die kultivierten Myozyten ausübt, wird nun wieder mittels HPLC fraktioniert, diesmal mittels eines Kationen-Anionen-Austauschers. Dazu werden die Kationen- und Anionensäulen in Reihe geschaltet.

Es werden 30 µl dieser Fraktion auf das „BioCad 700E“ geladen. Die Flußrate beträgt 3 ml/min.

Der UV-Detektor wird auf eine Wellenlänge von 280 nm eingestellt. Die Proteine werden von beiden Säulen mit einem Gradienten von 0 - 1500 mM in 10 CV gelöst. Die Auftrennung vollzieht sich innerhalb von 30 min. Ansonsten entspricht die Vorgehensweise der unter Versuch 2 beschriebenen.

2.2.7.3.1. Versuch 3.1: Untersuchung der Wirkung der bei pH 5,5 aufgetrennten Fraktionen auf neonatale Myozyten

Der pH-Wert der mobilen Phase wurde auf 5,5 eingestellt. Dabei entstehen fünf verschiedene Fraktionen.

Jede Fraktion wird einmal in einer niedrigen (2 µl Probe mit 250 ml Medium) und einmal in einer höheren Konzentration (4 µl Probe mit 250 ml Medium) getestet. Ansonsten entspricht die Vorgehensweise der unter Versuch 2.2 beschriebenen.

2.2.7.3.2. Versuch 3.2: Untersuchung der Wirkung der bei pH 6,5 aufgetrennten Fraktionen auf neonatale Myozyten

Der pH-Wert der mobilen Phase wurde auf 6,5 festgelegt. Dabei entstehen sechs verschiedene Fraktionen. Ansonsten entspricht die Vorgehensweise der unter Versuch 3.1 beschriebenen.

2.2.7.3.3. Versuch 3.3: Auftrennung der 11 Fraktionen mit Hilfe einer SDS-Seite

Die Fraktionen aus Versuch 3.1 und 3.2 wurden gemeinsam auf eine SDS-Seite aufgetragen. Es werden jeweils 2 µl der konzentrierten Proben für die SDS-Seite vorbereitet und in folgender Weise aufgetragen:

slots:	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
Lösung:		7,5µl silver stain marker		1 µl Perikardflüssigkeit + 18 µl GLB		2 µl Fraktion V3.1#1+ 18 µl GLB	2 µl Fraktion V3.1#2+ 18 µl GLB	2 µl Fraktion V3.1#3+ 18 µl GLB	2 µl Fraktion V3.1#4+ 18 µl GLB	2 µl Fraktion V3.1#5+ 18 µl GLB	2 µl Fraktion V3.2#1+ 18 µl GLB	2 µl Fraktion V3.2#2+ 18 µl GLB	2 µl Fraktion V3.2#3+ 18 µl GLB	2 µl Fraktion V3.2#4+ 18 µl GLB	2 µl Fraktion V3.2#5+ 18 µl GLB	2 µl Fraktion V3.2#6+ 18 µl GLB		12,5µl silver stain marker	

Die SDS-Seite wird mit Hilfe der Silberfärbung gefärbt.

3. Ergebnisse

3.1. Ergebnisse der Versuche mit gruppenspezifischen Perikardergüssen

3.1.1. Versuch 1: Messung der LDH-Aktivität in der Perikardflüssigkeit

In allen Proben ist LDH-Aktivität nachweisbar. Zwischen der Enzymaktivität in den Perikardergüssen der Patienten der verschiedenen Gruppen besteht kein signifikanter Unterschied (s. Abb.1).

Die LDH-Aktivität der gepoolten Perikardflüssigkeit beträgt 57,147 U/l.

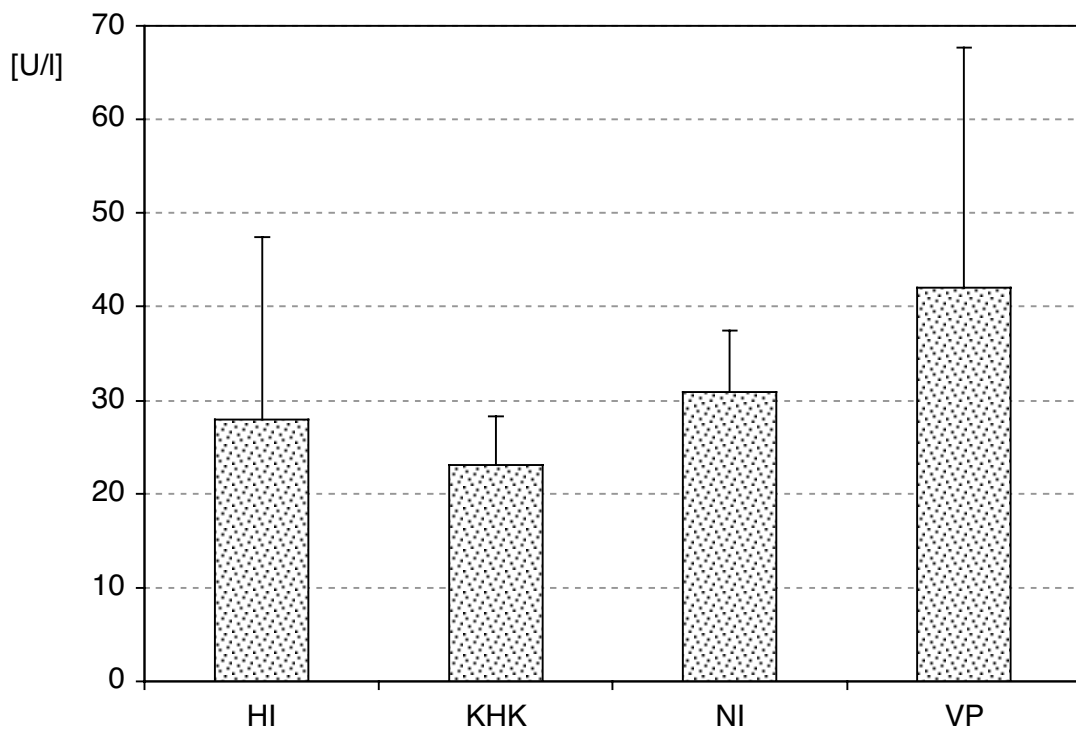


Abb. 1: Die Aktivität des Enzyms LDH in U/l

Es gibt eine hohe Variationsbreite unter den gemessenen Werten innerhalb einer Erkrankungsgruppe und es kann kein signifikanter gruppenspezifischer Unterschied zwischen diesen beobachtet werden.

3.1.2. Versuch 2: Interleukin 4 (IL-4)

In keiner der Proben befindet sich eine nachweisbare Konzentration an IL-4.

3.1.3. Versuch 3: Granulocyte Macrophage - Colony Stimulating Factor (GM-CSF)

GM-CSF kann nur im Erguß eines Patienten aus der Gruppe der Niereninsuffizienten nachgewiesen werden. Die Konzentration betrug 2,97 pg/ml.

3.1.4. Versuch 4: Interleukin 6 (IL-6)

IL-6 ist in allen Proben, außer der einer herzinsuffizienten Patientin nachweisbar. Zwischen den Konzentrationen von IL-6 in den Perikardergüssen der verschiedenen Gruppen besteht kein signifikanter Unterschied (s. Abb.2).

Die IL-6-Konzentration der gepoolten Perikardflüssigkeit beträgt 54,72 pg/ml.

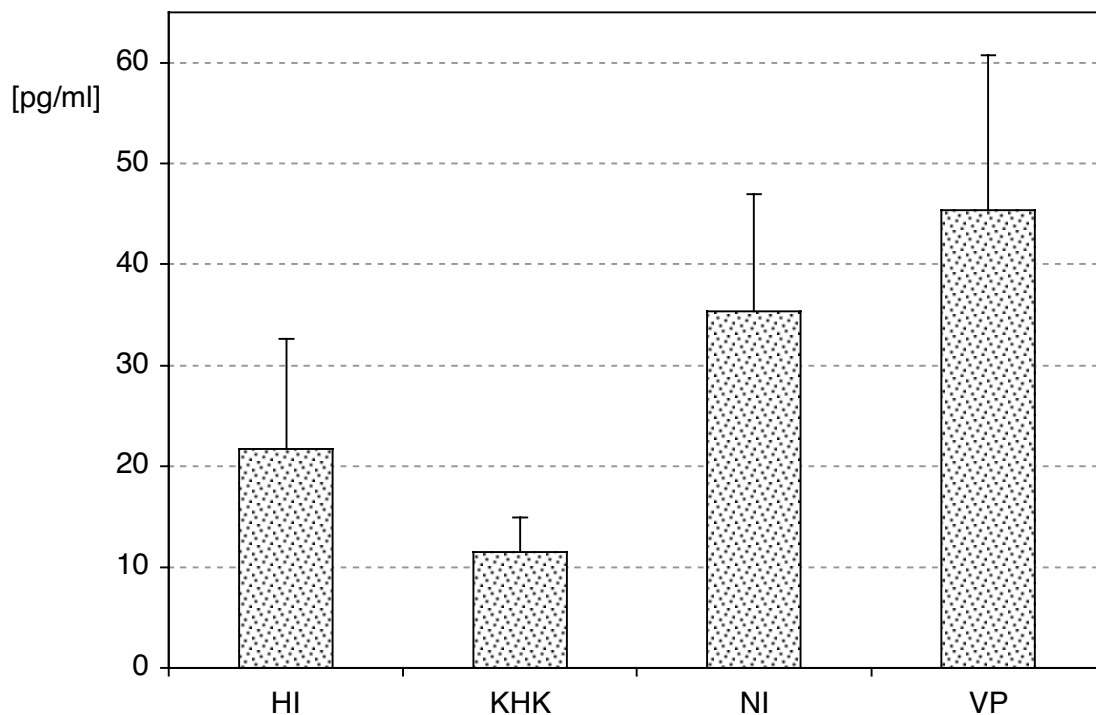


Abb. 2: Die Konzentration des Zytokins IL-6 [pg/ml] bezogen auf die verschiedenen Patientengruppen

Es gibt eine hohe Variationsbreite unter den gemessenen Werten innerhalb der Gruppen. Insgesamt werden Werte zwischen 5 und 62 pg/ml gemessen. Es kann kein signifikanter gruppenspezifischer Unterschied zwischen den Erkrankungsgruppen beobachtet werden.

3.1.5. Versuch 5: Interleukin 1 alpha (IL-1 α)

IL-1 α ist in allen Proben nachweisbar. Zwischen den Konzentrationen in den Perikardergüssen der verschiedenen Gruppen besteht kein signifikanter Unterschied (s. Abb.3).

Die IL-1 α -Konzentration der gepoolten Perikardflüssigkeit beträgt 2,09 pg/ml.

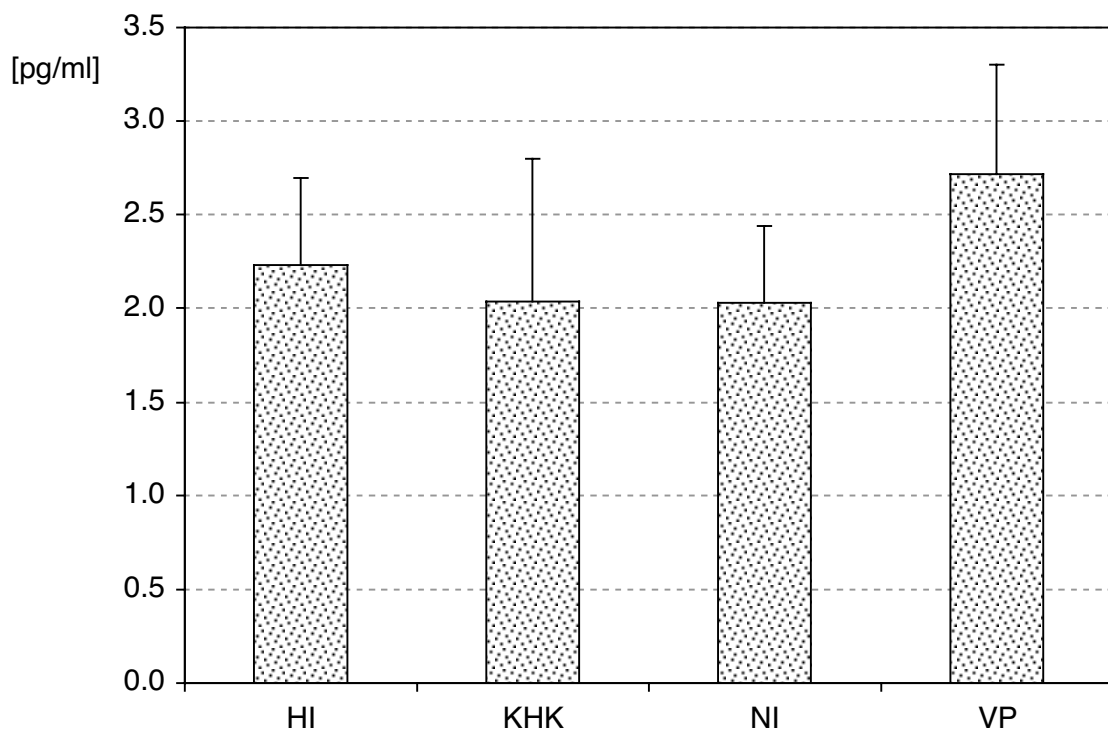


Abb. 3: Die Konzentration des Zytokins IL-1 α [pg/ml] bezogen auf die verschiedenen Patientengruppen

Es gibt eine hohe Variationsbreite unter den gemessenen Werten innerhalb der Gruppen. Insgesamt werden Werte zwischen 1 und 3,5 pg/ml gemessen. Es kann kein signifikanter gruppenspezifischer Unterschied zwischen den Erkrankungsgruppen beobachtet werden.

3.1.6. Versuch 6: Interleukin 10 (IL-10)

IL-10 ist in allen Proben nachweisbar. Zwischen den Konzentrationen von IL-10 in den Perikardergüssen der verschiedenen Gruppen besteht kein signifikanter Unterschied (s. Abb.4).

Die IL-10-Konzentration der gepoolten Perikardflüssigkeit beträgt 10,88 pg/ml.

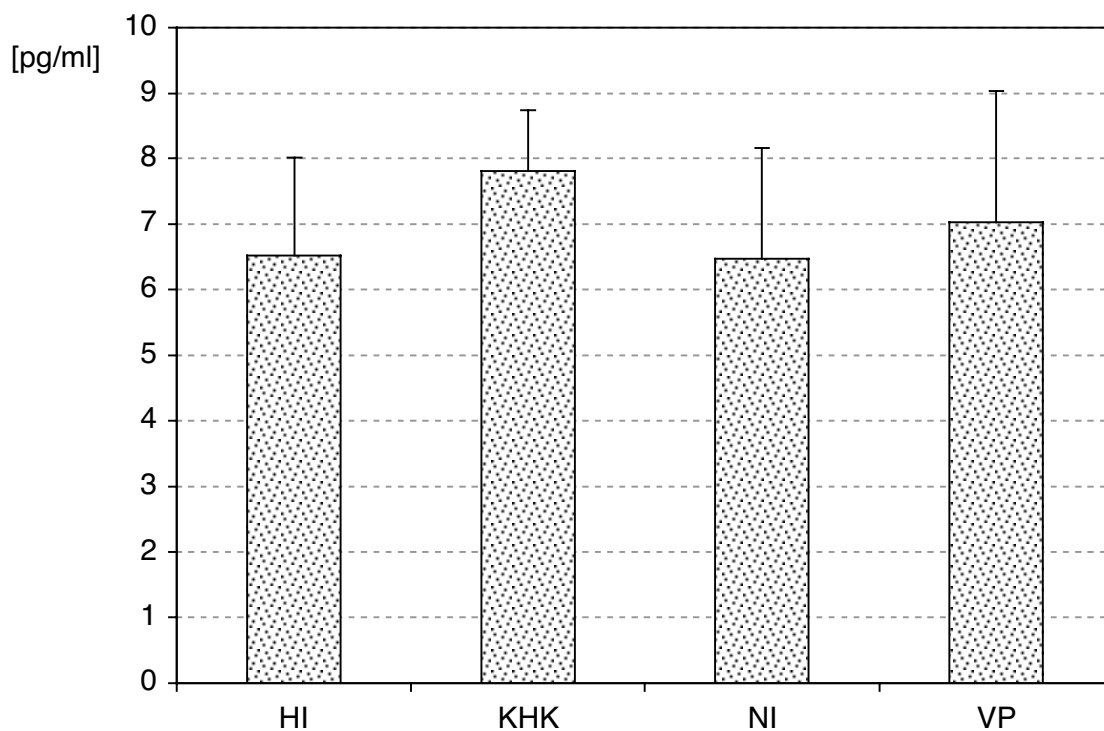


Abb. 4: Die Konzentration des Zytokins IL-10 [pg/ml] bezogen auf die verschiedenen Patientengruppen

Es gibt eine hohe Variationsbreite unter den gemessenen Werten innerhalb der Gruppen. Insgesamt werden Werte zwischen 2 und 9,5 pg/ml gemessen. Es kann kein signifikanter gruppenspezifischer Unterschied zwischen den Erkrankungsgruppen beobachtet werden.

3.1.7. Versuch 7: Tumor Necrosis Factor - alpha (TNF- α)

TNF- α ist in allen Proben nachweisbar. Zwischen den Konzentrationen von TNF- α in den Perikardergüssen der verschiedenen Gruppen besteht kein signifikanter Unterschied (s. Abb.5).

Die TNF- α -Konzentration der gepoolten Perikardflüssigkeit beträgt 45,89 pg/ml.

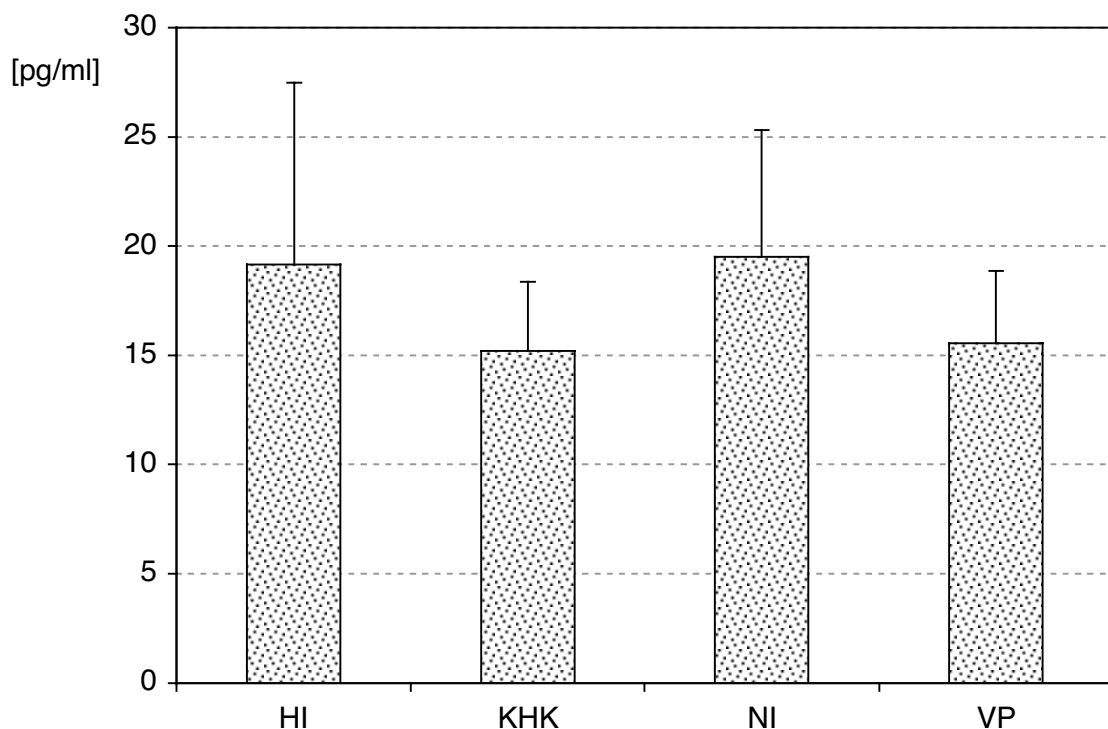


Abb. 5: Die Konzentration des Zytokins TNF- α [pg/ml] bezogen auf die verschiedenen Patientengruppen

Es gibt eine hohe Variationsbreite unter den gemessenen Werten innerhalb der Gruppen. Insgesamt werden Werte zwischen 5 und 30 pg/ml gemessen. Es kann kein signifikanter gruppenspezifischer Unterschied zwischen den Erkrankungsgruppen beobachtet werden.

3.1.8. Versuch 8: Interleukin 13 (IL-13)

In keiner Probe befindet sich eine nachweisbare Konzentrationen an IL-13.

3.1.9. Versuch 9: Transforming Growth Factor - beta 1 (TGF- β 1)

TGF- β 1 ist in allen Proben nachweisbar. Zwischen den Konzentrationen von TGF- β 1 in den Perikardergüssen der Patienten der verschiedenen Gruppen besteht kein signifikanter Unterschied (s. Abb.6).

Die TGF- β 1-Konzentration der gepoolten Perikardflüssigkeit beträgt 261,28 pg/ml.

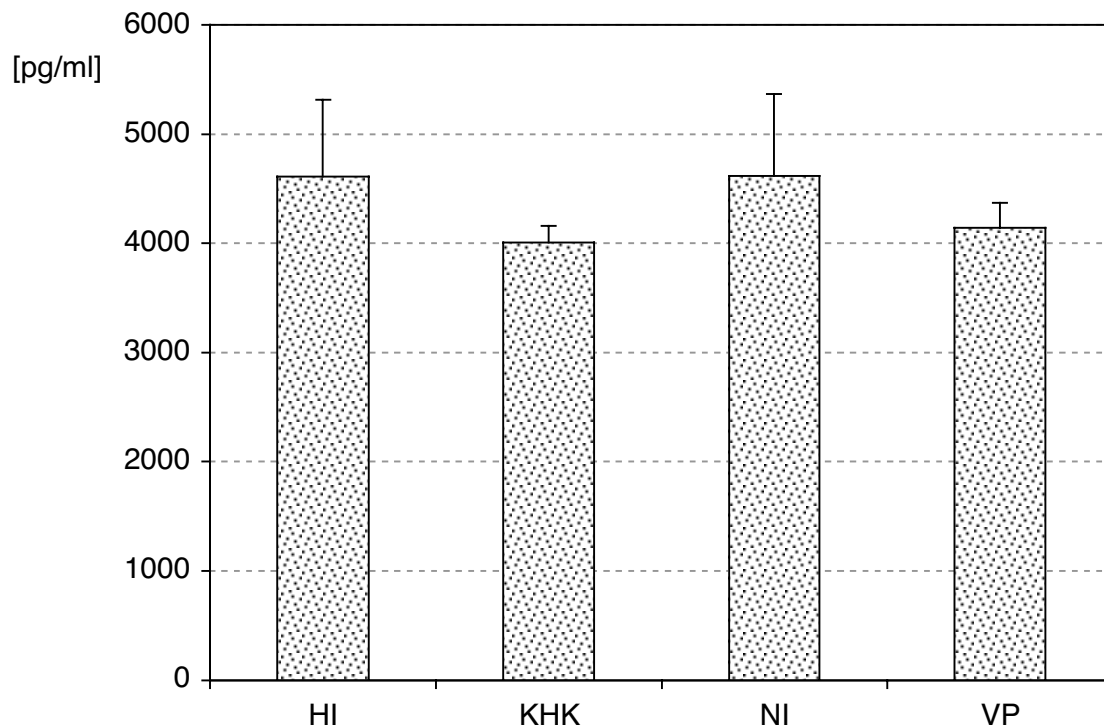


Abb. 6: Die Konzentration des Zytokins TGF- β ₁ [pg/ml] bezogen auf die verschiedenen Patientengruppen

Es gibt eine hohe Variationsbreite unter den gemessenen Werten innerhalb der Gruppen. Insgesamt werden Werte zwischen 500 und 5500 pg/ml gemessen. Es wird kein signifikanter gruppenspezifischer Unterschied zwischen den Erkrankungsgruppen beobachtet.

3.1.10. Versuch 10: Endothelin-1 (ET-1)

Endothelin-1 ist in allen Proben nachweisbar. Die ET-1-Konzentration der Herzklappenpatienten unterscheidet sich signifikant mit $p < 0,001$ von der herzinsuffizienter Patienten und mit $p < 0,01$ von der niereninsuffizienter und KHK-Patienten. Die Werte der Gruppe herzinsuffizienter Patienten variieren zwischen 0,08 und 0,25 fmol/ml, die der koronar Herzkranken zwischen 0,04 und 21,76 fmol/ml, die niereninsuffizienter Patienten zwischen 4,49 und 12,85 fmol/ml und die der Herzklappenpatienten zwischen 16,97 und 21,31 fmol/ml. Die Perikardflüssigkeit der Patientengruppe mit koronarer Herzerkrankung zeigt die größte Variation (s. Abb.7).

Die Endothelin-1-Konzentration der gepoolten Perikardflüssigkeit beträgt 16,97 fmol/ml.

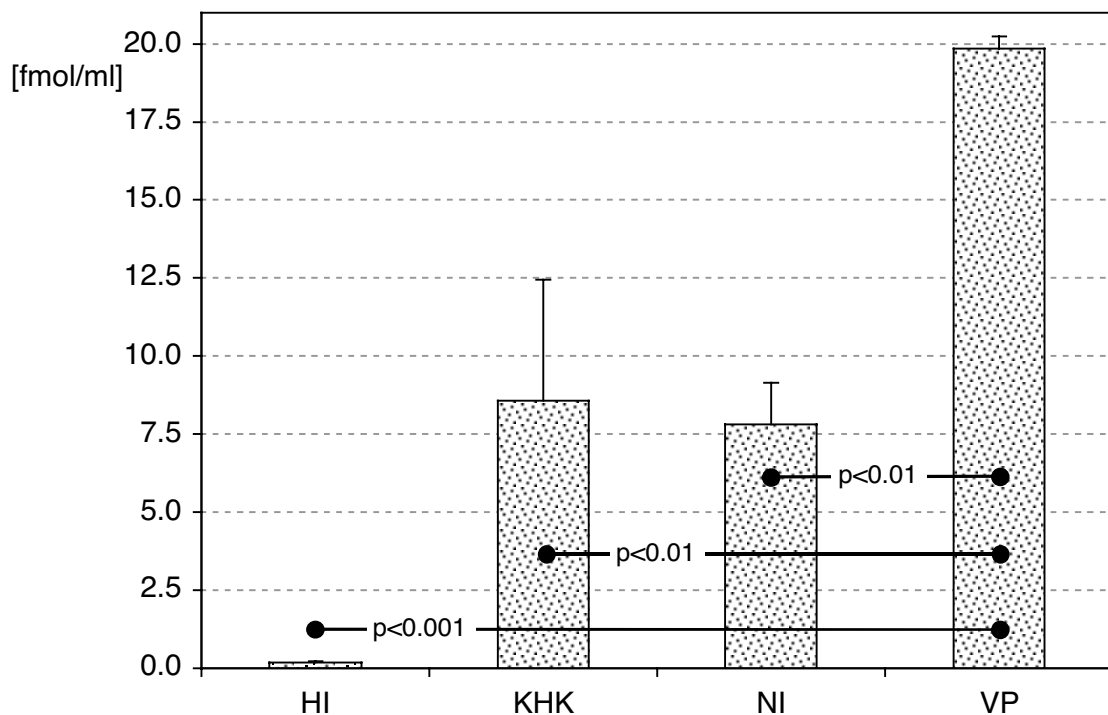


Abb. 7: Die Konzentration des Zytokins Endothelin-1 [fmol/ml] bezogen auf die verschiedenen Patientengruppen

Die Endothelin-1-Konzentration der Herzklappenpatienten unterscheidet sich signifikant mit $p < 0,001$ von der herzinsuffizienter Patienten und mit $p < 0,01$ von der niereninsuffizienter und KHK-Patienten.

3.1.11. Versuch 11: Interleukin 1 - beta (IL-1 β)

IL-1 β ist in allen Proben, außer in vier Proben von herzinsuffizienten Patienten vorhanden. Die Gruppe der herzinsuffizienten Patienten unterscheidet sich signifikant sowohl von der Gruppe der Nieren-, als auch der Herzklappenpatienten mit $p < 0,05$. Zur KHK-Gruppe besteht hingegen kein signifikanter Unterschied. Auch gibt es keine weiteren Unterschiede innerhalb der anderen Gruppen. Die Werte der Gruppe der herzinsuffizienten Patienten variieren zwischen 0 und 0,25 pg/ml, die der koronar Herzkranken zwischen 3,45 und 88,79 pg/ml, die der niereninsuffizienten Patienten zwischen 11,13 und 51,39 pg/ml und die der Herzklappenpatienten zwischen 9,73 und 50,87 pg/ml. Die Erkrankungsgruppe der koronar Herzkranken zeigte, wie schon bei der Endothelin-1-Messung, die größte Variation (s. Abb.8).

Die IL-1 β -Konzentration der gepoolten Perikardflüssigkeit beträgt 10,62 pg/ml.

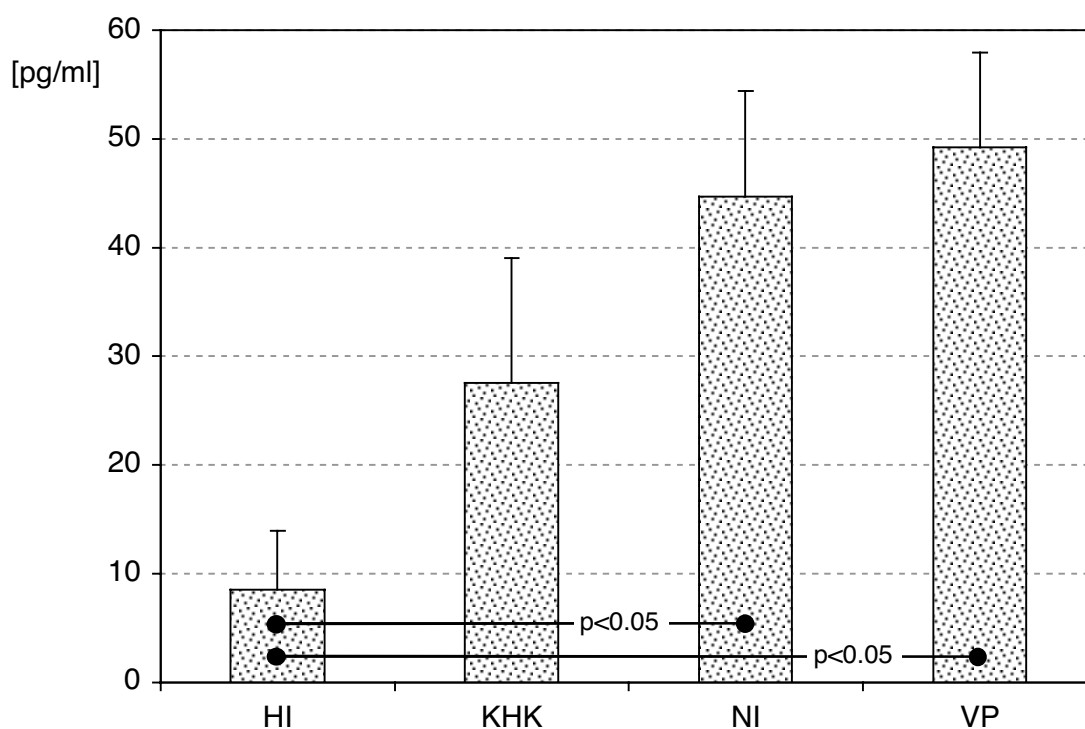


Abb. 8: Die Konzentration des Zytokins IL-1 β [pg/ml] bezogen auf die verschiedenen Patientengruppen

Die IL-1 β -Konzentration der herzinsuffizienten Patienten unterscheidet sich jeweils signifikant mit $p < 0,05$ von der niereninsuffizienter Patienten und der Herzklappenfehlerpatienten. Die Gruppe der koronaren Herzkranken hat keine statistisch signifikante Beziehung zu den anderen Erkrankungsgruppen.

3.1.12. Versuch 12: Monocyte Chemoattractant Protein 1 (MCP-1)

MCP-1 ist in allen Proben enthalten. Zwischen den Konzentrationen von MCP-1 in den Perikardergüssen der Patienten der verschiedenen Erkrankungsgruppen besteht kein signifikanter Unterschied (s. Abb.9).

Die MCP-1-Konzentration der gepoolten Perikardflüssigkeit beträgt 3,31 ng/ml.

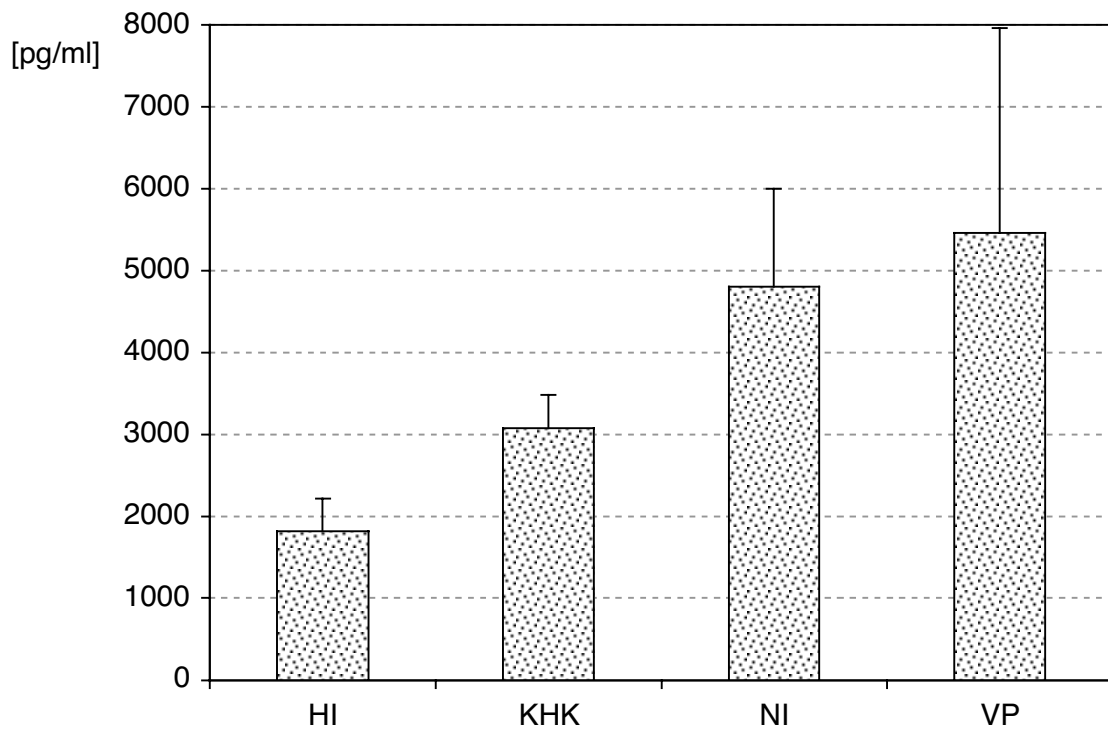


Abb. 9: Die Konzentration des Zytokins MCP-1 [pg/ml] bezogen auf die verschiedenen Patientengruppen

Es gibt eine hohe Variationsbreite unter den gemessenen Werten innerhalb der Erkrankungsgruppen. Insgesamt werden Werte zwischen 300 und 8000 pg/ml gemessen. Es kann kein signifikanter gruppenspezifischer Unterschied zwischen den Patientengruppen beobachtet werden.

3.2. Ergebnisse der Versuche mit gepoolter Perikardflüssigkeit

3.2.1. Versuch 1: Auftrennung der Perikardflüssigkeit mit Hilfe der High Salt Precipitation

Die grobe visuelle Kontrolle der verschiedenen Fraktionen ergab:

20%:	PR nicht erkennbar	SN gelblich
40%:	PR deutlich erkennbar, Farbe: gelb-weiß;	SN gelblich
60%:	PR deutlich erkennbar, Farbe: gelb;	SN gelblich
80%:	PR deutlich erkennbar, Farbe: orange;	SN klar

3.2.1.1. Versuch 1.1: Auftrennung der acht Fraktionen mit Hilfe einer SDS-Seite

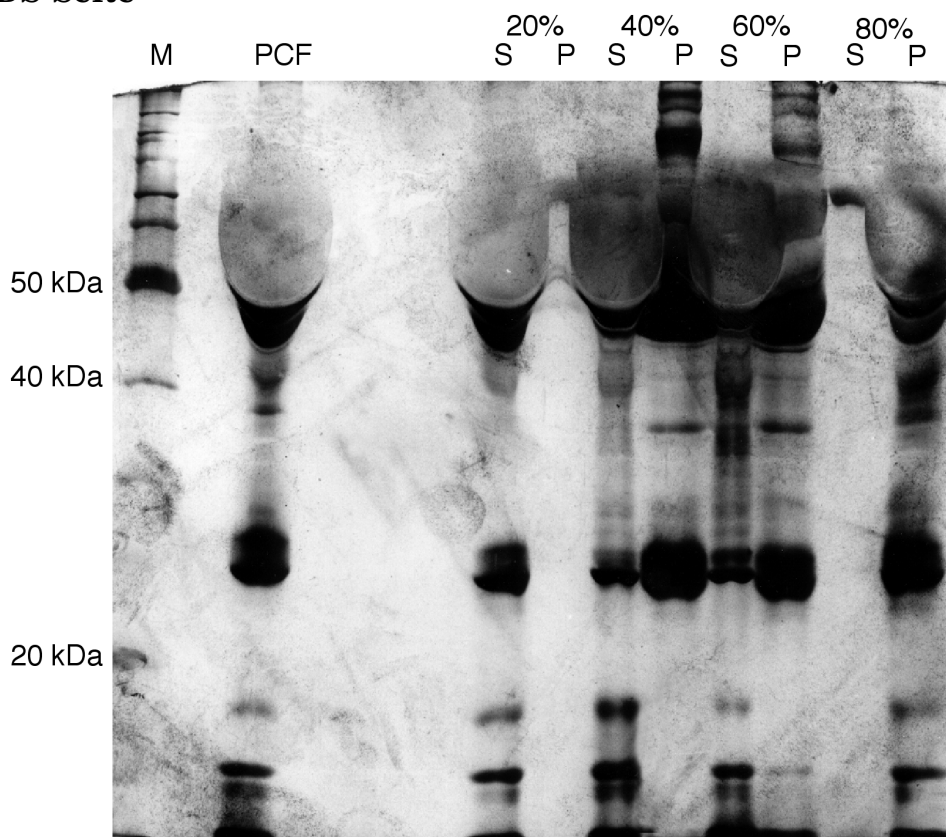


Abb. 10: Das SDS-Gel nach Auftrennung der verschiedenen durch die Salzpräzipitationen gewonnenen Fraktionen aus der Perikardflüssigkeit.

M: Marker, PCF: unaufgetrennte Perikardflüssigkeit als positive Kontrolle, S: Überstand, P: Präzipitat, S und P beziehen sich jeweils auf die darüberstehende Prozentzahl.

Während P 20% und S 80% kaum Proteine enthalten, spiegeln S 20% und P 80% fast das gesamte Spektrum der positiven Kontrolle wider. In den Fraktionen von 40% und 60% sind die Proteine jeweils auf Überstand und Präzipitat verteilt.

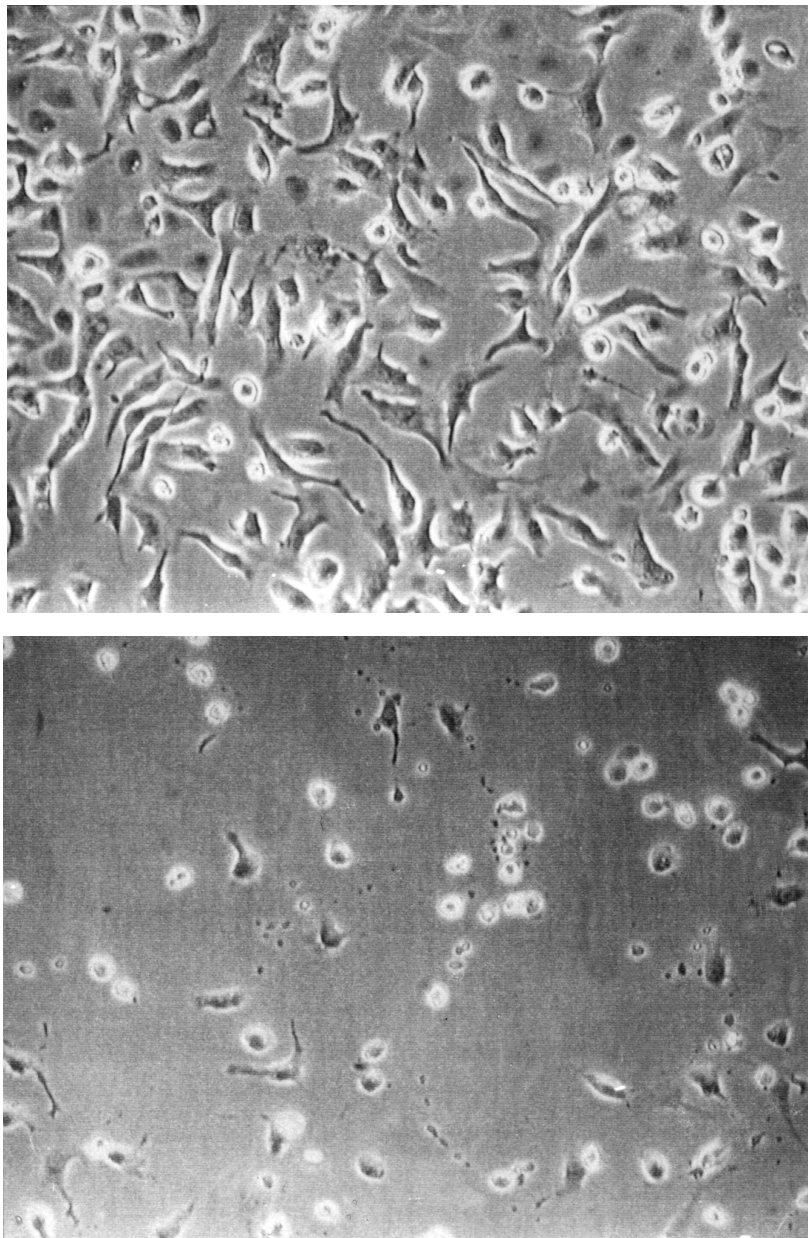
3.2.1.2. Versuch 1.2: Wirkung der Fraktionen auf die Myozyten

Abb. 11:

*oben: die neonatalen Myozyten zu Beginn des Versuches. Es sind lebende Myozyten ohne Zellkontakte zu den Nachbarzellen. Die Zellen kontrahieren nicht.
unten: negative Kontrolle: Zellen nach drei Tagen, ohne Zusatz von Nährstoffen oder Wachstumsfaktoren. Es sind kaum noch lebendige Zellen vorhanden.*

Ergebnis nach:	22 Stunden	46 Stunden	70 Stunden
Kontrolle	Zellausläufer werden dünner & z.T. unterbrochen	kaum noch lebendige Zellen	tote Zellen
PCF 5%	Zellen hypertrophieren stark, bilden Zellkontakte	Zellen hypertrophieren stark, bilden weitere Zellkontakte	Zellen stark hypertrophiert; flächenhafte Kontraktionen
20% SN	Zellen hypertrophieren	Zellen hypertrophieren, bilden Zellkontakte	Zellen hypertrophieren, bilden Zellkontakte, vereinzelte Kontraktionen
20% PR	Zellbild ähnelt der Kontrolle	Zellbild ähnelt der Kontrolle	Zellbild ähnelt der Kontrolle
40% SN	Zellen hypertrophieren, aber geringer als bei 20% SN	kaum Änderung	Wachstum vorhanden, aber Ausläufer werden dünner
40% PR	Zellbild ähnelt der Kontrolle	Zellausläufer werden dünner & z.T. unterbrochen	kaum noch lebende Zellen
60% SN	Wachstum vorhanden	Zellen werden dicker	Zellen werden noch dicker, Ausläufer bilden sich zurück
60% PR	Wachstum vorhanden	Zellen werden länger	Zellen bilden Ausläufer ähnlich den Nervenzellen
80% SN	Zellbild ähnelt der Kontrolle	Zellbild ähnelt der Kontrolle	Zellbild ähnelt der Kontrolle
80% PR	Zellen hypertrophieren	Zellen hypertrophieren stark, bilden Zellkontakte	Zellen stark hypertrophiert; flächenhafte Kontraktionen

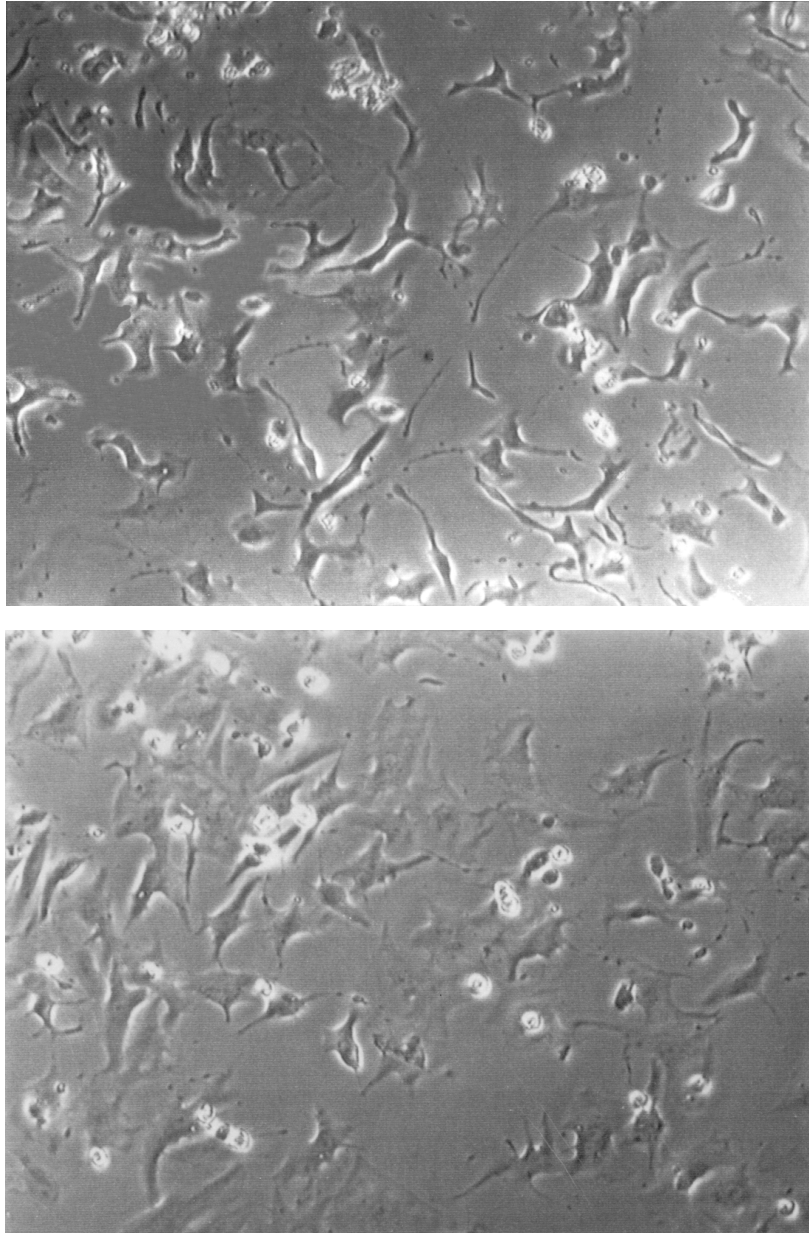


Abb. 12:

oben: Zellen, die mit 60% PR behandelt wurden, fotografiert nach 70 Stunden: Die Myozyten haben lange dünne Ausläufer gebildet, die den Ausläufern von Nervenzellen ähneln. Die Zellen sind vorrangig in die Länge gewachsen.

unten: Zellen, die mit 60% SN behandelt wurden, fotografiert nach 70 Stunden: Die Myozyten wachsen bevorzugt perinukleär in die Breite, zuvor gebildete Zellausläufer bilden sich zurück.

Fazit:

Es gibt verschiedene Wachstumsfaktoren für Längen- und Dickenwachstum, die sich bei 60% Salzkonzentration trennen lassen. Dabei ist der Faktor für das Dickenwachstum eher klein und hydrophil (da in 60% SN) und der für das Längenwachstum eher groß und lipophil (da in 60% PR).

3.2.2. Versuch 2: Auftrennung der Perikardflüssigkeit mit Hilfe einer Heparinsäule der HPLC

Es entstehen bei dieser Auftrennung 13 verschiedene Fraktionen (s. Abb. 13).

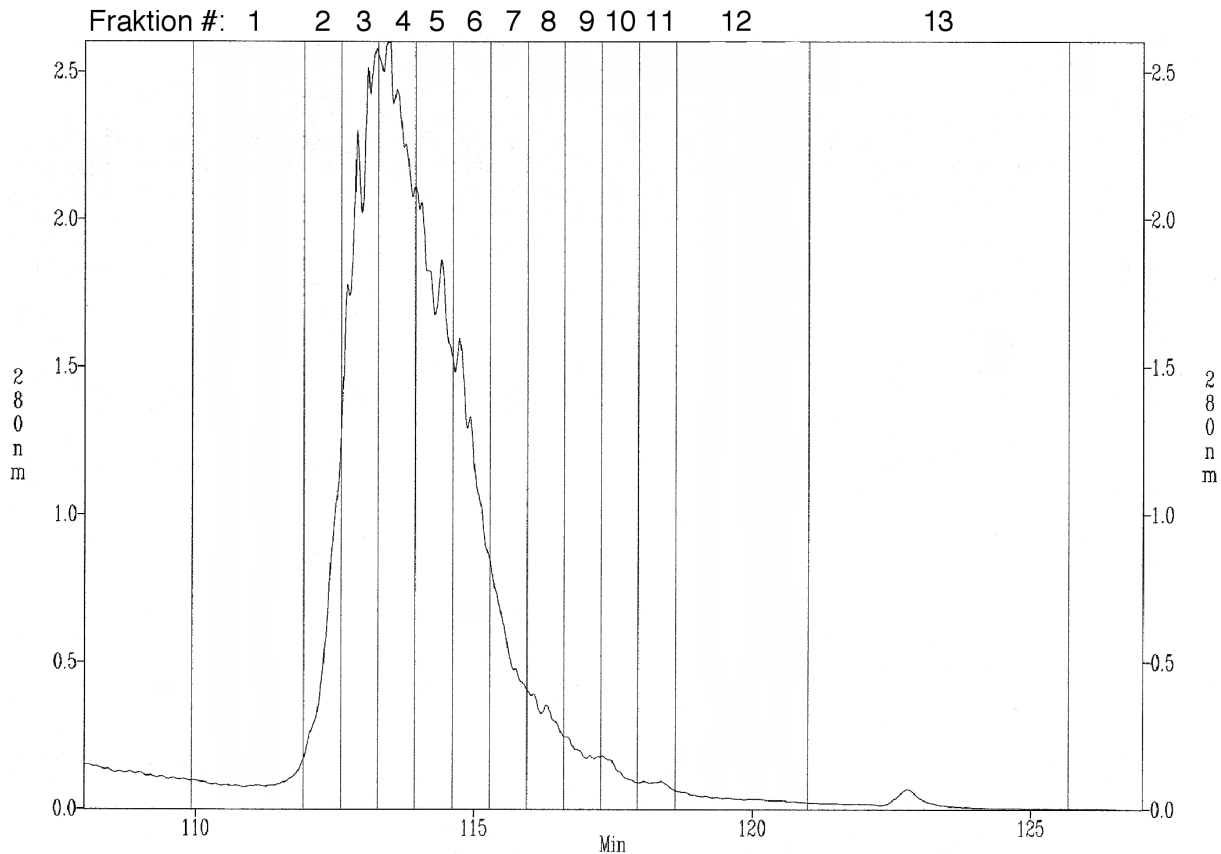


Abb. 13: Graph der Auftrennung der Perikardflüssigkeit mit Hilfe einer Heparinsäule der HPLC: Auf der x-Achse ist die Zeit, in der die verschiedenen Proteine wieder von der Heparinsäule gelöst werden, aufgetragen, während die y-Achse mit der Extinktion ein Maß für die zu der Zeit von der Säule gelöste Stoffmenge darstellt. Je früher die Proteine wieder von der Heparinsäule gelöst werden, desto geringer ist ihre Affinität zu Heparin. Die gewonnenen Proteine werden in 13 Fraktionen aufgetrennt. Die Fraktionen 2-11 beinhalten fast die Gesamtheit der heparinbindenden Proteine der Perikardflüssigkeit. Nur die Fraktion 13 enthält nochmals eine geringe Menge an besonders stark heparinbindenden Proteinen.

3.2.2.1. Versuch 2.1: Auftrennung der dreizehn Fraktionen mit Hilfe einer SDS-Seite

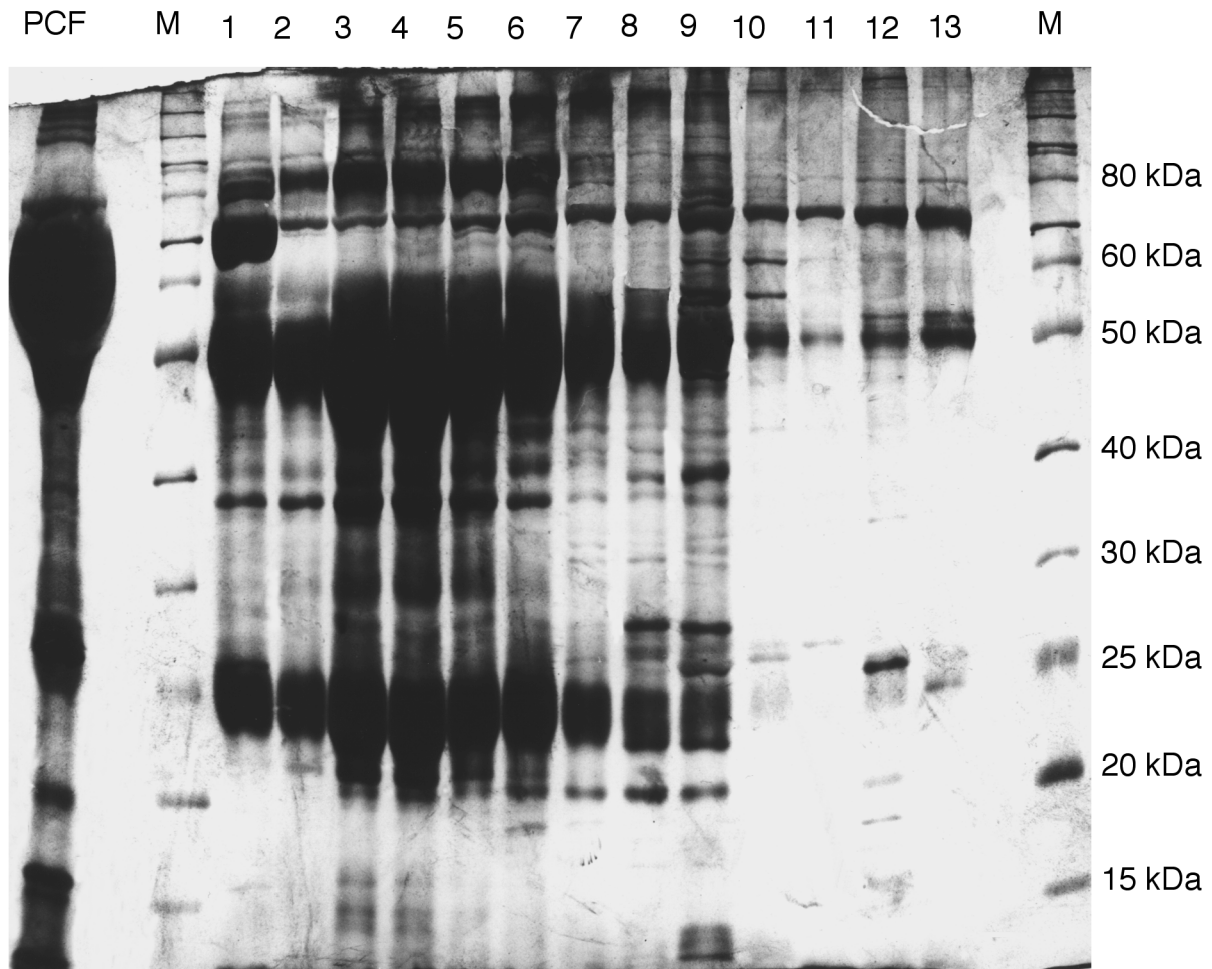


Abb. 14: Das SDS-Gel nach der Auftrennung der verschiedenen durch die Heparinsäule der HPCL gewonnenen Fraktionen aus der Perikardflüssigkeit. M: Marker, PCF: unaufgetrennte Perikardflüssigkeit als positive Kontrolle. Die Zahlen 1 bis 13 stehen für die 13 Fraktionen, in die die Proteine aufgetrennt wurden. Es ist zu erkennen, dass in der Perikardflüssigkeit Proteine mit unterschiedlichem Molekulargewicht vorhanden sind. Das Spektrum reicht von unter 10 kDa bis über 100 kDa. Der Hauptanteil der Proteine befindet sich im Bereich um 50 - 80 kDa. Die Hauptwirkung auf das Wachstum der Myozyten geht aber von der Fraktion #13 aus. Diese enthält hauptsächlich Proteine mit einem Molekulargewicht um 25 kDa sowie Proteine mit einem Molekulargewicht über 50 kDa.

3.2.2.2. Versuch 2.2: Untersuchung der Wirkung der Fraktionen auf neonatale Myozyten

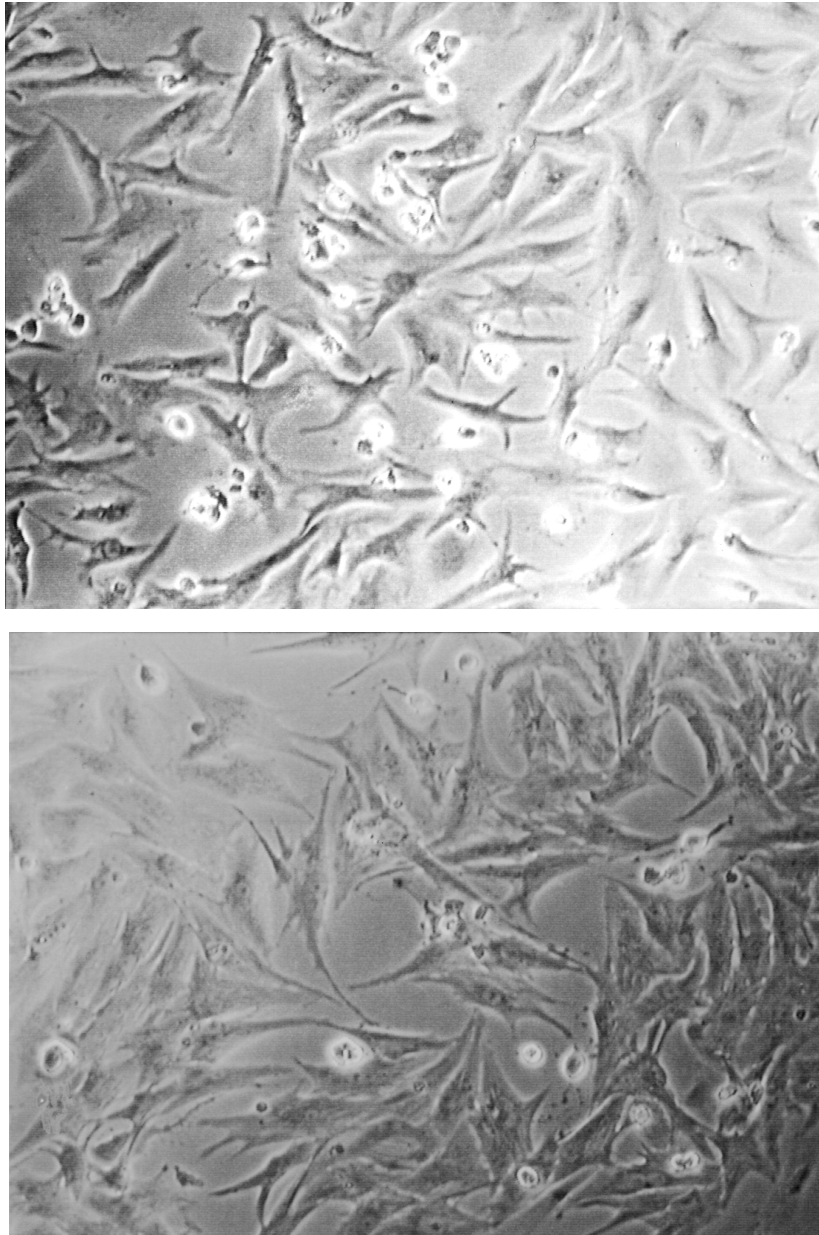


Abb. 15: Zellen nach drei Tagen, die mit der Fraktion 13 behandelt wurden (oben: es wurde 1 µl der Fraktion 13 hinzugegeben; unten: es wurden 3 µl hinzugegeben). Die Myozyten sind stark hypertrophiert, haben Zellausläufer gebildet und Zellkontakte zu anderen Zellen hergestellt. Die Zellen kontrahieren sich synchron flächenhaft.

Die Kontrollzellen überleben durchschnittlich ungefähr 24 Stunden. Die Zellen, die mit Perikardflüssigkeit behandelt wurden, überleben vier bis fünf Tage. Der Höhepunkt ihrer Entfaltung liegt am dritten Tag. Zu diesem Zeitpunkt sind sie stark hypertrophiert, haben Zellausläufer gebildet, die Kontakte zu anderen Zellen herstellen (siehe Abbildung) und kontrahieren sich synchron flächenhaft.

Die Zellen, die mit der Fraktion #13 dieser Auftrennungsreihe behandelt wurden, zeigen am dritten Tag die gleichen Eigenschaften wie die positiven Kontrollzellen, die mit der Perikardflüssigkeit selbst behandelt wurden. Die Zellen, die mit den restlichen Fraktionen behandelt wurden, gleichen hingegen am dritten Tag der negativen Kontrolle.

Da die Fraktion #13 die letzte Fraktion ist, die sich von der Heparinsäule löst, enthält sie diejenigen Proteine mit der höchsten Affinität zu Heparin. Verglichen mit zu den übrigen Fraktionen enthält diese Fraktion weniger Proteine.

3.2.3. Versuch 3: Auftrennung der Perikardflüssigkeit mit Hilfe eines Kationen-Anionen-Austauschers der HPLC bei verschiedenen pH-Werten der mobilen Phase

Diese stark heparinbindenden Proteine werden nun im Säuregradienten weiter aufgetrennt.

3.2.3.1. Versuch 3.1: Untersuchung der Wirkung der bei pH 5,5 aufgetrennten Fraktionen auf neonatale Myozyten

Bei dieser Auftrennung entstanden fünf verschiedene Fraktionen (s. Abb. 16).

Die Kontrollzellen überleben auch in diesem Versuch durchschnittlich 24 Stunden. Die Zellen, die mit Perikardflüssigkeit behandelt wurden, überleben vier bis fünf Tage. Die Zellen der positiven Kontrolle, die mit Perikardflüssigkeit behandelt wurden, verhielten sich wie unter Versuch 2.2 beschrieben.

Die Zellen, die mit der Fraktion #5 dieser Auftrennungsreihe behandelt wurden, zeigen am dritten Tag ähnliche Eigenschaften wie die positiven Kontrollzellen, die mit der Perikardflüssigkeit selbst behandelt wurden (s. Abb.17). Sie hypertrophierten zwar nicht im gleichen Ausmaß wie die Zellen der positiven Kontrolle, doch sie überlebten den dritten Tag und kontrahierten sich vereinzelt, während die Zellen, die mit den restlichen Fraktionen behandelt wurden, nach drei Tagen der negativen Kontrolle glichen.

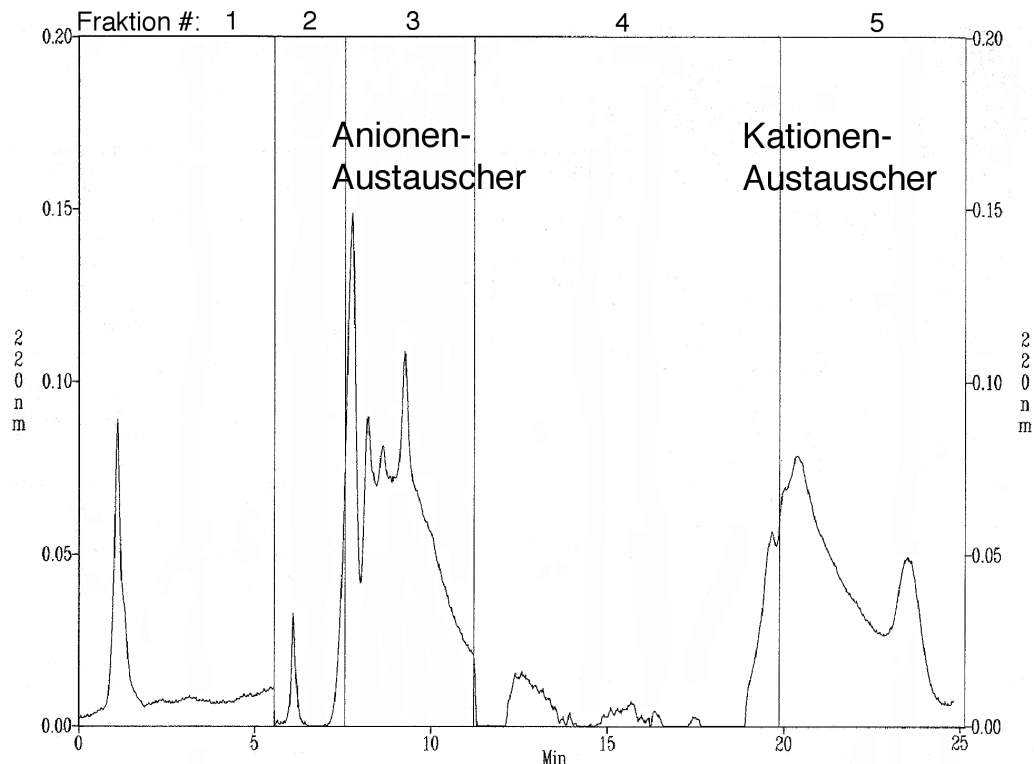


Abb. 16: Auftrennung der Perikardflüssigkeit mittels HPLC über einen Anionen-Kationen-Austauscher bei einem pH-Wert von 5,5:

Auf der x-Achse ist die Zeit, zu der die verschiedenen Proteine wieder von den Säulen gelöst werden, aufgetragen, während die y-Achse mit der Extinktion ein Maß für die von der Säule gelösten Stoffmenge darstellt. Die gewonnenen Proteine werden in fünf Fraktionen aufgetrennt. Aufgrund der Versuchsanordnung werden beim Abwaschen der Proteine von den Säulen zuerst die Proteine vom Anionenaustauscher abgewaschen. Diese befinden sich größtenteils in Fraktion #3. Die folgenden Proteine, die am Kationenaustauscher gebunden waren, befinden sich größtenteils in Fraktion #5.

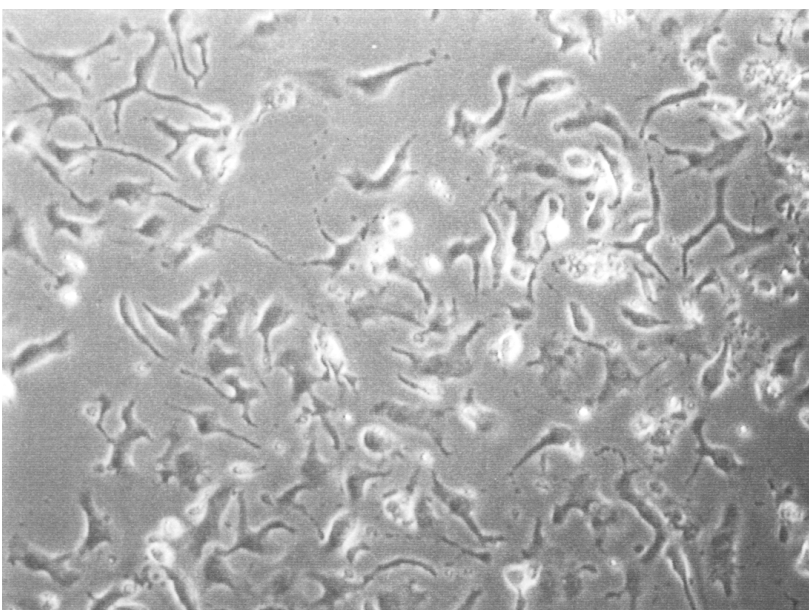


Abb. 17: Die Myozyten, die mit der Fraktion #5 dieses Versuches behandelt wurden nach drei Tagen: Sie zeigen ähnliche Eigenschaften, wie die positiven Kontrollzellen, die mit der Perikardflüssigkeit selbst behandelt wurden. Vereinzelt kontrahieren sich die Myozyten.

3.2.3.2. Versuch 3.2: Untersuchung der Wirkung der bei pH 6,5 aufgetrennten Fraktionen auf neonatale Myozyten

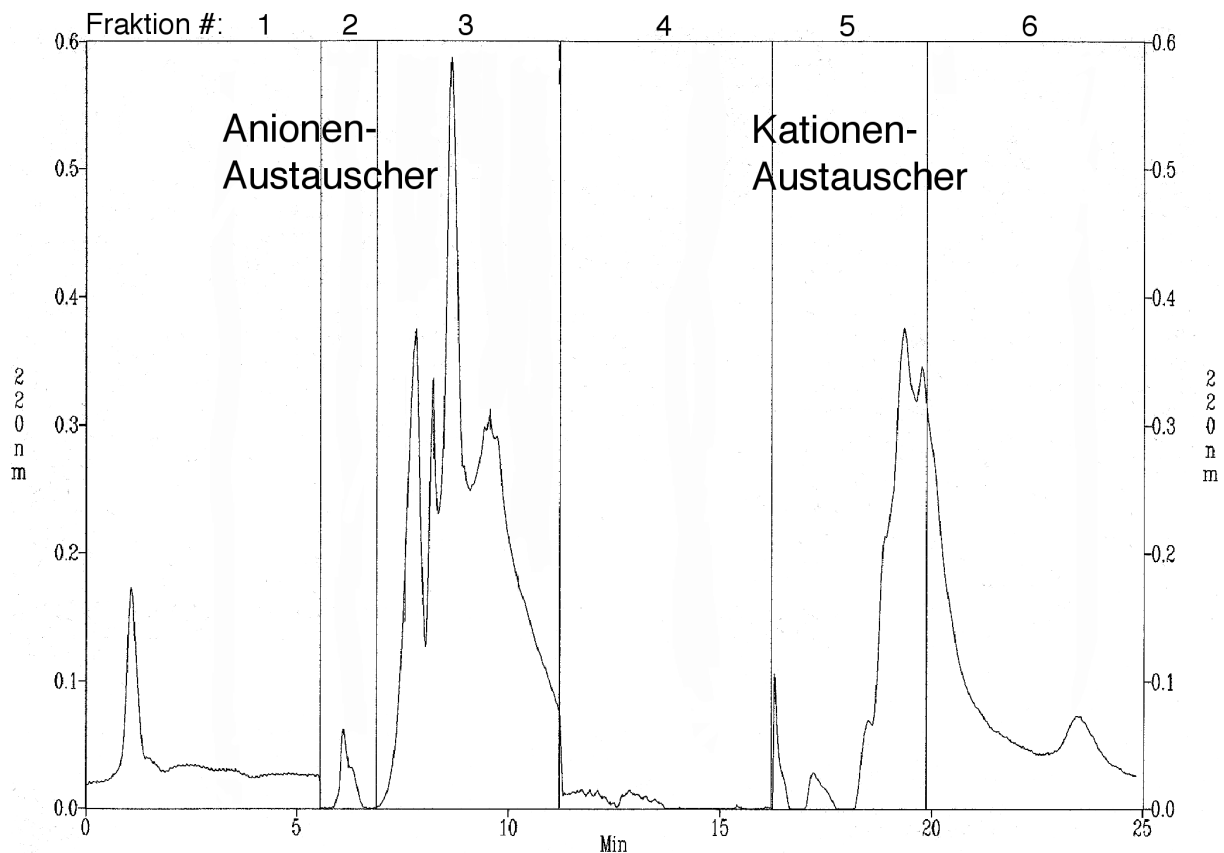


Abb. 18: Auftrennung der Perikardflüssigkeit mittels HPLC über einen Anionen-Kationen-Austauscher bei einem pH-Wert von 6,5:

Auf der x-Achse ist die Zeit, zu der die verschiedenen Proteine wieder von den Säulen gelöst werden, aufgetragen, während die y-Achse mit der Extinktion ein Maß für die von der Säule gelöste Stoffmenge darstellt. Die gewonnenen Proteine werden in sechs Fraktionen aufgetrennt. Aufgrund der Versuchsanordnung werden beim Abwaschen der Proteine von den Säulen zuerst die Proteine vom Anionenaustauscher abgewaschen. Diese befinden sich größtenteils in Fraktion #3. Die folgenden Proteine, die am Kationenaustauscher gebunden waren, befinden sich größtenteils in den Fraktionen #5 und #6.

Bei dieser Auftrennung entstanden sechs verschiedene Fraktionen (s. Abb. 18). Das Ergebnis dieses Versuches unterscheidet sich von dem Ergebnis des Versuches 3.1 darin, dass es zwei verschiedene Fraktionen gab, die das Überleben der Myozyten verlängern konnten. Die Zellen, die mit der Fraktion #3 beziehungsweise mit der Fraktion #6 dieses Versuches behandelt wurden, hypertrophierten, überlebten den dritten Tag und kontrahierten vereinzelt (s. Abb. 19 und 20). Die Zellen jedoch, die mit den restlichen Fraktionen behandelt wurden, glichen am dritten Tag der negativen Kontrolle. Es gibt also mehrere Substanzen in dieser Probe, die einen wachstumsfördernden Effekt auf die Myozyten ausüben.

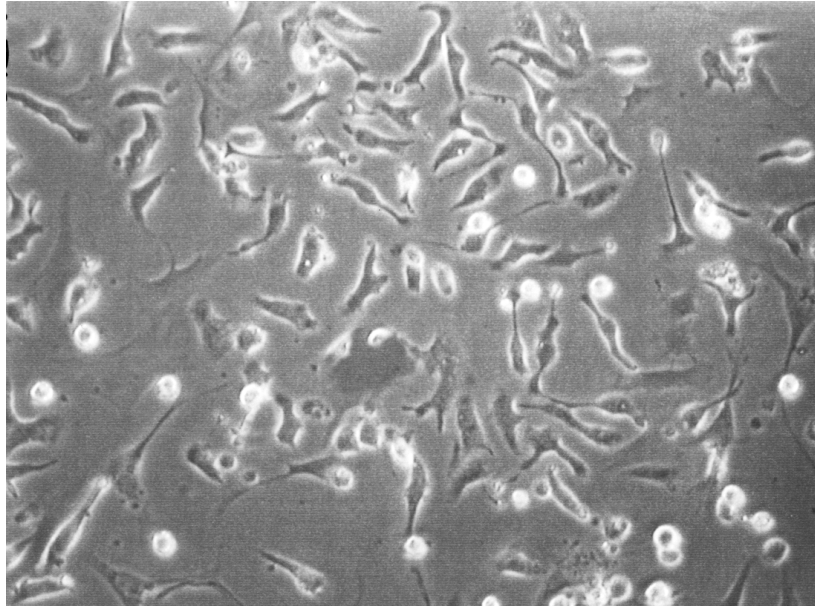


Abb. 19: Die Myozyten, die mit der Fraktion #3 (Anionenaustauscher) behandelt wurden nach drei Tagen: Die Zellen hypertrophierten, überlebten den dritten Tag und kontrahierten vereinzelt.

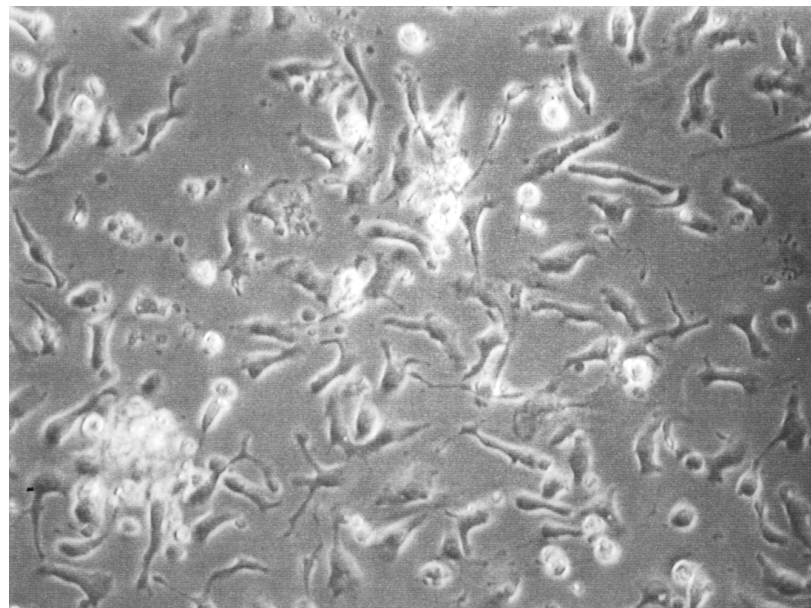


Abb. 20: Die Myozyten, die mit der Fraktion #6 dieses Versuches (Kationenaustauscher) behandelt wurden nach drei Tagen: Die Zellen hypertrophierten, überlebten den dritten Tag und kontrahierten vereinzelt.

3.2.3.3. Versuch 3.3: Auftrennung der elf Fraktionen aus den Versuchen 3.1 und 3.2 mit Hilfe einer SDS-Seite

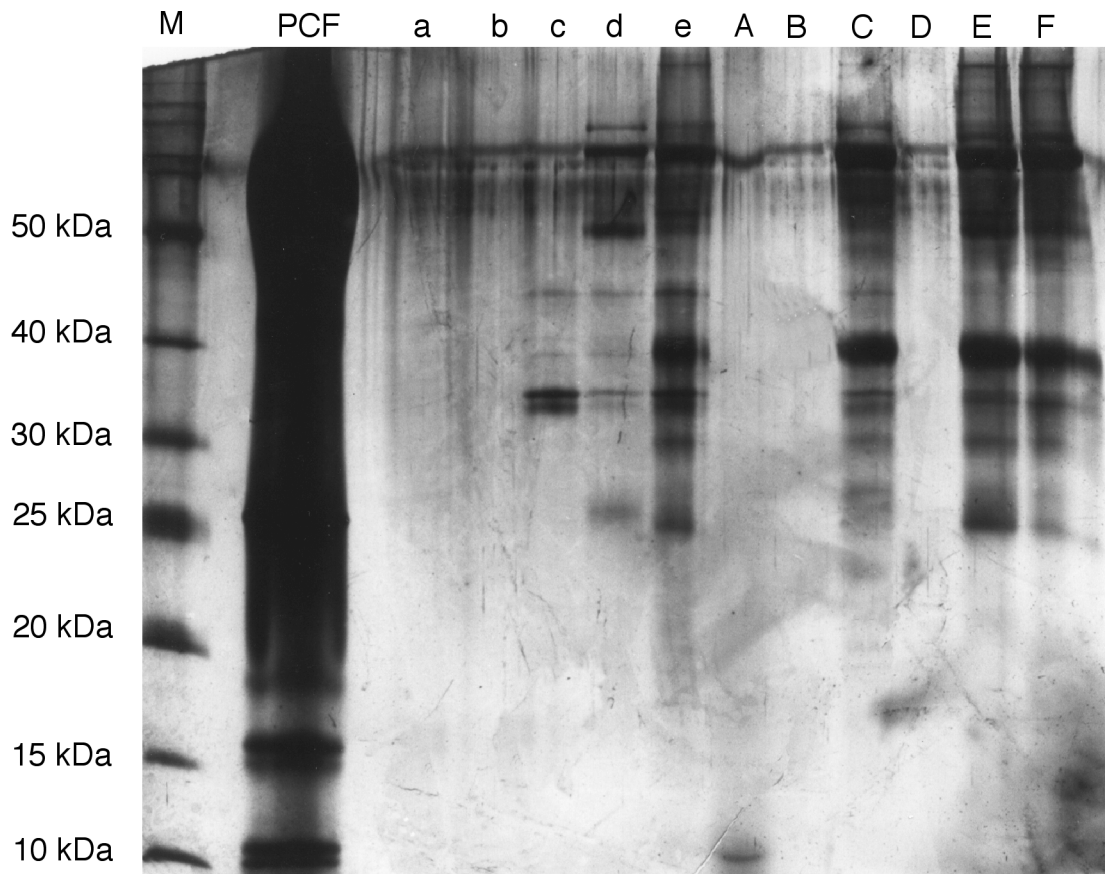


Abb. 21: Das SDS-Gel der Auftrennung der verschiedenen durch den Anionen-Kationen-Austauscher per HPLC gewonnene Fraktionen aus der Perikardflüssigkeit. Die Buchstaben a-e entsprechen den Fraktionen #1-5 aus Versuch 3.1 bei pH 5,5, die Buchstaben A-F den Fraktionen #1-6 aus Versuch 3.2 bei pH 6,5. M: Marker, PCF: unaufgetrennte Perikardflüssigkeit als positive Kontrolle.

Die Auftrennung der Proben des Versuchs 3.1 mit Hilfe der SDS-Seite (s. Abb. 21) zeigt, dass in diesem Versuch die Fraktion #5, die als einzige Fraktion einen hypertrophischen Einfluß auf die Myozyten ausübte, auch diejenige ist, die die meisten Proteine enthält. Der Hauptanteil der Proteine dieser hat ein Molekulargewicht um und oberhalb 25 kDa.

Die Auftrennung der Proben des Versuchs 3.2 zeigt, dass der Hauptanteil der Proteine, die mittels des Anionen-Kationen-Austauscher bei pH 6,5 aufgetrennt wurden, sich in den drei Fraktionen #3, #5 und #6 befinden. Davon zeigen aber nur zwei Fraktionen, nämlich Fraktion #3 und #6 wachstumsfördernde Wirkung auf Kardiomyozyten. Auch in diesem Versuch befindet sich der Hauptanteil des Molekulargewichts dieser zwei Fraktionen um und oberhalb 25 kDa.

4. Diskussion

Die Perikardflüssigkeit gehört zu den am wenigsten untersuchten Flüssigkeiten des menschlichen Körpers. In den heute gängigen Lehrbüchern der Pathologie tritt der Begriff nur am Rande auf und man findet sehr wenig Information darüber. Die Perikardflüssigkeit wird lediglich als Gleitmittel für das Herz im Herzbeutel beschrieben. Ihr Volumen beträgt durchschnittlich 30 ml. Von einem Perikarderguss (Hydroperikard) spricht man ab einem Volumen von 150 ml. Er kann als Transsudat im Zusammenhang mit allgemeinen Ödemen, die zum Beispiel durch Rechtsherzinsuffizienz, Niereninsuffizienz oder Hypalbuminämie entstehen, auftreten. Es gibt jedoch keine Einteilungskriterien, wie es sie z.B. für den Pleuraerguss gibt, die die genaue Unterscheidung zwischen Transsudat und Exsudat erlauben ¹⁻³.

Klinische Bedeutung gewinnt die Perikardflüssigkeit nur im Zusammenhang mit akut auftretenden Herzbeuteltamponaden ⁴⁻⁶.

Das Gewinnen von Perikarderguss über eine Punktion (mit langer Kanüle, im Winkel zwischen Processus Xyphoideus und dem linken Rippenansatz) ist mit Risiken verbunden, die diesen Eingriff am Menschen ohne therapeutischen Nutzen nicht rechtfertigen. Erst seit Operationen am offenen Herzen möglich sind und auch routinemäßig durchgeführt werden, ist es möglich geworden, Perikardflüssigkeit ohne zusätzliches Risiko für den Patienten zu entnehmen. Dadurch sind die Voraussetzungen für Analysen humaner Perikardflüssigkeit gegeben. Bis heute sind jedoch sehr wenige Daten über Versuche an menschlichen Perikardergüssen vorhanden, auch wenn das wissenschaftliche Interesse zuzunehmen scheint. Da es aber nach wie vor ethisch unvertretbar ist, Perikardflüssigkeit gesunder Testpersonen zur Bildung einer Kontrollgruppe zu entnehmen, bleiben die Untersuchungsergebnisse der Perikardflüssigkeit immer begrenzt aussagekräftig und können nur im Vergleich mit anderen Körperflüssigkeiten oder vergleichend innerhalb von Patientengruppen beurteilt werden.

Maurer et al. waren 1940 die erste Gruppe, die sich intensiv mit dem Perikarderguss auseinandersetzte. Diese Autoren beschrieben die Variationsbreite der Volumina und des Proteingehalts von Ergüssen von verschiedenen Tieren, sowie von 12 posthum entnommenen menschlichen Perikardergüssen von Patienten mit letal verlaufenden Krankheiten. Sie stellten fest, dass der gemessene Verteilungsquotient für Chlorid, dem, unter der Voraussetzung, dass Perikardflüssigkeit ein passives Ultrafiltrat von Plasma sei, errechneten sehr nahe kam ⁷. Geinitz und Hobitz untersuchten 1958 mittels Papierelektrophorese die Eiweißzusammensetzung menschlicher Perikardflüssigkeit und verglichen sie mit

Serum. Sie zeigten, dass die Eiweißfraktionen der Perikardflüssigkeit denen des Serums qualitativ nicht gleichen, sondern dass in der Perikardflüssigkeit die niedermolekularen Anteile der entsprechenden Serumeiweißfraktion wesentlich überwiegen. Dabei besteht kein Unterschied zwischen den Ergebnissen bei Patienten mit ungestörtem Eiweißhaushalt und solchen mit pathologischen Bluteiweißbefunden⁸. Hutchin et al. untersuchten die Elektrolyt- und pH-Verhältnisse der Perikardflüssigkeit. Sie fanden in der Perikardflüssigkeit einen niedrigeren CO₂-Druck, einen höheren Bikarbonatspiegel und höhere pH-Werte, verglichen mit den Werten des Serums, und schlossen daraus, dass die Perikardflüssigkeit, im Gegensatz zu Blut, ein eigenes Kohlendioxid-Bikarbonatpuffersystem aufweist, das respiratorischen und metabolischen Schwankungen unterliegt⁹.

1977 haben Gibso und Segal¹⁰ die Perikardflüssigkeiten verschiedener Tiere untersucht und gezeigt, dass Perikardflüssigkeit in Bezug auf ihre Ionenverhältnisse und die Größe der Proteine ein passives Plasmaultrafiltrat darstellt unabhängig von der Spezies.

Heute weiß man jedoch, dass dieses Plasmaultrafiltrat noch mit verschiedenen Substanzen wie Atrial Natriuretic Factor, Prostaglandinen und Wachstumsfaktoren angereichert ist¹¹⁻¹³. Die Zusammensetzung und Menge dieser Substanzen in der Perikardflüssigkeit ist unter anderem abhängig von der Erkrankung des Patienten. Zum Beispiel konnte für bFGF gezeigt werden, dass seine Konzentration in Ergüssen von Patienten mit ischämischen Herzleiden höher ist als bei Patienten ohne Ischämie¹¹.

Die Sekretion dieser Substanzen geht vom Endokard und vom Endothel der Herzkranzgefäße^{14,15}, aber auch von mesothelialen Perikardzellen¹⁶ aus, die so Einfluß auf die Gestalt, Kontraktilität und Wachstum des Myokards nehmen¹⁷.

Zu diesen Stoffen zählen zum Beispiel Endothelin-1 und Stickstoffmonoxid aber auch andere, noch unerforschte Mediatoren.

Es ist also offensichtlich, dass die Perikardflüssigkeit viel mehr ist als nur ein Transsudat. Sie könnte, wenn man sie richtig zu deuten vermag, ein Spiegel für die Geschehnisse im Myokard sein sowie neue Diagnosemöglichkeiten eröffnen, vor allem aber auch Therapiemöglichkeiten bieten, die, da sie direkt lokal ansetzen, bei schnellerem Wirkeintritt weniger systemische Nebenwirkungen haben könnten. Dickson et al.¹⁸ haben aus diesen Gründen begonnen, eine Datenbank für Perikardergüsse anzulegen. In ihren Messungen gehen sie jedoch nicht auf die Rolle der Interleukine in diesen Prozessen ein.

In dieser Arbeit soll untersucht werden, ob die Perikardflüssigkeit Krankheitsgeschehnisse zuverlässig reflektieren kann. Das heißt, ob die spezifische Zusammensetzung von Faktoren in der Perikardflüssigkeit von den unterschiedlichen Krankheitsbildern der Patienten eindeutig beeinflusst ist. Weiterhin soll geklärt werden, ob diese Faktoren einen direkten Einfluß auf die Kardiomyozyten haben und wenn ja, welchen.

Für die Untersuchungen wurden Myozyten von neonatalen Ratten verwendet, da diese noch nicht ausdifferenziert sind und im Vergleich zu adulten schneller auf Reize reagieren. Zudem sind sie anspruchsloser und damit einfacher im Umgang. Es wird davon ausgegangen, dass Faktoren, die keine Wirkung auf neonatale Myozyten haben, auch nicht auf adulte wirken. Ob diese Aussage auch umgekehrt gilt, muss für die einzelnen Faktoren gesondert geprüft werden.

Daher wurde die Wirkung der gepoolten Perikardflüssigkeit sowie die Wirkung der einzelnen Fraktionen der Perikardflüssigkeit nach deren Auftrennung mit Hilfe verschiedener Methoden auf die Myozyten geprüft.

Die neonatalen Myozyten, die ohne Perikardflüssigkeitszusatz nach 70 Stunden tot waren, begannen nach Zusatz von Perikardflüssigkeit zu hypertrophieren, bildeten Zellkontakte aus, kontrahierten flächenhaft und überlebten länger. Unter den Auftrennungsmethoden brachte die einfachste die eindeutigsten Ergebnisse hervor. Die Salzpräzipitation zeigte, dass innerhalb der Perikardflüssigkeit Faktoren vorhanden sind, die das Längen- und andere, die das Dickenwachstum der Zellen bewirken. Diese lassen sich bei 60% Salzgehalt auftrennen, während die Kontraktion eher durch das Zusammenspiel der verschiedenen Faktoren bewirkt wird, da sie nur bei Zusatz der gepoolten Perikardflüssigkeit oder bei Zusatz von Fraktionen, die einen weitaus überwiegenden Teil der Perikardflüssigkeit enthielten (20% SN, 80% PR), auftrat.

Die Auftrennung der Perikardflüssigkeit mit Hilfe der HPLC über eine Heparinsäule erlaubt zwar keine Aussage über die Faktoren für Dicken- und Längenwachstum, zeigt aber, dass eine sehr stark heparinbindende (lipophile) Fraktion der Perikardflüssigkeit den gleichen Effekt wie die Perikardflüssigkeit selbst auf die Myozyten hat. Eine solche Beobachtung ist in der Literatur bisher nicht beschrieben.

Die Aufteilung dieser aktiven heparinbindenden Fraktion mit Hilfe der HPLC über eine Anionen-Kationenaustauschersäule bei verschiedenen pH-Werten zeigte, dass diese Fraktion in zwei aktive Fraktionen aufzuteilen war. Diese wurden bei pH 6,5 getrennt, einmal an der Anode und einmal an der Kathode gebunden, während sie

bei pH 5,5 noch gemeinsam an der Kathode gebunden waren. Kontraktion fand bei beiden Versuchen nicht statt.

Aus diesen vorläufigen Versuchen läßt sich also deutlich schließen, dass die Perikardflüssigkeit aktive Faktoren enthält, welche direkten Einfluß auf die Myozyten ausüben. Weiterhin kann dieser Einfluß differenziert werden. Im Fall der hypertrophischen Wirkung z.B. in Längen- und Dickenwachstum.

Diese Differenzierungsmöglichkeit könnte im Rahmen der kompensatorischen Herzhypertrophie in Zusammenhang mit Herzinsuffizienz eine Rolle spielen. Eine Volumenbelastung, wie sie beispielsweise bei Klappeninsuffizienzen auftritt, führt zu einer exzentrischen Hypertrophie des Herzens. Das heißt, es findet eine Hypertrophie mit Dilatation statt. Hierbei überwiegen wohl die Faktoren, die das Längenwachstum der Myozyten bewirken. Die Faktoren, die das Dickenwachstum der Myozyten bewirken, überwiegen eher bei der konzentrischen Hypertrophie. Diese Hypertrophieform entsteht unter Druckbelastung des Herzens z.B. durch Klappenstenosen oder Hypertonie. Es ist eine Hypertrophie ohne Dilatation.

Auch Corda et al. zeigten, dass die Perikardflüssigkeit von Patienten mit verschiedenen Herzerkrankungen einen größeren trophischen Effekt auf Kardiomyozyten hat als Serum. Weiterhin fanden sie heraus, dass dieser Effekt von weiteren Faktoren als nur von bFGF (basic fibroblast growth factor) verursacht wurde, wobei sie diese nicht weiter spezifizierten ¹².

Es stellt sich demnach die Frage, welche Faktoren dafür in Frage kommen. Für einige Zytokine, vor allem TNF- α , wurde gezeigt, dass ihr biologischer Effekt in hohen Konzentrationen mit vielen pathologischen Umwandlungsprozessen im Rahmen von kongestivem Herzversagen, wie linksventrikuläre Dysfunktion und Remodelling, Kardiomyopathie, Abnormitäten im myokardialen Metabolismus, übereinstimmt und diese damit erklärt werden könnten ^{19,20}. Weiterhin gibt es einige Studien, die nahelegen, dass der Grad der Zytokinkonzentration im Serum mit dem Schweregrad des Krankheitsprozesses in direktem Zusammenhang steht ²¹⁻²⁴. Für TNF- α konnte sogar eine direkte Korrelation mit der Schweregradeinteilung der Herzinsuffizienz nach der NYHA gezeigt werden ²⁵.

Anhand des Endothelin-1 haben Horkey et al. gezeigt, dass die Konzentrationen der Faktoren in der Perikardflüssigkeit nicht denen des Interstitiums der Myokardzellen entsprechen ²⁶. Sie scheinen eigenen Regelmechanismen zu unterliegen.

Zur Zeit ist der Mechanismus, mit dem vom Myokard gebildete physiologisch aktive Substanzen freigesetzt werden, unklar. Diese Substanzen, die ins Interstitium

ausgeschieden werden, könnten durch das Kapillarnetzwerk in den Sinus coronarius fließen oder aber über die Lymphwege in das Spatium Pericardii gelangen^{27,28}. Wenn also eine Hauptquelle zur Sezernierung dieser Substanzen das Myokard selbst ist, wirken sie wohl auch auto- und parakrin auf lokaler Ebene, sodass es nicht ausreicht, aufgrund der Werte im Kreislauf Aussagen zu machen. Es liegt nahe zu prüfen, ob und in welchen Mengen Zytokine und verwandte Substanzen in der Perikardflüssigkeit vorhanden sind und ob sie einen Effekt auf die Myozyten ausüben.

Der Begriff Zytokine umfaßt eine kleine Gruppe von kleinen niedermolekularen Proteinen und Polypeptiden, die als Antwort auf bestimmte Reize von Zellen abgesondert werden. Während man lange Zeit davon ausging, dass besonders die proinflammatorischen Zytokine Mediatoren und Produkte des Immunsystems sind, weiß man heute, dass alle kernhaltigen Zellen Zytokine produzieren können²⁹. Das bedeutet, dass Zytokine im Perikarderguß von lokalen Myokardzellen wie Myozyten, Endothelzellen, Fibroblasten etc., als Reaktion auf Streß, wie zum Beispiel Ischämie oder Ventrikeldruckanstieg, produziert werden können, ohne jegliche Beteiligung des Immunsystems.

Die Beziehung von antiinflammatorischen Zytokinen zu Herzleiden ist in der Literatur wenig beschrieben.

4.1. Endothelin-1

Endothelin wurde 1988 erstmals beschrieben³⁰. Gegenwärtig sind drei strukturell und pharmakologisch verschiedene Isopeptide (Endothelin-1, Endothelin-2, Endothelin-3) bekannt, die jeweils auf anderen Chromosomen kodiert sind. Dabei spielt Endothelin-1 die größte Rolle für das menschliche Herzkreislaufsystem^{31,32}.

Es ist ein Polypeptid, bestehend aus 21 Aminosäuren (AS). Es entsteht durch Spaltung von Preproendothelin-1 (212 AS), in Groß-Endothelin-1, bestehend aus 38 AS, welches wiederum durch Endothelin-Converting-Enzyme (ECE) in das eigentliche Endothelin-1 gespalten wird^{33,34}.

Endothelin-1 wird hauptsächlich in den Endothelzellen des Menschen synthetisiert, wo es auch in sekretorischen Vesikeln gespeichert werden kann³⁵. Weiterhin ist es in Kardiomyozyten vorhanden und zwar sowohl in gesunden als auch in erkrankten³⁶. Es ist ein potenter Vasokonstriktor, dessen Synthese beziehungsweise Ausschüttung von folgenden Faktoren eingeleitet wird: Angiotensin II³⁷, Katecholaminen, Entzündungsmediatoren³⁸, Hypoxie^{39,40} und Stress⁴¹, sowie Thrombin, Transforming Growth Factor und Interleukin-1⁴². Sein

Antagonist ist Stickstoffmonoxid (NO), das auch in Endothelzellen synthetisiert wird ⁴³.

Bei Probanden wurden in aufrechter Körperhaltung höhere Endothelinwerte im Plasma gemessen als in liegender Position ^{44,45}. Whitson et al. ⁴⁶ zeigten, dass diese Beobachtung auch für die Werte im Sputum gilt. Orthostatischer Stress hat demnach einen Effekt auf die Endothelinsekretion.

Zur Zeit sind drei Rezeptorsubtypen bekannt: ET_A, ET_B und ET_C. Für unsere Untersuchungen an Myozyten spielen die ET_A-Rezeptoren eine Rolle, da sie hauptsächlich auf der Oberfläche der Kardiomyozyten und den glatten Muskelzellen der Gefäße vorkommen ⁴⁷. Diese können nochmals abhängig von ihrem Bindungsvermögen an den Antagonisten BQ123 in ET_{A1} und ET_{A2} unterteilt werden ⁴⁸. Die ET_B sind vorzugsweise auf den Endothelzellen und auch auf den glatten Muskelzellen der Gefäße vorhanden ⁴⁹. Sie sind unter anderem für die Beseitigung von Endothelin und damit für die interzelluläre Konzentrations-senkung verantwortlich ⁵⁰. Auch sie können nochmals unterschieden werden in ET_{B1}, das eine Vasodilatation durch das Freisetzen von NO bewirkt und ET_{B2}, das vasokonstriktorisch wirkt ⁴⁸. Über die Existenz und Funktion eines dritten geklonten ET_C-Rezeptors wird noch diskutiert ⁵¹.

Die Rezeptordichte kann durch Endothelin-1 selbst gesenkt werden ⁵², während Ischämie oder Herzversagen diese erhöht ^{53,54}. Es konnte sogar gezeigt werden, dass die ECE mRNA im Vorhofgewebe von Patienten nach einem Myokardinfarkt höher ist als zuvor ⁵⁵.

An Kardiomyozyten wirkt Endothelin-1 vor allem über den ET_A-Rezeptor positiv inotrop ⁴³ und bewirkt eine Hypertrophie sowie die Produktion von Typ IV Kollagen durch Fibroblasten. Auf Kardiomyozyten in Kultur hat es einen zytotoxischen Effekt ⁵⁶. Es wird angenommen, dass Endothelin-1 in der Lage ist, das genetische Profil der Myokardzellen zu verändern und die Expression eines größeren Phänotyps mit einer veränderten Anordnung der Myofibrillen zu induzieren ⁵⁷.

Plasmakonzentrationen von Endothelin-1 werden durch eine wirksame medikamentöse Therapie der chronischen Herzinsuffizienz erniedrigt ⁵⁸.

Endothelin wird, wie der Name schon sagt, vor allem durch Endothelzellen gebildet. Seine parakrine Wirkung auf Myozyten spricht für eine „Endothel-regulierte Hypertrophie“. Aber auch eine autokrine Bildung durch Kardiomyozyten selbst ist beschrieben. Laut Fujita et al. ⁵⁹ ist es unklar, ob die bei myokardgeschädigten Personen erhöhten Endothelinspiegel systemisch von Endothelzellen oder vom geschädigten Myokard selbst gebildet werden. Aufgrund der hier vorliegenden

Resultate ist es wahrscheinlich, dass beide Zelltypen Endothelin produzieren können. Direkte Untersuchungen unter Verwendung von spezifischen Antikörpern sind nötig, um diese Frage endgültig zu klären.

Die vasokonstriktorische Wirkung des Endothelin ist in Bezug auf das erhöhte Bedürfnis der hypertrophierten Kardiomyozyten an Sauerstoff ungünstig. Es könnte aber durch die pro-angiogene Wirkung des Endothelin⁶⁰ aber auch des MCP-1 (s. unten), das in hohen Konzentrationen in der Perikardflüssigkeit nachgewiesen werden konnte, kompensiert werden. In dieser Hinsicht unterstützen sich Endothelin und MCP-1.

Intrapericardial appliziertes Endothelin bewirkte bei Hunden zwar eine subepikardiale Ischämie, bedingt durch den vasokonstriktorischen Effekt, jedoch wird parallel auch kardioprotektive Mechanismen in den epimyokardialen Schichten in Gang gesetzt, deren Effekte letztendlich überwiegen⁶¹.

In der Perikardflüssigkeit wurden aber auch wirksamere angiogene Faktoren wie „basic fibroblast growth factor“ (bFGF), „acidic fibroblast growth factor“ (aFGF) und „vascular endothelial growth factor“ (VEGF) in höheren Konzentrationen gemessen^{11,62,63}, die sicherlich in diesem Zusammenhang mitwirken.

Horkay et al.²⁶ zeigten als erste das Vorhandensein von Endothelin-1 in der Perikardflüssigkeit. Sie verglichen es mit anderen Körperflüssigkeiten und fanden heraus, dass in der Perikardflüssigkeit die bei weitem höchsten Konzentrationen gefunden werden können.

Die Messungen der Endothelin-1-Konzentration in der Perikardflüssigkeit bezogen auf die verschiedenen Gruppen haben gezeigt, dass die Konzentration bei Patienten mit einem Herzklappenfehler, deren Herzen noch nicht dekompensiert sind, besonders hoch ist, während sie bei herzinsuffizienten Patienten um ein Vielfaches niedriger ist. Dies hat wahrscheinlich mit der hypertrophischen Wirkung des Endothelin-1 zu tun.

Verschiedene Ursachen und Grunderkrankungen können letztendlich zu einer chronischen Herzinsuffizienz führen. Diese schädlichen Einflüsse lassen sich in zwei Arten der Mehrbelastung des Herzens einteilen: erstens in eine Volumenbelastung, die z.B. durch Klappeninsuffizienzen bewirkt wird und zweitens eine Druckbelastung, die bei Klappenstenosen oder Hypertonie auftreten kann. Die Volumenbelastung führt kompensatorisch zu einer exzentrischen Hypertrophie, während die Druckbelastung zur konzentrischen Hypertrophie des Herzens führt. Überschreitet nun diese kompensatorische Myokardhypertrophie das kritische Herzgewicht von ca. 500 g, so kommt es zu einer Verschlechterung der

Herzleistung. Es entwickelt sich eine relative Koronarinsuffizienz mit Abnahme der Leistungsfähigkeit des Herzens und es kommt zu einer Gefügedilatation des Herzens.

Versagen nun die physiologischen oder auch therapeutischen Kompensationsmöglichkeiten zur Aufrechterhaltung einer ausreichenden Pumpleistung des Herzens, spricht man von dekompensierter Herzinsuffizienz.

Die Herzinsuffizienz wurde in dieser Arbeit nach der Ejektionsfraktion klassifiziert und nicht nach den NYHA-Kriterien, die sich vor allem auf die klinischen Symptome beziehen.

Das Herz der Patienten mit Klappenfehlern, deren Ejektionsfraktion über 50% liegt, befindet sich noch in der Phase der kompensatorischen Hypertrophie. Diese Kompensationsprozesse sind beim herzinsuffizienten Patienten schon abgelaufen und haben versagt. Daher ist die Konzentration des Endothelin-1 in der Perikardflüssigkeit dieser Patienten gering.

Man kann also das Endothelin-1 in der Perikardflüssigkeit als ein Maß für das Kompensationsverhalten des Herzens ansehen.

Es liegen andererseits verschiedene Studien vor, die stark erhöhte Endothelin-1-Werte in Herzen von herzinsuffizienten Ratten⁶⁴ oder erhöhte Plasma- und Sputumwerte in Patienten mit Herzinsuffizienz^{30,65,66} gemessen haben. Dies scheint auf den ersten Blick der obigen Aussage zu widersprechen.

Sakai et al.⁶⁴ ligierten die linke Koronararterie, herzinsuffiziente Ratten zu erhalten. Die erhöhten Endothelinwerte wurden drei Wochen nach der Operation gemessen. Man kann nach diesem Modell die erhöhten Werte so erklären, dass die Rattenherzen sich in den ersten Wochen noch im Kompensationsstadium befinden. Das heißt, der Organismus versucht noch aktiv, durch neuroendokrine Aktivierung und Myokardhypertrophie die hämodynamische Situation wieder zu stabilisieren. In dieser Zeit werden auch vermehrt hypertrophieinduzierende Mediatoren gebildet. Sind diese Vorgänge jedoch abgelaufen und haben sie versagt, dann ist die Produktion dieser Mediatoren auch wieder rückläufig. Es wäre daher interessant und wichtig, den weiteren Verlauf der Endothelinwerte bei diesen Ratten zu kennen.

Denver et al.⁶⁵ haben die Messung der Endothelinkonzentrationen mittels ELISA vergleichend im Sputum und Serum an chronisch herzinsuffizienten Patienten durchgeführt. Die Konzentrationen im Sputum waren höher als im Plasma, wahrscheinlich durch die zum größten Teil abluminale Sekretion der Gefäßendothelzellen in Richtung Gefäßmuskelzellen und Interstitium. Die Werte

im Sputum waren unabhängig von der Pharmakotherapie und erhöhten sich in Korrelation mit der NYHA-Einteilung der Herzinsuffizienz. Diese Einteilung erfolgt primär nach klinischen Gesichtspunkten und nicht nur anhand der Ejektionsfraktion. Diese Korrelation war nicht mehr signifikant, wenn die Gruppe der Kontrollpatienten aus der Wertung ausgeschlossen wurde. Es wurde aber eine negative nicht signifikante Korrelation mit der linksventrikulären Ejektionsfraktion der Patienten mit chronischem Herzversagen gemessen. Dies paßt wohl zu unseren niedrigen Werten der herzinsuffizienten Gruppe, eingeteilt nach ihrer Ejektionsfraktion.

Da Denver et al. keine Korrelation des Endothelin-1-Spiegels und der Kreatininkonzentration gemessen haben, schlossen sie, dass die Endothelinspiegel unabhängig von der realen Funktion seien⁶⁵. Doch in unseren Versuchen gab es einen signifikanten Unterschied zwischen den vier Erkrankungsgruppen, von denen eine Gruppe die Patienten mit Niereninsuffizienz bildeten.

4.2 Monocyte Chemoattractant Protein 1 (MCP-1)

MCP-1 ist ein spezifisches Zytokin zur chemotaktischen Attraktion und Aktivierung von Monozyten⁶⁷. Sein Molekulargewicht variiert wegen posttranslatorischen Modifikationen zwischen 10 und 15 kDa⁶⁷. Die Chemotaktik wird durch die Aktivierung der Expression von Adhäsionsmolekülen auf Monozyten bewirkt, die Stimulation der Monozyten zur Sekretion von IL-6 und IL-1 β , sowie des Ca²⁺-Einstroms in Monozyten^{68,69}. Weiterhin leitet MCP-1 die transendotheliale Migration von bestimmten T-Lymphozyten (CD45R0⁺ memory) ein, was nahe legt, dass MCP-1 eine Rolle bei der Verteilung der T-Lymphozyten unter pathophysiologischen Bedingungen spielt⁷⁰. Es bewirkt die Adhäsion von Leukozyten am Endothel durch die Expression von Inter Cellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1)^{71,72}. Zwar reagieren frisch isolierte natürliche Killerzellen nicht auf MCP-1, aber auch diese Zellen zeigen nach Inkubation mit IL-2 eine starke Reaktion auf MCP-1⁷³. An Mastzellen wirkt MCP-1 als Histamine Releasing Factor⁷⁴.

Anders als es der Name vermuten lässt, wirkt MCP-1 nicht nur auf Monozyten, sondern es ist ein Regulator der Extravasation von Immunzellen.

In vitro Versuche zeigten, dass Kardiomyozyten von neonatalen Ratten unter Einfluß von IL-1 α , Lipopolysacchariden oder Hypoxie MCP-1 produzieren⁷¹.

Seine Herstellung wird durch Ischämie induziert. Es verhindert den hypoxieinduzierten Zelltod von kultivierten Kardiomyozyten⁷⁵. Eine weitere Rolle spielt MCP-1 bei der Stimulation der Angiogenese⁷⁶.

Diese Funktionen könnten ein Grund für die besonders hohen Konzentrationen (in der gepoolten Perikardflüssigkeit mehr als 3 ng/ml) sein, die in der Perikardflüssigkeit gemessen wurden. Das kompensierende hypertrophierte Herz hat einen höheren Bedarf an Sauerstoff und damit auch an einsprossenden Kapillaren und Arteriolen.

Die Synthese von MCP-1 wurde mittels seiner mRNA in Endomyokardbiopsien von Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie nachgewiesen⁷⁷. Lehmann et al. zeigten weiterhin, dass die Menge an MCP-1 mit der Schwere der ventrikulären Dysfunktion zunimmt. Je kleiner die Ejektionsfraktion ist, desto höher ist die Infiltration mit inflammatorischen Zellen. Es konnte jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen der MCP-1 mRNA Konzentration in den Myozyten und den verschiedenen Ursachen der dilatativen Kardiomyopathie (z. B. ischämisch oder valvulär) nachgewiesen werden.⁷⁸ Der Myozytenschaden könnte durch infiltrierende aktivierte Monozyten erklärt werden.

In der Perikardflüssigkeit konnte man bei allen Proben hohe Konzentrationen von MCP-1 nachweisen. Aber auch hier, übereinstimmend mit den Ergebnissen der Gruppe Lehmann et al., die MCP-1 mRNA direkt in den Myozyten maßen, konnte kein krankheitsspezifischer signifikanter Unterschied festgestellt werden.

Sollte aber in weiteren Versuchen nachgewiesen werden, dass die Werte in der Perikardflüssigkeit mit den Ergebnissen der mRNA-Messung korrelieren, dann bietet die Perikardflüssigkeit eine einfache Alternative zu der zellulären Messung.

Aukrust et al.⁷⁹ fanden bei Patienten mit chronischem Herzversagen unabhängig von der Ursache der Insuffizienz dysfunktionale Myozyten. Ihre Sekretion von IL-6 und TNF- α war erhöht, während ihre Sekretion von antiinflammatorischen Mediatoren wie IL-10 und TGF- β 1 gleich geblieben oder gar erniedrigt war. Es ist noch zu prüfen, ob diese Verschiebung des Gleichgewichts in Richtung auf proinflammatorische Faktoren, das im gesamten Entwicklungsprozess des chronischen Herzversagens und nicht nur an den Monozyten zu beobachten ist (s. Zusammenfassung), an diesen durch MCP-1 bewirkt wird.

4.3. Granulocyte-Macrophage-Colony-Stimulating-Factor (GM-CSF)

GM-CSF wurde 1977 erstmals durch Burgess et al. aus Mäusen isoliert⁸⁰. Es handelt sich um ein Glykoprotein bestehend aus 127 Aminosäuren, dessen Molekulargewicht in der Literatur mit Werten zwischen 14-35 kDa angegeben wird, abhängig vom Ausmaß der Glykosylierung.

Der Zuckeranteil ist für das volle Spektrum an biologischer Aktivität nicht notwendig. Nicht glykosyliertes GM-CSF ist *in vitro* und *in vivo* aktiv, vollständig glykosyliertes Protein ist allerdings *in vivo* biologisch aktiver.

GM-CSF stimuliert hämatopoetische Progenitorzellen zur Vermehrung und irreversiblen Differenzierung zu reifen Granulozyten und Makrophagen^{81,82}. Es stimuliert aber auch Megakaryozyten⁸³, erythroide Kolonien⁸⁴ und B- und T-Lymphozyten^{85,86}. T-Lymphozyten und Monozyten bilden GM-CSF nach Aktivierung durch Antigene und Mitogene, während in Endothelzellen, Fibroblasten und glatten Muskelzellen die Synthese von GM-CSF durch TNF- α und IL-1 induziert wird⁸⁷⁻⁸⁹.

GM-CSF wirkt über einen transmembranen Rezeptorkomplex, der in mehreren hundert bis tausend Kopien auf der Zelloberfläche myeloider Zellen exprimiert ist, aber auch auf nicht-hämatopoetischen Zellen wie Endothelzellen und kleinzelligen Lungenkarzinomzellen gefunden wird. In den rezeptorpositiven Zellen nimmt die Rezeptordichte mit dem Grad der Ausdifferenzierung ab^{90,91}.

GM-CSF wirkt darüber hinaus vielfältig auf reife Makrophagen und Lymphozyten bei der Immunaktivierung und Proliferation⁹²⁻⁹⁴. Es wirkt als Schlüsselmediator der Entzündungsreaktion und Immunantwort⁹⁵⁻⁹⁷.

Wegen seiner proliferativen Wirkung auf hämatopoetische Zellen wird es zur Zeit im Rahmen von Studien in Zusammenhang mit Chemotherapie, Knochenmarkstransplantation, Leukämie, Myelodysplasien und anderen Knochenmarkserkrankungen eingesetzt. Auch die Einsatzmöglichkeit zur Linderung der myelodepressiven Nebenwirkungen der AIDS-Therapie wird geprüft⁹⁸.

Am Herzen ist GM-CSF in sofern von Bedeutung, als es bei der Pathogenese der Arteriosklerose eine wichtig Rolle zu spielen scheint. Erstens wurde gezeigt, dass es in der Lage ist, den Plasmacholesterinspiegel zu senken^{99,100}, zweitens wurde es im Zytoplasma von gesunden und arteriosklerotischen Subpopulationen glatter Muskelzellen von Koronargefäßen nachgewiesen, wobei letztere eine höhere Konzentration aufwiesen¹⁰¹. Die Lokalisation von GM-CSF im Zytoplasma dieser Zellen, und nicht in sekretorischen Organellen wie bei anderen Zelltypen¹⁰², weist darauf hin, dass es bei Reizen wie struktureller Zerstörung der Gefäßwand austritt und nicht wie bei anderen Zellen durch Exozytose.

GM-CSF konnte nur im Erguß eines Patienten aus der Gruppe der Niereninsuffizienten nachgewiesen werden. Es scheint also bei der Pathogenese von Myokarderkrankungen keine parakrine oder exokrine Rolle zu spielen.

4.4. Interleukine

Zur Zeit sind achtzehn verschiedene Interleukine bekannt. Sie sind definitionsgemäß von Leukozyten sezernierte Kommunikationsproteine der Immunregulation, die in Bezug auf Entzündungen als Agonisten oder Antagonisten wirken können. Es gab ursprünglich für die verschiedenen Interleukine zum Teil mehrere Namen, die die Peptide z.B. nach der Eigenschaft benannte, durch die sie entdeckt wurden oder nach ihrem Syntheseort und oft war lange Zeit nicht bekannt, dass es sich dabei um ein und das selbe Lymphokin handelte. Die Bezeichnung „Interleukin“ wurde 1979 auf dem „Zweiten Internationalen Lymphokinarbeitskreis“ in Ermatingen in der Schweiz eingeführt ¹⁰³.

Je mehr über die Interleukine bekannt wird, desto schwerer wird die definitionsgemäße Abgrenzung zu weiteren Zytokinen. Zytokine sind definiert als Substanzen, die als interzelluläre Mediatoren zur Aktivierung von Zellen beitragen und von einer Vielzahl von Zellarten gebildet und sezerniert werden. Dagegen werden Interleukine definitionsgemäß nur von Leukozyten gebildet. Für viele Interleukine hat sich in späteren Beobachtungen herausgestellt, dass sie auch von weiteren Zellen wie Fibroblasten oder Endothelzellen gebildet werden.

Eine wichtige Rolle spielen die Interleukine bei Entzündungsreaktionen. Die Entzündung wird traditionell durch die vier lateinischen Begriffe calor, dolor, rubor und tumor (Wärme, Schmerz, Rötung und Schwellung) beschrieben. All dies beruht auf der Wirkung der Zytokine auf die Blutgefäße. Die Erweiterung und die erhöhte Durchlässigkeit der Blutgefäße während einer Entzündung führt zu einem verstärkten Blutfluß und zu einem Austreten von Flüssigkeit, wodurch es zur Erwärmung, Rötung und Schwellung kommt. Zytokine haben auch wichtige Auswirkungen auf die Adhäsionskraft des Gefäßendothels, so dass zirkulierende Leukozyten an dessen Zellen haften bleiben und durch die Blutgefäßwand zum Entzündungsherd wandern. Angelockt werden sie dabei von weiteren Zytokinen. Die Migration von Zellen in das Gewebe und ihre Aktivität vor Ort verursachen die Schmerzen ¹⁰⁴.

Innerhalb des Entzündungsprozesses sind die Interleukine vor allem für die Vermittlung zwischen Immun- und Entzündungszellen verantwortlich. Die Interleukine, die die Entzündungsreaktion deutlich vorantreiben, werden proinflammatorische Interleukine genannt. Zu diesen zählen unter anderem IL-1 und IL-6 ¹⁰⁵. Antiinflammatorische Interleukine, zu denen IL-4, IL-10 und IL-13 zählen, fungieren als modulierende Elemente, die potentiellen Schaden, der durch eine übermäßige inflammatorische Reaktion ausgeht, begrenzen ¹⁰⁶. Für den physiologischen Ablauf einer Entzündungsreaktion ist das Gleichgewicht zwischen

diesen Gegenspielern wichtig. Verschiebt sich das Gleichgewicht in Richtung der proinflammatorischen Zytokine, so führt dies zu ungenügender Kontrolle über die Entzündungsausbreitung und zu Zellschäden. Eine Konzentrationsverschiebung in Richtung der antiinflammatorischen Zytokine hingegen, führt zu Überkompensation der Immunantwort und birgt das Risiko systemischer Ausbreitung von Infektionen^{107,108}.

Solche Einteilungen müssen aber als Orientierungshilfen und nicht als feste Regeln angesehen werden, denn in Abhängigkeit von den jeweiligen biologischen Prozessen können Zytokine differenzialisierte teillantagonistische Wirkungen hervorrufen. Weiterhin hängt der Effekt eines jeden Zytokins im Zusammenspiel mit den anderen von vielen verschiedenen Faktoren ab. Dazu zählt der Zeitpunkt, zu dem es sezerniert wurde, das lokale Milieu in dem es wirkt, die Anwesenheit von weiteren Synergisten und Antagonisten, die Rezeptordichte und die Reaktion des Gewebes auf die Zytokine¹⁰⁹.

Entzündungsreaktionen spielen bei der Pathogenese der dilatativen Kardiomyopathie und der Herzinsuffizienz¹¹⁰⁻¹¹³ eine entscheidende Rolle. Daher ist es interessant, die Zusammensetzung der Interleukine als Entzündungsmediatoren in der Perikardflüssigkeit zu messen und zu prüfen, ob diese auf die zugrundeliegende Erkrankung schließen läßt.

Nach bestem Wissen der Autorin sind bis heute keine Arbeiten bekannt, die ihren Schwerpunkt auf die Interleukinzusammensetzung der Perikardflüssigkeit gelegt haben. Nur Fujita et al.⁵⁹ maßen in der Perikardflüssigkeit die Werte für IL-6 und IL-8 sowie einiger Adhäsionsmoleküle, um sich einen grob orientierenden Überblick über die inflammatorische Aktivität innerhalb der Perikardflüssigkeit zu verschaffen.

4.4.1. Interleukin 1 (IL-1)

Es gibt drei Isoformen für IL-1: IL-1 α , IL-1 β und IL-1-Rezeptorantagonist (IL-1Ra). Diese Proteine zeigen nur 20-30% Sequenzhomologien und binden dennoch an denselben hochaffinen Rezeptor¹¹⁴.

Während IL-1 α und IL-1 β eine Reihe von Zelltypen zu verschiedenen Funktionen anregen und somit als Agonisten fungieren, wirkt der dritte Vertreter als Antagonist, indem er an denselben Rezeptor binden kann, aber keine Signaltransduktion einleitet, sondern die Bindung der homologen Interleukine verhindert¹¹⁵. Er ist ein Inhibitor der Funktion von IL-1 α und IL-1 β . Im weiteren wird daher auf die Funktion der Agonisten eingegangen.

IL-1-Agonisten werden hauptsächlich von Makrophagen, Monozyten, T- und B-Zellen, Fibroblasten, Keratinozyten, Astrozyten und Endothelzellen gebildet. Kardiiale Fibroblasten sind in der Lage, als Antwort auf Endotoxine wie Lipopolysaccharid oder nach Hypoxie-Reperfusionsversuchen IL-1 zu synthetisieren ¹¹⁶.

IL-1 hat eine Reihe von Zielzellen, unter anderem auch Kardiomyozyten, Fibroblasten und glatte Gefäßmuskelzellen ¹¹⁷. Die Hauptmenge des von stimulierten Makrophagen gebildeten Interleukins ist IL-1 β .

Ungewöhnlicherweise besitzt die Vorläuferform keinerlei erkennbare hydrophobe sekretorische Signalfrequenz. Das reife IL-1 kann im Zellinneren nicht nachgewiesen werden und wird wahrscheinlich an der Membran oder extrazellulär produziert ¹¹⁸.

IL-1 wirkt über drei Rezeptortypen: IL-1RI, IL-1R-ACP und IL-1RII. Steigt die Expression von IL-1RI, so steigt auch die biologische Aktivität von IL-1, während die Steigerung von IL-1RII die Aktivität eher senkt. IL-1RII fungiert als Inhibitor der IL-1 Wirkung. IL-1R-ACP verstärkt und ergänzt die IL-1 Wirkung am Typ I Rezeptor ¹¹⁸.

IL-1RI wird hauptsächlich auf Endothelzellen, Fibroblasten, Chondrozyten, glatten Muskelzellen und T-Lymphozyten exprimiert ¹¹⁹, IL-1RII hingegen hauptsächlich auf B-Lymphozyten und hämatopoetischen Zelle ¹²⁰.

Als proinflammatorisches Zytokin reguliert IL-1 Entzündungsprozesse, die Akute-Phase-Antwort auf Infektionen und die Einleitung von Fieber ^{121,122}. An menschlichen glatten Muskelzellen bewirkt es die Bildung von IL-6 ¹²³. Auch für die Synthese von Endothelin ist IL-1 ein Stimulus ⁴².

Es beeinflusst das Wachstum von Fibroblasten, die ICAM-1-Expression und das Wachstum und die Ausdifferenzierung von B- und T-Zellen ¹¹⁷, hat aber entgegen früherer Annahmen keine chemotaktische Funktion ¹²⁴.

An Rattenherzen konnte gezeigt werden, dass IL-1 α bei den Umwandlungsprozessen in der Embryogenese des Herzens vor allem durch die Modifikation der extrazellulären Matrix ein entscheidender Faktor der Morphogenese des Herzens ist ¹²⁵.

Mit IL-1 α behandelte Rattenherzen zeigten einen verbesserten systolischen ventrikulären Druck und eine Überexpression von Manganous Superoxid Dismutase (Mn²⁺ SOD), was einen reduzierten Ischämie-Reperfusionsschaden zur Folge hatte ¹²⁶, d.h. kardioprotektiv wirkt.

IL-1 β wird lokal am Herzen in den Koronararterien und vom Myokard selbst gebildet¹²⁷. An Kardiomyozyten bewirkt IL-1 β die Expression des NO-Synthasegens vom Makrophagentyp, was zu einer de novo Synthese von NO am Herzen führt¹²⁸. IL-1 β hat eine negativ inotrope Wirkung und inhibiert die Pulsation von kultivierten Kardiomyozyten¹²⁹⁻¹³³.

In chronisch ischämischem Myokard mit fokalen Nekrosen¹³⁴, in atherosklerotischer Kaninchenaorta¹³⁵, bei Patienten mit Kardiomyopathie¹²⁷ und bei Patienten mit Herzinsuffizienz¹³⁶ wurden erhöhte IL-1 β -mRNA-Spiegel als Zeichen für die Rolle dieses Zytokins in Entzündungsprozessen am Myokard nachgewiesen. Während kein Unterschied des mRNA-Spiegels zwischen kompensierten und dekompenzierten Herzen nachgewiesen werden konnte¹³⁷, wurde eine positive Korrelation zwischen der Menge an radioaktiv markiertem IL-1 β und dem Quotienten aus der Masse des linken Ventrikels und dem Körpergewicht beobachtet¹³⁶.

IL-1 β bewirkt die Hypertrophie von neonatalen Kardiomyozyten in vitro und leitet ihre DNA-Synthese ein, während es auf kardiale Fibroblasten einen starken antiproliferativen Effekt ausübt¹³⁸.

Es scheint, als sei IL-1 β ein Teil der Zytokinkaskade, die zum Schutz des Herzens vor zerstörerischen Faktoren aktiviert wird. Es wird als Antwort auf pathogene Stressfaktoren gebildet und bewirkt direkt das Wachstum der verbliebenen Myozyten und dämmt gleichzeitig die Fibroblastenproliferation ein, die sonst übermäßige Narbenbildung bewirken könnte.

In den untersuchten Perikardergüssen konnte in jeder Probe IL-1 α gemessen werden. Es wurde jedoch kein signifikanter spezifischer Unterschied zwischen den Patientengruppen festgestellt. IL-1 α spielt wohl als proinflammatorisches Interleukin im Wechselspiel zwischen den verschiedenen pro- und antiinflammatorischen Zytokinen am Herzen, dem ein latenter Entzündungsprozeß zugrunde liegt, eine Rolle. Daher kann seine Bedeutung nur in Zusammenhang mit den anderen gemessenen Werten verstanden und besprochen werden. Auf diese Zusammenhänge wird deshalb im Anschluss an die Besprechung der einzelnen Zytokine eingegangen.

Dies gilt auch für IL-1 β . Jedoch wurden für dieses Interleukin in dieser Arbeit signifikante Unterschiede zwischen der Gruppe der herzinsuffizienten zu der Gruppe der Klappenfehler- und der niereninsuffizienten Patienten beobachtet. Die Werte in der Gruppe der Patienten mit koronarer Herzkrankheit unterlagen größeren Schwankungen und wiesen keine einheitlichen Werte auf.

Betrachtet man die negativ inotrope und die antikontraktile Wirkung des IL-1 β auf Myozyten, so sind die geringen Konzentrationen, die in der Perikardflüssigkeit der herzinsuffizienten Patienten gemessen wurden, als ein Vorteil anzusehen. Die geringen Spiegel in der Perikardflüssigkeit stimmen jedoch nicht mit den mRNA-Spiegeln oder den Serumwerten überein, die andere Arbeitsgruppen gemessen haben. Wie weiter oben beschrieben, sind in der Literatur bei Herzinsuffizienz erhöhte IL-1 β mRNA und Serumspiegel beschrieben worden, wobei kein Unterschied zwischen kompensiertem und dekompenziertem Herzversagen festgestellt wurde.

Die Beobachtungen werfen die Frage auf, ob es für die Perikardflüssigkeit lokal funktionierende Kompensationsmechanismen gibt, die den überhöhten IL-1 β -Spiegel lokal senken können. So könnte mit relativ geringem Aufwand die hämodynamisch schädigende Wirkung dieses Interleukins direkt am Herz selbst gedämmt werden, auch wenn die Werte im Kreislauf nicht reguliert werden. Es kann also sein, dass die Umstellung in der Expression, die beim Übergang von kompensiertem zu dekompenziertem Herzversagen sinnvoll wäre, aber nicht im Serum nachweisbar ist, durch lokale Prozesse in der Perikardflüssigkeit, wenn auch nicht ganz ersetzt, immerhin wohl teilweise vollzogen wird.

4.4.2. Interleukin 6 (IL-6)

IL-6 ist ein sekretorisches Einzelstrangprotein mit einem Molekulargewicht von 28 kDa und gehört zu den proinflammatorisch pluripotenten Zytokinen. Es wird von einer Reihe von Zellen, unter anderem Monozyten, Makrophagen, Fibroblasten und Endothelzellen hergestellt^{117,139}. Menschliche glatte Gefäßmuskelzellen sezernieren IL-6 während der Proliferation oder nach Stimulation mit IL-1¹²³. Auch TNF- α induziert die IL-6 Genexpression und Proteinsynthese in einigen Zellen¹⁴⁰. Tatsächlich wird eine signifikante Korrelation zwischen erhöhten Werten von TNF- α und IL-6 beschrieben.^{21,22,24} Diese Beobachtung warf die Frage der „Zytokinkaskade“ auf, die davon ausgeht, dass die Ausschüttung von Zytokinen interdependent und gegenseitig induziert ist und folglich auch auf verschiedenen Ebenen reguliert werden kann.

An Ratten mit einer genetisch bedingten Hyperlipidämie konnte eine IL-6-Expression an glatten Gefäßmuskelzellen in atherosklerotischen Läsionen nachgewiesen werden¹⁴¹. Kardiomyozyten sezernieren unter Sauerstoffmangel IL-6. Es trägt wahrscheinlich zur ventrikulären Dysfunktion nach myokardialer Ischämie und Reperfusion bei¹⁴².

IL-6 hat vielfältige biologische Funktionen, unter anderem führt es zu B-Zell-Differenzierung oder es bewirkt als proinflammatorisches Zytokin die akute-Phase-Reaktion^{143,144}. Auf kultivierten glatten Gefäßmuskelzellen wirkt es proliferativ¹⁴⁵.

Die Serumwerte von Patienten mit akutem Myokardinfarkt sind erhöht, was darauf schließen läßt, dass IL-6 einen Einfluß auf die Progression und den Heilungsprozeß dieser Krankheit hat, zumal es bevorzugt in ischämisch-reperfundiertem Myokard und in den Myozyten, die direkt an nekrotische Infarktareale grenzen, gebildet wird¹⁴⁶.

Aber auch Patienten mit geringfügiger Herzinsuffizienz, sowie Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie weisen signifikant erhöhte Serumkonzentrationen auf¹⁴⁷. Diese können, wie auch die Ejektionsfraktion, als unabhängige Vorhersagewerte für die Mortalität der Patienten mit Herzinsuffizienz NYHA I bis IV dienen¹⁴⁸.

IL-6 führt zu ventrikulärer Hypertrophie durch Stimulation von Glykoproteinrezeptoruntereinheiten (gp130) auf Kardiomyozyten^{149,150}.

Nicht in allen Perikardergüssen war IL-6 nachweisbar. Die Messwerte der verschiedenen Perikardflüssigkeiten unterlagen großen Schwankungen. Anders als es für die Serumkonzentrationen beobachtet wurde, zeigen die in dieser Arbeit ermittelten Konzentrationen in der Perikardflüssigkeit keinen Zusammenhang zu etwaigen Krankheitsursachen, denn in den untersuchten Gruppen konnten keine signifikanten gruppenspezifische Unterschiede beobachtet werden. Auch ein Zusammenhang mit der Mortalität wurde nicht beobachtet. Die IL-6-Konzentrationen in der Perikardflüssigkeit der einen Patientin aus der niereninsuffizienten Gruppe, die nach der Operation wegen Herzversagens starb, lag weder im oberen noch im unteren Extrembereich der gemessenen Werte. Es ist auch kein Zusammenhang mit den Meßwerten für IL-1 ersichtlich.

Wenn also die IL-6-Konzentration im Serum gewisse Vorhersagen erlaubt, aber die Konzentration in der Perikardflüssigkeit nicht die selben Verhältnisse widerspiegelt, dann bedeutet dies, dass die Messung des Serumspiegels die Messung der Konzentrationen in der Perikardflüssigkeit erstens nicht ersetzt und zweitens die Perikardflüssigkeitskonzentrationen nicht auf die selbe Weise wie die Serumwerte als ein Spiegel für die Geschehnisse im Myokard angesehen werden können.

Da IL-6 als proinflammatorisches Zytokin zumindest ein modifizierender Faktor in der Regulation der Geschehnisse am Myokard ist, welcher auch in der Perikardflüssigkeit auf die Myozyten wirkt, muss weiterhin untersucht werden, wovon die Sekretion dieses Interleukins in die Perikardflüssigkeit abhängt.

4.4.3. Interleukin 10 (IL-10)

Humanes IL-10 ist ein aus 160 Aminosäuren bestehendes lösliches Protein mit einem Molekulargewicht von 18,5 kDa. Es befindet sich in der Extrazellulärflüssigkeit als ein nicht kovalent gebundenes Homodimer¹⁵¹. Es wird durch eine Reihe von Zellen wie Makrophagen, T- und B-Zellen, Monozyten und Neutrophile gebildet¹⁵².

Menschliche IL-10-Rezeptoren wurden hauptsächlich auf den Zellen des hämatopoetischen Systems gefunden¹⁵³. Ihre extrazelluläre Domäne bildet ein glykosyliertes Protein mit einem Molekulargewicht von 35-45 kDa, das zwei IL-10 Moleküle, die sich zu einem Dimer verbunden haben, bindet¹⁵⁴.

IL-10 wirkt antiinflammatorisch, indem es die Synthese einer Reihe von Zytokinen wie zum Beispiel IL-1 α und - β , IL-6, TNF- α und GM-CSF unterdrückt^{152,155} und B-Zellen aktiviert¹⁵⁶.

In der Kardiologie ist IL-10 in Zusammenhang mit Arteriosklerose von Interesse, während die Wirkung in Bezug auf „Remodelling“ und Herzinsuffizienz noch weitgehend unerforscht ist.

In atherosklerotischen Plaques wird IL-10 sowohl in der frühen als auch in der fortgeschrittenen Phase exprimiert. Es unterdrückt deren Fortschreiten, Ruptur oder Thrombose^{157,158}. Es hat eine protektive Wirkung bei der Entstehung von atherosklerotischen Plaques^{159,160}.

Bei Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie wurden erhöhte Werte im Serum gemessen¹⁶¹.

In den untersuchten Perikardergüssen war es als einziges der untersuchten antiinflammatorischen Interleukine in allen Proben enthalten. Es konnten aber keine signifikanten Unterschiede zwischen den untersuchten Patientengruppen festgestellt werden. Da die Wirkung dieses Interleukins stark mit der Bildung proinflammatorischer Zytokine verbunden ist, kann seine Funktion nur in Zusammenhang mit den weiteren die Entzündung beeinflussenden Zytokinen gesehen werden und wird daher weiter unten in diesem Kontext besprochen.

4.4.4. Interleukin 4 (IL-4)

IL-4 ist ein 20 kDa schweres Protein, bestehend aus einer Kette von 129 Aminosäuren¹⁶².

Die biologische Wirkung von IL-4 wird durch spezifische Rezeptoren vermittelt, die in zwei Formen vorkommen, von denen eine sezerniert wird. Die sezernierte Rezeptorform kann die Wirkung von IL-4 blockieren und spielt daher als physiologischer Regulator eine Rolle. Der zellgebundene Rezeptor kommt in einer eher geringen Anzahl (100-5000 Kopien pro Zelle) auf zahlreichen Zellen vor, unter ihnen T- und B - Zellen, Monozyten, Granulozyten, Fibroblasten, Epi- und Endothelzellen ¹⁶³.

IL-4 regelt das Thrombomodulinantikoagulationssystem herunter und wirkt damit dem Effekt von IL-6 und TNF- α bei der Antikoagulation entgegen ¹⁶⁴.

Weiterhin hemmt IL-4 die Fähigkeit der Monozyten, IL-1 β und TNF- α zu bilden und wird zu den anti-inflammatorischen Zytokinen gerechnet. Es wirkt proliferativ und aktivierend auf die Zellen des Immunsystems und regt ihre Differenzierung an. Auf Fibroblasten wirkt es chemotaktisch und regt die Sekretion von extrazellulären Matrixproteinen wie Kollagen Typ I und III oder Fibronectin an. Die Zellen produzieren G-CSF und M-CSF ¹⁶⁴. Kapilläre Endothelzellen werden durch IL-4 zur Proliferation angeregt. Die Adhäsion von T-Zellen, Eosinophilen und Basophilen steigt ¹⁶⁵.

Während der akuten Phase der Herzdekompensation werden erhöhte Werte von IL-4 zusammen mit anderen Zytokinen wie IL-6 gemessen, die bei Rückgang der Symptome auch rückläufig waren ¹⁶⁶.

Marriott et al. ¹⁶¹ untersuchten die IL-4 Spiegel im Serum bezogen auf drei Gruppen: Patienten mit ischämischem Herzversagen, mit dilatativer Kardiomyopathie und asymptotische Verwandte mit Linksherzvergrößerung. Sie stellten bei keiner der Gruppen erhöhte Werte fest. Auch in der Perikardflüssigkeit in Übereinstimmung mit den Messwerten aus dem Serum konnte in dieser Arbeit kein IL-4 nachgewiesen werden. Daraus kann aber nicht geschlossen werden, dass IL-4 an den Prozessen am Herzen keinen Einfluß nimmt, denn über die akute Phase, in der Sato et al. erhöhte IL-4 Werte beobachteten, können die in dieser Arbeit verwendeten Proben keine Auskunft geben.

4.4.5. Interleukin 13 (IL-13)

IL-13 ist ein antiinflammatorisches Zytokin mit einem Molekulargewicht von 10 kDa und wurde erstmals von Minty et al. 1993 ¹⁶⁷ beschrieben. Von den in dieser Arbeit beschriebenen Zytokinen ist IL-13 dasjenige, dessen Wirkung und Funktion außerhalb der Zellen des Immunsystems am wenigsten untersucht wurden.

Es ist ein mit IL-4 verwandtes Interleukin mit Überschneidungen in der biologischen Wirkung. Beide hemmen die Bildung von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen durch Monozyten ^{167,168}.

Auch die Rezeptoren von IL-4 und IL-13 sind sehr ähnlich. Diese beiden Interleukine teilen sich bestimmte Rezeptoruntereinheiten auf nicht hämatopoetischen Zellen ^{169,170}. Die nicht hämatopoetischen Zellen, auf denen bis jetzt ein Interleukin-13-Rezeptor entdeckt wurde, beschränken sich auf Hautfibroblasten ¹⁷¹ und einige maligne Zellen ¹⁷²⁻¹⁷⁴.

IL-13 wird hauptsächlich von T-Zellen gebildet und wirkt auf Monozyten und B-Zellen, aber nicht auf T-Zellen selbst ¹⁷⁵.

Wie IL-4 war auch IL-13 nicht in der Perikardflüssigkeit nachweisbar. Dies stimmt auch mit den Daten von Masson et al. überein ¹⁷⁶, die IL-13 im Plasma von herzinsuffizienten Patienten untersuchten und nicht fanden.

Diese Beobachtungen lassen die Schlussfolgerung zu, dass IL-13 keine Rolle in der chronischen Phase von Herzleiden verschiedener Genese spielt. In weiteren Versuchen müsste noch geprüft werden, ob IL-13 wie IL-4 in der akuten Phase nachweisbar ist.

4.5. Tumor Necrosis Factor - alpha (TNF- α)

TNF- α ist ein multipotentes proinflammatorisches Zytokin mit einem Molekulargewicht von 17 kDa, das hauptsächlich von aktivierten Makrophagen gebildet wird ¹⁷⁷. Seine biologische Aktivität am Herzen übt es durch hochaffine Rezeptoren auf der Oberfläche von Kardiomyozyten aus ¹⁷⁸⁻¹⁸⁰, die grundlegende Veränderungen des Zellmetabolismus und der Transkription am Zellkern einleiten können ¹⁸¹. Es existieren aber auch lösliche ca. 30 kDa schwere Rezeptoren, die als Tumor Necrosis Binding Protein I und II bezeichnet werden und als biologische Inaktivatoren der TNF-Wirkung fungieren. Sie gelten als zuverlässige Marker der Aktivität des TNF-Systems ^{182,183}. Auch ihre Konzentrationen steigen bei Patienten mit Herzinsuffizienz oder kongestivem Herzversagen ^{23,184-186}, wahrscheinlich im Sinne der Aufrechterhaltung des Gleichgewichts zwischen Agonisten und Antagonisten.

Bei Entzündungsprozessen steigert TNF- α die Adhäsion von Leukozyten sowohl am Gefäßendothel als auch an Kardiomyozyten ^{187,188}.

In Myozyten gesunder Personen wird keine Expression von TNF- α -mRNA oder -protein nachgewiesen, sondern dieses wird als Antwort auf Streßstimuli

gebildet^{189,190}. Ist die Biosynthese im Gang und setzt der auslösende Streßstimulus aus, kehren die mRNA-Spiegel schnell auf ihre Ausgangswerte zurück¹⁹⁰. Als solche Stimuli gelten Myokardischämie und Infarkt^{191,192}. Als ischämieinduziertes Zytokin trägt es wahrscheinlich zur Veränderung des molekularen Phänotyps des postischämischen Myokards bei.

TNF- α zeigte einen schützenden Effekt gegen Ischämie- und Reperfusionsschäden bei vorbehandelten Rattenherzen¹⁹³ und regt neonatalen kultivierten Kardiomyozyten zur Hypertrophie an^{194,195}.

Hohe TNF- α -Dosen (10.000 units/ml) bewirken weiterhin an kultivierten Myozyten Arrhythmien, eine Inhibition der Kontraktion bis zum kompletten Stillstand der spontanen Aktion, begleitet von einem massiven Verlust der Inotropie¹²⁹. Es wirkt auch am gesunden Herz durch Beeinflussung der Kalziumhomeostase negativ inotrop¹⁹⁶. Dieser Effekt ist vollständig reversibel¹⁹⁶⁻¹⁹⁸. Murrey und Freeman¹⁹⁹ beschrieben eine biphasische Wirkung am Herzen durch Versuche an Hunden. Rekombinantes menschliches TNF- α steigerte in den ersten Minuten nach Injektion die ventrikuläre Kontraktion, während in den folgenden Stunden ein allmählicher Rückgang der systolischen ventrikulären Funktion beobachtet wurde. Bozkurt et al.¹⁹⁸ zeigten, dass kontinuierliche, pathophysiologisch relevante Konzentrationen allein genügen, um schädliche Veränderungen der ventrikulären Struktur und Funktion zu bewirken.

Zusammen mit der Beobachtung, dass bei Patienten mit fortgeschrittenem Herzversagen regelmäßig erhöhte Serumspiegel von TNF- α gemessen wurden und eine direkte Korrelation zwischen der Konzentration und Schweregradeinteilung der Herzinsuffizienz nach der NYHA-Klassifikation gezeigt werden konnte²¹⁻²⁵, zeigt dies, dass die Überexpression von TNF- α , wenn auch nicht als einziger Faktor, einen entscheidenden Beitrag zur Progression der Herzinsuffizienz leistet.

Vor diesem Hintergrund ist die therapeutische Anwendung von löslichen TNF- α -Rezeptoren (Enbrel, Etanercept) als Antagonisten der TNF- α -Wirkung, sowie Infliximab, einem TNF- α -Antikörper, in Erprobung^{200,201}. Versuche an Ratten konnten eine Besserung der linksventrikulären Funktion an Ratten mit kongestivem Herzversagen durch die Behandlung mit Enbrel belegen²⁰².

Dagegen haben Studien schon gezeigt, dass der Antikörper Infliximab eine Verschlechterung der Herzinsuffizienz bewirkt und daher bei schwerer Herzinsuffizienz kontraindiziert ist. Er wird vor allem in Zusammenhang mit Autoimmunerkrankungen therapeutisch eingesetzt. Auch in diesem Zusammen-

hang sind Todesfälle durch schweres Herzversagen und Infektionsexzerbationen aufgetreten, weswegen die Indikation sehr eng zu stellen ist ²⁰³⁻²⁰⁵.

Bis jetzt konnte in randomisierten klinischen Studien auch kein Benefit der Therapie mit TNF- α -Rezeptorantagonisten belegt werden ²⁰⁶. Weitere Studien sind nötig, um eine abschliessende Beurteilung dieser Therapieoption vornehmen zu können.

In den untersuchten Perikardergüssen wurde regelmäßig TNF- α gefunden, jedoch konnte kein spezifischer Zusammenhang mit der Krankheitsursache festgestellt werden. Auch wenn in der herzinsuffizienten Gruppe die Patienten mit der geringsten Ejektionsfraktion zusammengefasst sind, hatten diese keine signifikant höheren TNF- α -Werte in der Perikardflüssigkeit.

Auch TNF- α ist eines der Entzündungsmediatoren, die aufgrund der latenten Entzündungsreaktion, die am geschädigten Myokard abläuft ^{111,113}, im Perikarderguß nachweisbar sind. Seine proinflammatorische Wirkung muß daher in Zusammenhang mit der Interaktion mit den weiteren Zytokinen in der Perikardflüssigkeit gesehen und besprochen werden.

4.6. Transforming Growth Factor- beta 1 (TGF- β 1)

TGF- β 1 ist ein homodimeres Polypeptid mit einem Molekulargewicht von 25 kDa, das in Blutplättchen und den meisten Organen, einschließlich dem Herzen gefunden wurde ²⁰⁷⁻²⁰⁹. Die zelluläre Herkunft dieses antiinflammatorischen Zytokins am Herzen ist umstritten, Thompson et al. fanden TGF- β 1 mRNA und Protein in Kardiomyozyten von infarziertem Gewebe ²⁰⁹, wohingegen Eghbali nur in der Nichtmyozytenfraktion des Herzgewebes mRNA Expression nachwies ²⁰⁸.

Chronische myokardiale Ischämie resultiert in einer vermehrten Expression von TGF- β 1 mRNA ¹³⁴. Wobei es aber hauptsächlich in Myozyten, die nahe fibrotischem Gewebe lokalisiert sind, vorkommt und nicht in entzündlich infiltriertem ²⁰⁷. Das könnte aber auch damit begründet werden, dass TGF- β in seiner Herkunftszelle die proinflammatorischen Mediatoren so stark unterdrücken kann, dass dort keine Entzündungsreaktion nachgewiesen werden kann. Lefer et al. zeigten, dass TGF- β direkt den schädlichen Einflüssen der inflammatorischen Zytokine am Myokard entgegenwirkt ²¹⁰. Es scheint die Ausschüttung von TNF- α in den Kreislauf nach myokardialer Ischämie zu verhindern und wirkt wohl synergetisch zum supprimierenden Effekt des IL-10 ^{211,212}.

Die Purkinjezellen des Reizleitungssystems konnten regelmäßig mit TGF- β 1-Antikörpern markiert werden, was andeutet, dass TGF- β 1 den Differenzierungsgrad dieser Zellen beeinflussen kann ^{134,207}.

TGF- β 1 ist ein Inhibitor der Endothelzellproliferation. Über chemotaktische Wirkung auf Monozyten konnte jedoch eine indirekte angiogene Wirkung in Wundheilungsexperimenten nachgewiesen werden ²¹³⁻²¹⁵. Über die Expression des Connective Tissue Growth Factor (CTGF) wirkt es am Herzen profibrotisch ²¹⁶. An transgenen Mäusen, die TGF- β überexprimieren, konnte ein fibrotischer Umbau mit dem Resultat einer Herzinsuffizienz beobachtet werden ²¹⁷. Doch im Regelfall führt die TGF- β Expression nicht zum fibrosierten Herzen, denn sie setzt nach Verletzungen kontrolliert und zeitlich begrenzt im Rahmen von Wundheilungsprozessen ein und wird nicht ohne Rückkopplung unbegrenzt gebildet.

TGF- β schützt das Myokard vor ischämischen Schäden ²¹⁸, die durch den Verlust der Aktivität von myokardialer Kreatinkinase und erhöhtem TNF- α -Spiegel auftreten ²¹⁰.

Die Kontraktilität von kultivierten Kardiomyozyten wird durch TGF- β 1 unterhalten ²¹⁹.

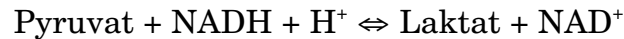
Am geschädigten Myokard übt TGF- β protektive Funktionen aus. Es fördert die Angiogenese, wodurch die Sauerstoffversorgung des Myokards verbessert und das Myokard vor ischämischen Schäden bewahrt wird. Durch seine prokontraktile Wirkung steigert es die Inotropie und unterstützt damit die hämodynamischen Verhältnisse. Es wirkt profibrotisch und hilft dadurch eventuell entstandene Myokardschäden zu dämmen. Seine antiinflammatorische Wirkung hilft, zusätzliche Schäden, die durch überschießende Entzündungsreaktionen auftreten könnten, zu verhindern. All diese Funktionen stehen jedoch in Zusammenhang mit den Effekten zahlreicher anderer Mediatoren, die als Teil eines Mediatorensystems auf die unterschiedlichen Zustände des Herzens reagieren.

TGF- β konnte in allen untersuchten Perikardergußproben nachgewiesen werden und scheint daher seine Wirkung, unabhängig von der Ursache des Herzschadens, auszuüben.

Zusammengefaßt kann man also TGF- β wegen seiner vielfältigen Wirkungen als kardioprotektiven Faktor bezeichnen.

4.7. Laktatdehydrogenase (LDH)

Im Vergleich zu den übrigen Substanzen, die in dieser Arbeit untersucht wurden, ist die Laktatdehydrogenase eine bekannte und umfassend erforschte Substanz. Sie ist ein Enzym des Glykolysestoffwechsels, das die Reaktion:



katalysiert. Die Reaktion läuft unter Sauerstoffmangel in Richtung Laktat ab. Diese Laktatbildung ist ein „totes Gleis“, denn Laktat muß in Pyruvat zurück verwandelt werden, damit es metabolisiert werden kann. Der Zweck der Reduktion von Pyruvat zu Laktat ist die Regenerierung von NAD^+ , damit die Glykolyse fortschreiten kann.

Bei ausreichendem Sauerstoffangebot wird das Pyruvat mit Hilfe der Pyruvatdehydrogenase über Acetyl-CoA im Zitratzyklus oxidiert.

Die Laktatdehydrogenase ist ein Tetramer aus zwei verschiedenen 35-kDa-Untereinheiten: dem H-Typ und dem M-Typ. Der erste dominiert im Herzmuskel, der zweite im Skelettmuskel und in der Leber. Diese Untereinheiten schließen sich zu fünf verschiedenen Isoenzymen zusammen: H_4 , H_3M_1 , H_2M_2 , H_1M_3 , M_4 . Das H_4 -Isoenzym besitzt eine höhere Affinität zu den Substraten als das Isoenzym vom M_4 -Typ. Eine hohe Pyruvatkonzentration kann das H_4 -Isoenzym allosterisch hemmen, während der M_4 -Typ im Unterschied dazu nicht allosterisch gehemmt wird. Speziell das H_4 -Isoenzym oxidiert Pyruvat, welches dann vom Herzmuskel als Brennstoff verwendet werden kann. Der aerobe Stoffwechsel des Herzmuskels erlaubt, dass das Pyruvat in den Zitratzyklus eingeschleust wird. Das M_4 -Isoenzym wandelt hingegen Pyruvat in Laktat um und sorgt so dafür, dass die Glykolyse auch unter anaeroben Bedingungen weiterlaufen kann. Die Eigenschaften der anderen Isoenzyme liegen je nach dem Verhältnis der beiden Kettentypen zwischen diesen Extremen²²⁰.

Die Messung des LDH im Serum ist ein Indikator für die Zeit, in der die Myozyten unter Sauerstoffmangel standen^{108,221}. Es spiegelt somit ischämische Perioden zuverlässig wider.

Es gibt verschiedene wissenschaftliche Arbeiten, die in der Perikardflüssigkeit post mortem die Aktivität der Laktatdehydrogenase bezogen auf verschiedene Todesursachen gemessen haben. Sie konnten vergleichend zeigen, dass die Gruppe der Herztoten signifikant höhere Werte in der Perikardflüssigkeit aufwiesen, als diejenigen, deren Todesursache keinen Zusammenhang mit dem Herzen hatte^{222,223}. Aufgrund der LDH-Werte konnte jedoch keine Unterscheidung zwischen den verschiedenen Herzerkrankungen getroffen werden. Nur beim Herzinfarkt konnte

eine signifikante Erhöhung der H₄-Isoform gegenüber der H₃M₁-Isoform beobachtet werden²²⁴.

Unabhängig von der Todesursache nimmt die LDH-Konzentration mit der Agoniezeit zu²²⁵.

Die in dieser Arbeit gemessenen absoluten Werte erlauben keine eindeutige Interpretation, da keine Kontrollwerte bekannt sind. Unter den vier verschiedenen Patientengruppen konnte, in Übereinstimmung mit den Literaturangaben, über die post mortem entnommenen Perikarergüssen kein signifikanter Unterschied in der LDH-Aktivität der Perikardflüssigkeit beobachtet werden. Da aber die Proben innerhalb einer Operation entnommen wurden und zwei der Proben stark erhöhte Werte im Vergleich zu den anderen aufweisen, kann dies so gedeutet werden, dass bei diesen während der Operation, vielleicht aber auch schon zuvor, eine ischämische Episode aufgetreten war.

4.8. Zusammenfassende Interpretation der Befunde

Die in dieser Arbeit untersuchten Zytokine in der Perikardflüssigkeit lassen sich in vier Hauptkategorien einteilen:

- die Angiogenese einleitenden,
- die Hypertrophie einleitenden,
- die proinflammatorischen und
- die antiinflammatorischen Zytokine

Diese Einteilung gilt als Orientierungshilfe. Es ist zu beachten, dass die verschiedenen Zytokine vielfältige Funktionen innehaben. Somit gibt es Zytokine, die mehreren Kategorien zugeordnet werden müssen.

Nur für zwei Zytokine (Endothelin-1 und IL-1 β) konnte ein Zusammenhang zur Krankheitsursache nachgewiesen werden. Diese beiden Zytokine bewirken die Hypertrophie der Myozyten. In der Gruppe der herzinsuffizienten Patienten wurde für beide Substanzen die niedrigsten Konzentrationen gemessen, während die höchsten Konzentrationen in der Gruppe der Klappenfehlerpatienten zu messen war. Eine Erklärung für diese Beobachtung ist die im Kapitel „Endothelin-1“ dieser Arbeit erläuterten hypertrophieinduzierenden Kompensationsmechanismen des Organismus, die das Dekompensieren des Herzkreislaufsystems verhindern sollen. Zwei Prozesse werden im menschlichen Organismus als Mechanismus zur Kompensation der Herzinsuffizienz parallel eingeleitet: die neuroendokrine Aktivierung und die Induktion der Hypertrophie. Während die verschiedenen

Mechanismen des neuroendokrinen Prozesses wie zum Beispiel die Sympathikusaktivierung, die Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems, die Vasopressinaktivierung oder die Freisetzung des atrialen natriuretischen Peptids allgemein bekannt sind, sind die Abläufe, die die Einleitung der Myokardhypertrophie bewirken, weitgehend unerforscht.

Die parakrine Wirkung dieser Zytokine über das Verbreitungsmedium Perikardflüssigkeit könnte eines der Mechanismen sein, mit denen der Organismus die Myokardhypertrophie bewirkt.

Auch wenn, wie zuvor schon erwähnt, die absoluten Messwerte dieser Arbeit mangels Kontrollgruppe nicht beurteilt werden können, so kann man doch feststellen, dass die Messwerte der Zytokine mit angiogener Eigenschaft in der Perikardflüssigkeit hoch waren. Zu diesen Substanzen zählen vor allem MCP-1 und TGF- β . Ihre Konzentrationen in der Perikardflüssigkeit befanden sich pro Milliliter Perikardflüssigkeit im Nanogrammbereich, während die Konzentration der anderen gemessenen Zytokine im Pikogramm-pro-Milliliter-Bereich lag. Dabei zeigen die Messungen dieser Arbeit, dass die Angiogenese induzierenden Prozesse unabhängig von der Ursache des Herzschadens ablaufen, denn die Schwankungen in den gemessenen Konzentrationen in der Perikardflüssigkeit ließen sich nicht auf die Erkrankungsursache beziehen.

Es gibt weitere Arbeiten, die die Konzentrationen von anderen angiogenen Faktoren in der Perikardflüssigkeit untersuchten und auch relativ hohe Konzentrationen vorfanden ^{11,62,63}.

Dies belegt die Vehikelfunktion der Perikardflüssigkeit bei der Induktion der verschiedenen Signalvermittlungswege, die zur Gefäßneubildung im geschädigten Herzen führen.

Die oben angeführten Kategorien drei und vier sind die pro- und antiinflammatorischen Zytokine. Zu den untersuchten proinflammatorischen Zytokinen zählen vor allem IL-1 α und - β , IL-6 und TNF- α .

Diese proinflammatorischen Zytokine verändern die Homeostase der extrazellulären Matrix und spielen eine Rolle bei der Veränderung des Phänotyps der Kardiomyozyten, die als Antwort auf einen Schaden oder einen Herzinfarkt erfolgt. Sie bieten einen therapeutischen Angriffspunkt, die myokardialen Veränderungen, die akut eintreten oder allmählich zur Herzinsuffizienz führen, günstig zu beeinflussen ²²⁶, was im Falle des TNF- α bereits konkret untersucht wird (s. Kapitel TNF- α).

Zu den antiinflammatorischen Zytokinen zählen IL-4, IL-10, IL-13 und TGF- β , wobei IL-4 und IL-13 hier nicht nachweisbar waren und in Bezug auf chronische Herzleiden keine Rolle zu spielen scheinen. Sie regulieren die Ausbreitung der Entzündungsreaktion und sorgen vor allem dafür, dass sie keine schädlichen Ausmaße annimmt.

In Bezug auf diese Zytokine ist vor allem deren Zusammenspiel und Gleichgewicht von Bedeutung. Die meisten Studien richten ihren Blick nur auf ein Zytokin oder eine Zytokinfamilie mit deren Wirkung auf Krankheitsprozesse am Herzen. Doch vor allem die inflammatorische Wirkung von Zytokinen scheint durch ein kompliziertes Netzwerk von Modulatoren mit Agonisten und Antagonisten verbunden zu sein.

In gewissem Maße versucht die „Zytokinhypothese“ dem Rechnung zu tragen. Sie besagt, dass das Fortschreiten der Herzinsuffizienz zum Teil durch Zytokin-kaskaden, die durch Myokardverletzung ausgelöst werden, aufrechterhalten wird. Die Zytokine verursachen nicht per se eine Herzinsuffizienz, aber ihre Überexpression trägt zur Progredienz bei²⁵. Man stellt sich vor, dass der Mechanismus der Zytokinaktivierung über die Aktivierung von Blutplättchen, Leukozyten und dem Komplementsystem verläuft²²⁷. In zahlreichen Studien wurde aber auch gezeigt, dass Endothelzellen, Fibroblasten und die Myozyten selbst Zytokine synthetisieren und in das Geschehen autokrin oder parakrin eingreifen.

Die Veränderungen, die am insuffizienten Myokard durch das Zytokinsystem ausgelöst werden, führen zu Myokardhypertrophie, Fibrozytenproliferation und Vasokonstriktion. Da Zytokine Entzündungsmediatoren sind, können diese Veränderungen als Ausdruck eines mehr oder weniger aktiven Entzündungsprozesses angesehen werden.

Aukrust et al.⁷⁹ beschrieben die Vorgänge innerhalb des Entzündungsprozesses näher. Sie zeigten, dass in diesem Prozess das Gleichgewicht zwischen pro- und antiinflammatorischen Faktoren zugunsten der proinflammatorischen verschoben wird, und zwar unabhängig von der Ursache des Herzversagens. Diese Verschiebung trägt wesentlich zur strukturellen Degeneration, die die Basis des kongestiven Herzversagens ist, bei.

Mit Hilfe der in dieser Arbeit ermittelten Daten, kann mangels Kontrollgruppe, die Frage nach der Verschiebung des Gleichgewichts in der Perikardflüssigkeit nicht beantwortet werden, denn das physiologische Gleichgewicht der Zytokine in der normalen Perikardflüssigkeit ist nicht bekannt. Da aber eine mittelgradige Entzündungsreaktion reaktiv bei Herzinsuffizienz beschrieben worden ist^{111,113}, ist

anzunehmen, dass die in der Perikardflüssigkeit gemessenen Werte eine Entzündung reaktiv widerspiegeln.

Aukrust et al. ⁷⁹ sprechen weiterhin von einer „gemeinsamen Endstrecke“ dieser Entwicklungsprozesse. Es gibt vielfältige Prozesse, die zur Herzinsuffizienz führen. Alle diese Prozesse unabhängig davon, ob sie z.B. durch Herzklappenfehler, Bluthochdruck oder einem Herzinfarkt ausgelöst werden, leiten vermutlich letztendlich die selbe Zytokinkaskade ein, die zu einer latent persistierenden Myokardentzündung führt.

Diese gemeinsame Endstrecke könnte ein Grund dafür sein, dass in dieser Arbeit für die meisten gemessenen Zytokine in der Perikardflüssigkeit kein signifikanter Unterschied in den Patientengruppen mit den verschiedenen Ursachen der Herzleiden gefunden wurde.

Es muss aber noch andere Ursachen für die Modulation der Zusammensetzung der inflammatorischen Zytokine in der Perikardflüssigkeit geben. Denn auch wenn keine patientengruppenspezifischen Unterschiede in der Zusammensetzung der Zytokine in der Perikardflüssigkeit gezeigt werden konnten, so konnten doch zum Teil erhebliche Schwankungen in den Messwerten der verschiedenen Patienten festgestellt werden. Die Perikardflüssigkeit spiegelt, genauso wie die intrazellulären mRNA-Spiegel, nicht die krankheitsspezifische Ursache des Herzversagens wider. Sie zeigt aber auch keine vergleichbare Zusammensetzung bei den untersuchten Patienten. Dies würde man bei einer Widerspiegelung der gemeinsamen Endstrecke, die innerhalb der Myozyten abläuft, erwarten.

Fujita et al. ^{11,62} zeigten in ihren Arbeiten, dass bei Patienten unter ischämischen Bedingungen vermehrt die angiogenen Faktoren basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) und Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) in der Perikardflüssigkeit gemessen werden konnten. Auch für acidic Fibroblast Growth Factor (aFGF) konnte dies gezeigt werden ⁶³.

Für die Patientengruppe mit Herzinsuffizienz konnten Faktoren wie Atrial Natriuretic Peptide (ANP) und Brain Natriuretic Peptide (BNP) beschrieben werden, die vom Myokard selbst gebildet werden und in der Perikardflüssigkeit dieser Gruppe gegenüber dem Serum signifikant erhöht waren ²²⁸.

Hieraus ist zu schließen, dass die Perikardflüssigkeit ein von der intrazellulären Zusammensetzung der Myozyten unabhängiges Milieu darstellt, welches eigenen Mechanismen unterliegt, die differenziert für die unterschiedlichen Faktoren ablaufen.

Diese Arbeit zeigt weiterhin, dass die Perikardflüssigkeit eine Wirkung auf Myozyten ausübt und innerhalb dieses Systems als Vehikel dient, das die Modulatoren an ihren Wirkort bringt. Der Mechanismus der autokrinen und parakrinen Sekretion des Myokards via Perikardflüssigkeit ist nicht nur auf eine bestimmte Substanzgruppe beschränkt, sondern wird vielfältig genutzt.

Der Vorteil gegenüber dem Transportsystem Blutkreislauf liegt in der Ortsnähe und darin, dass wegen des erheblich geringeren Volumens der Perikardflüssigkeit, geringere Mengen an Zytokinen synthetisiert werden müssen, um vor Ort in geeigneter Konzentration vorhanden zu sein.

Inflammatorische Zytokine wirken autokrin (auf die produzierende Zelle), parakrin (auf die Nachbarzelle) und juxtakrin (auf die umliegenden Zellen). Ihre biologische Aktivität wird nicht nur durch die spezifische Zielzelle bestimmt, sondern auch durch das interzelluläre Milieu und den biologischen Kontext in dem sie wirken²²⁹. Die Substanzen, die autokrin, parakrin oder intrakrin an den Einsatzort gelangen, können in Studien in der Blutzirkulation nicht nachgewiesen werden. Daher bleibt die Perikardflüssigkeit ein interessantes Medium, um die Geschehnisse am Myokard besser verstehen zu können, auch wenn sie letztendlich nicht durch ihre Zusammensetzung einfach die Geschehnisse im Myokard widerspiegelt.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob Perikardflüssigkeit eine Wirkung auf Myozyten ausübt. Dazu wurde Perikardflüssigkeit verschiedener Patienten gepoolt und mittels Salzpräzipitation und HPLC aufgetrennt. Die hierdurch entstandenen Fraktionen wurden auf kultivierte neonatale Rattenmyozyten gegeben. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Perikardflüssigkeit Faktoren enthält, die die Hypertrophie, die Überlebensdauer und die Kontraktilität der Myozyten positiv beeinträchtigen.

Mit Hilfe der durch die Salzpräzipitation entstandenen Fraktionen konnte gezeigt werden, dass es in der Perikardflüssigkeit verschiedene Faktoren für das Längen- und Dickenwachstum der Myozyten gibt. Der Faktor für das Dickenwachstum ist im Vergleich zu dem für das Längenwachstum eher klein und hydrophil, denn er befindet sich im Überstand der 60 %igen Salzlösung. Der Faktor für das Längenwachstum hingegen befindet sich im Präzipitat der 60%igen Salzlösung und ist eher groß und lipophil.

Die Auftrennung der Perikardflüssigkeit mit Hilfe der HPLC erlaubte zwar keine Aussage über die Faktoren für Dicken- und Längenwachstum, zeigte aber, dass eine sehr stark heparinbindende (d.h. lipophile) Fraktion der Perikardflüssigkeit, die mit Hilfe einer Heparinsäule ermittelt wurde, den gleichen Effekt, wie die Perikardflüssigkeit selbst auf die Myozyten hat. Die Auftrennung dieser aktiven heparinbindenden Fraktion mit Hilfe der HPLC über eine Anionen-Kationenaustauschersäule bei verschiedenen pH-Werten zeigte, dass diese Fraktion in zwei aktive Unterfraktionen aufgeteilt werden kann, die bei pH 6,5 getrennt, einmal an der Anode und einmal an der Kathode binden, während sie bei pH 5,5 noch gemeinsam an der Kathode binden. Kontraktion fand bei beiden Versuchen nicht statt.

Aus diesen vorläufigen Versuchen lässt sich also deutlich schließen, dass die Perikardflüssigkeit aktive Faktoren enthält, die eine direkte und differenzierte Wirkung auf die Myozyten ausüben.

Der zweite Versuchsansatz befasste sich speziell mit den Zytokinen in der Perikardflüssigkeit und deren spezifischer Zusammensetzung bei verschiedenen Ursachen des Herzleidens.

Diese Arbeit zeigt, dass in der Perikardflüssigkeit die Zytokine IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α , MCP-1, TGF- β 1 und Endothelin-1 vorhanden sind, während IL-4, IL-13 und GM-CSF nicht nachweisbar sind.

Für die Hypertrophie induzierenden Zytokine Endothelin-1 und IL-1 β konnte ein Zusammenhang mit den zugrundeliegenden Krankheiten gezeigt werden. Ihre Konzentrationen waren in der Gruppe der Herzinsuffizienten am geringsten und in der Gruppe der Herzklappenpatienten am höchsten. Dies steht vermutlich in Zusammenhang mit der kompensatorischen Hypertrophie und der Dekompensation bei fortgeschrittener Herzinsuffizienz.

Die untersuchten angiogeneseinduzierenden Faktoren waren in allen Proben im Vergleich zu den anderen Zytokinen in einer bis zu tausendfach höheren Konzentration vorhanden. Dies belegt die Bedeutung der Angiogenese bei allen Herzleiden unabhängig von der Ursache der Erkrankung.

Die dritte Gruppe umfasst die pro- und antiinflammatorischen Zytokine. Zu den untersuchten proinflammatorischen Zytokinen zählen vor allem IL-1 α und - β , IL-6 und TNF- α . Die Gruppe der antiinflammatorischen Zytokine umfasst IL-10 und TGF- β 1. Für diese Zytokine konnte kein signifikanter Unterschied in den Patientengruppen festgestellt werden. Dies stützt die Hypothese einer gemeinsamen Endstrecke der inflammatorischen Geschehnisse am Myokard unabhängig von der Ursache des Herzleidens. Die Schwankungen in der Zusammensetzung der Zytokine in der Perikardflüssigkeit müssen daher anderen Ursachen als den auslösenden Erkrankungen unterliegen.

Wenn also die Perikardflüssigkeit auch nicht auf die Weise, wie wir es uns vorgestellt haben, die Geschehnisse im Myokard krankheitsspezifisch widerspiegelt, so hat sie doch eine direkte Wirkung auf die Kardiomyozyten und liefert in Bezug auf Hypertrophie und Kompensation/Dekompensation wichtige Hinweise für die Bewertung der momentanen Myokardsituation. Die Herausforderung in folgenden Forschungsarbeiten wird sein, die weiteren Zusammenhänge, die zur spezifischen Zusammensetzung der Zytokine in der Perikardflüssigkeit einzelner Patienten führen, zu klären.

6. Abkürzungen

2GE	Zwei-Gefäßerkrankung
3GE	Drei-Gefäßerkrankung
AI	Aortenklappeninsuffizienz
AK	Antikörper
CD	Kardiale Dekompensation
DCM	dilatative Kardiomyopathie
ET	Endothelin
ELISA	enzyme-linked immuno sorbent assay
FCS	fetal calf serum
GM-CSF	Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor
H ⁺	Proton
HEPES	2-N-Hydroxyethylpiperazin-N2-Ethansulfonsäure
HCL	Salzsäure
HI	Herzinsuffizienz
HPLC	High Salt Precipitation
HSS	Hauptstammstenose
HTX	Herztransplantation
HWI	Hinterwandinfarkt
IL	Interleukin
KHK	koronare Herzkrankheit
LDH	Laktatdehydrogenase
LV-EF	linksventrikuläre Ejektionsfraktion
MES	2-N-morpholino ethane sulfonic acid
MCP	Monocyte Chemoattractant Protein
NAD	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NBS	new born serum
NI	Niereninsuffizienz
NYHA	New York Heart Association
o.B.	ohne pathologischen Befund
PCF	Perikardflüssigkeit
PR	Präzipitat
SDS-Seite	Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel
SN	Überstand
TEMED	N,N,N,N-Tetramethylethylenediamine
TGF-β1	Transforming Growth Factor - beta 1
TNF-α	Tumor Necrosis Factor- alpha
VHF	Vorhofflimmern
VP	Herzklappenitium
VWI	Vorderwandinfarkt
Z.n.	Zustand nach

7. Literaturverzeichnis

1. Light RW. Pleural effusions. *Med Clin North Am.* 1977;61:1339-1352.
2. Jay SJ. Pleural effusions: II. Definitive evaluation of the exsudate. *Postgrad Med.* 1986;80:181-188.
3. Jay SJ. Pleural effusions: I. Preliminary evaluation - recognition of the transsudate. *Postgrad Med.* 1986;80:164-177.
4. Blümcke S. Herz/Epi- und Perikard. In: Blümcke S, ed. *Pathologie - de Gruyter Lehrbuch mit Repetitorium*: Walter de Gruyter Verlag; 1995:533.
5. Kirkpatrick CJ, Roessner A, Schmid KW, et al. Allgemeine Kreislaufpathologie. In: *Pathologie*: Urban & Schwarzenberg; 1996: 203 – 206.
6. Caesar R. Herz. In: Springer Verlag H, ed. *Pathologie, Lehr- und Nachschlagebuch*: W. Remmele; 1999:103-277.
7. Maurer FW, Warren MF, Drinker CK. The composition of mammalian pericardial and peritoneal fluids. *Am. J. Physiol.* 1940;129:635-644.
8. Geinitz W, Hobitz H. Über die Eiweisse der Perikardialflüssigkeit des Menschen. *Clinica chim. Acta* 3. 1958:84-88.
9. Hutchin P, Nino H, Suberman R, et al. Electrolyte and acid-base composition of pericardial fluid in man. *Archs Surg.* 1971;Chicago102:28-30.
10. Gibson AT, Segal MB. A study of the composition of pericardial fluid, with special reference to the propable mechanism of fluid formation. *J. Physiol.* (1978). 1977;277:367-377.
11. Fujita M, Ikemoto M, Kishishita Mea. Elevated basic fibroblast growth factor in pericardial fluid of Patients with unstable angina. *Circulation.* 1996;94:610-613.
12. Corda S, Mebazaa A, Gandolfini Mea. Trophic effect of human pericardial fluid on adult cardiac myocytes. Differential role of fibroblast growth factor-2 and factors related to ventricular hypertrophy. *Circ Res.* 1997;81:680-688.
13. Miyazaki T, Pride HP, Zipes DP. Prostaglandines in the pericardial fluid modulate neural regulation of cardiac electrophysiological properties. *Circ Res.* 1990;66:163-175.

14. Shah A. Paracrine modulation of heart cell function by endothelial cells. *Cardiovasc Res.* 1990;66:163-175.
15. Brutsaert DL, Andries LJ. The endocardial endothelium. *Am J Physiol.* 1992;263: H985-H1002.
16. Mebazaa A, Wetzel RCea. Potential paracrine role of the pericardium in the regulation of cardiac funktion. *Cardiovasc Res.* 1998;40:332-342.
17. Eid H, Larson DM, Sprinhorn JP. Role of epicardial mesothelial cells in the modification of phenotype and function of adult rat ventricular myocytes in primary coculture. *Circ Res.* 1992;71:40-50.
18. Dickson TJ, Gurudutt V, A.Q. N, et al. Establishment of a clinical correlated human pericardial fluid bank: elevated of Intrapericardial diagnostic potential. *Clin Cardiol.* 1999;22 (Suppl.I):I-40 - I-42.
19. Bozkurt B, Shan K, Seta Y, et al. Tumor necrosis factor α and tumor necrosis factor receptors in human heart failure. *Heart Fail Rev.* 1996;1:211-219.
20. Matsumori A, Yamada T, Suzuki H, et al. Increased circulating cytokines in patients with myocarditis and cardiomyopathy. *Br Heart J.* 1994;72:561-566.
21. Torre-Amione G, Kapadia S, Benedict CR, et al. Proinflammatory cytokine levels in patients with depressed left ventricular ejection fraction: a report from the studies of left ventricular dysfunction (SOLVD). *J Am Coll Cardiol.* 1996;27:1201-1206.
22. Testa M, Yeh M, Lee Pea. Circulating levels of cytokines and their endogenous modulators in patients with mild to severe congestive heart failure due to coronary artery disease or hypertension. *J Am Coll Cardiol.* 1996;28:964-971.
23. Ferrari R, Bachetti T, Confortini R, et al. TNF-soluble receptors in patients with various degrees of congestive heart failure. *Circulation.* 1995;92:1479-1486.
24. MacGowan GA, Mann DL, Kormos RL, et al. Circulating interleukin-6 in severe heart failure. *Am J Cardiol.* 1997;79:1128-1131.
25. Seta Y, Shan K, Bozkurt B, et al. Basic mechanisms in heart failure: the cytokine hypothesis. *J Card Fail.* 1996;2:243-249.

26. Horkay F, Szokodi I, Selmecci L, et al. Presence of immunoreactive endothelin-1 and ANP in human pericardial fluid. *Life Sci.* 1998;62(3):267-274.
27. Hanley F, Messina LM, Baer RW, et al. Direct measurement of left ventricular interstitial adenosine. *Am J Physiol.* 1983;245:H327-335.
28. Weihrauch D, Tessmer J, Warltier DC, et al. Repetitive coronary artery occlusions induce release of growth factors into the myocardial interstitium. *Am J Physiol.* 1998;275:H969-96.
29. Mann DL, Knuefermann P, Baumgarten G. Cytokines in ischemic heart disease and heart failure. *Dialogues in Cardiovascular Medicine.* 2000;5.
30. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, et al. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature.* 1988;332:411-415.
31. Rubanyi GM, Polokoff MA. Endothelins: Molecular biology, biochemistry, pharmacology, physiology, and pathophysiology. *Pharmacol Rev.* 1994;46:325-415.
32. Miyauchi T, Masaki T. Pathophysiology of endothelin in the cardiovascular system. *Annu Rev Physiol.* 1999;61:391-415.
33. Xu D, Emoto N, Giaid A, et al. ECE-1: A membran-bound metalloprotease that catalyzes the proteolytic activation of big-endothelin-1. *Cell.* 1994;78:473-485.
34. Schmidt M, Kröger B, Jacob E, et al. Molecular characterization of human and bovine endothelin converting enzyme (ECE-1). *FEBS Lett.* 1994;356:238-243.
35. Russell FD, Skepper JN, Davenport AP. Endothelin peptide and converting enzymes in human endothelium. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1998;31 Suppl 1:19-21.
36. Fukuchi M, Giaid A. Expression of endothelin-1 and endothelin-converting enzyme-1 mRNAs and proteins in failing human hearts. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1998;31 Suppl 1:421-423.
37. Burden-Scott T, Resink TJ, Hahn AWA, et al. Introduction of endothelin secretion by angiotensin II: Effects on growth and synthetic activity of vascular smooth muscle cells. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1991;17:96-100.

38. Kaddoura S, Firth JD, Boheler KR, et al. Endothelin-1 is involved in norepinephrine-induced ventricular hypertrophy in vivo: acute effects of bosentan, an orally active, mixed endothelin ETA and ETB receptor antagonist. *Circ.* 1996;93:2068-2079.
39. Golden CL, Kohler JP, Nick HS, et al. Effects of vasoactive and inflammatory mediators on endothelin-1 expression in pulmonary endothelial cells. *Am J Respir Cell Mol Bio.* 1995;12:503-512.
40. Kourembanas S, Marsden PA, Mc Quillan LP, et al. Hypoxia induces endothelin gene expression and secretion in cultured human endothelium. *J Clin Invest.* 1991;88.
41. Harrison VJ, Ziegler T, Bouzourene K, et al. Endothelin-1 and endothelin converting enzyme-1 gene regulation by shear stress and flow induced pressure. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1998;31:38-41.
42. Rubanyi G. Potential physiological and pathological significance of endothelin. *Drugs of the future.* 1992;17(10):915-936.
43. Schmitz-Spanke S, Schipke JD. Potential role of endothelin-1 and endothelin antagonists in cardiovascular diseases. *Basic Res Cardiol.* 2000;95:290-298.
44. Stewart DJ, Ceracek P, Costello KB, et al. Elevated endothelin-1 in heart failure and loss of normal response to postural change. *Circulation.* 1992;85:510-517.
45. Kaufmann H, Oribe E, Oliver J. Plasma endothelin in human plasma, urine, milk, and saliva. *Lancet.* 1991;338:1542-1545.
46. Whitson PA, Chen YM. Salivary endothelin and its response to postural changes in human. *Acta Physiol Scand.* 1997;160:291-293.
47. Hori S, Komatsu Y, Shigemoto R, et al. Distinct tissue distribution and cellular localization of two messenger ribonuclein acids encoding different subtypes of rat endothelin receptors. *Endocrinology.* 1992;130:1885-1895.
48. Endoh M, Fujita S, Yang H-T, et al. Endothelin: receptor subtypes, signal transduction of Ca²⁺ transients and contractility in rabbit ventricular myocardium. *Life Sci.* 1998;62:1485-1489.
49. Ogawa Y, Nakao K, Arai H, et al. Molecular cloning of a non-isopeptide-selective human endothelin receptor. *Biochem Biophys res Commun.* 1991;178:248-255.

50. Fukuroda T, Fujikawa T, Ozaki S, et al. Clearance of circulating endothelin-1 by ETB receptors in rats. *Biochem Biophys Res Commun*. 1994;199(3):1461-1465.
51. Karne S, Jayawickreme CK, Lerner MR. Cloning and characterization of an endothelin-3 specific receptor (ETC receptor) from *Xenopus leavis* dermal melanophores. *J Bio Chem*. 1993;268:19126-19133.
52. Masaki T. Overview: reduced sensitivity of vascular response to endothelin. *Circulation*. 1993;87(suppl V):V33-V35.
53. Kagamu H, Suzuki T, Arakawa M, et al. Low oxygen enhances endothelin-1 (ET-1) production and responsiveness to ET-1 in cultured cardiac myocytes. *Biochem Biophys*. 1994;202:1612-1618.
54. Picard P, Smith PJ, Monge JC, et al. Coordinate upregulation of the cardiac endothelin system in a rat model of heart failure. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1998; 31 suppl1:294-297.
55. Bohnemeier H, Pinto YM, Horkay F, et al. Endothelin converting enzyme-1 mRNA expression in human cardiovascular disease. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1998;31 Suppl 1:52-54.
56. Duchman SM, Thohan V, Kalra D, et al. Endothelin-1: a new target of therapeutic intervention for the treatment of heart failure. *Current opinion in cardiology*. 2000;15:136-140.
57. Bogoyevitch MA, Sugden PH. The role of protein kinase in adaptational growth of the heart. *Int J Biochem Cell Biol*. 1996;28:1-12.
58. Krum H, Gu A, Wilshire-Clement M, et al. Changes in plasma endothelin-1 levels reflect clinical response to beta-blockade in chronic heart failure. *Am Heart J*. 1996;131:337-341.
59. Fujita M, Komeda M, Hasegawa K, et al. Pericardial fluid as a new material for clinical heart research. *Int J Cardiol*. 2001;77:113-118.
60. Salani D, Taraboletti G, Rosano L, et al. Endothelin-1 induces an angiogenic phenotype in cultured endothelial cells and stimulates neovascularization in vivo. *Am J Pathol*. 2000;157(85):1703-1711.
61. Zima E, Kekesi V, Nagy A, et al. Endothelin-1-induced elevation in purine metabolite concentration - autoregulatory protection in the canine pericardium? *Clinical Science*. 2002;103 Suppl 48:202S - 205S.

62. Fujita M, Ikemoto M, Tanaka t, et al. Marked elevation of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in pericardial fluid of patients with angina pectoris. *Angiogenesis*. 1998;2:105-108.
63. Ikemoto M, Hasegawa K, Kihara Y, et al. Development of enzyme-linked immunosorbent assay for acidic fibroblast growth factor and its clinical application. *Clin Chim Acta*. 1999;283:171-182.
64. Sakai S, Miyauchi T, Sakurai T, et al. Endogenous endothelin-1 participates in the maintenance of cardiac function in rats with congestive heart failure. Marked increase in endothelin-1 production in the failing heart. *Circulation*. 1996;93:1214-1222.
65. Denver R, Tzanidis a, Martin P, et al. Salivary endothelin concentrations in the assessment of chronic heart failure. *Lancet*. 2000;355:468-469.
66. Cody RJ, Haas GJ, Binkley PF, et al. Plasma endothelin correlates with the extent of pulmonary hypertension in patients with chronic congestive heart failure. *Circulation*. 1992;85:504-509.
67. Matsushima K, Larsen CG, DuBois GC, et al. Purification and characterization of a novel monocyte chemotactic and activating factor produced by a myelomonocytic cell line. *J Exp Med*. 1989;169.
68. Rollins BJ, Walz A, Baggiolini M. Recombinant human MCP-1/JE induces chemotaxis, calcium flux, and the respiratory burst in human monocytes. *Blood*. 1991;78:1112-1116.
69. Jiang Y, Beller DI, G. F, et al. MCP-1 regulates adhesion molecule expression and cytokine production in human monocytes. *J Immunol*. 1992;148:2423-2428.
70. Carr MW, Roth SJ, Luther E, et al. Monocyte chemoattractant protein 1 acts as a T-Lymphocyte chemoattractant. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994;91:3652-3656.
71. Ban K, Ikeda U, Takahashi M, et al. Expression of intercellular adhesion molecule-1 on rat cardiac myocytes by monocyte chemoattractant protein-1. *Cardiovasc Res*. 1994;28:1258-1262.
72. Taub DD, Conlon K, Lloyd AR, et al. Preferential migration of activated CD4+ and CD8+ T-cells in response to MIP-1 alpha and MIP-1 beta. *Science*. 1993;260:355-358.

73. Allavena P, Bianchi G, Zhou G, et al. Induction of natural killer cell migration by monocyte chemotactic protein-1, -2 and -3. *Eur J Immunol.* 1994;24:3233-3236.
74. Kuna P, Reddigari SR, Rucinski D, et al. Monocyte chemotactic and activating factor is a potent histamine-releasing factor for human basophils. *J Exp Med.* 1992;175:489-493.
75. Tarzami S, Cheng R, Miao W, et al. Chemokine expression in myocardial ischemia: MIP-2 expression protects cardiomyocytes from cell death. *Mol Cell Cardiol.* 2002;34:209-921.
76. Ito WD, Arras M, Winkler B, et al. Monocyte chemotactic protein-1 increases collateral and peripheral conductance after femoral artery occlusion. *Circulation Research.* 1997;80:829-37.
77. Seino Y, Ileda U, Sekiguchi H, et al. Expression of leukocyte chemotactic cytokine in myocardial tissue. *Cytokine.* 1995;7:301-304.
78. Lehmann H, Kühnert H, Müller S, et al. MCP-1 gene expression in dilated cardiomyopathy. *Cytokine.* 1998;10, No. 10:739-746.
79. Aukrust P, Ueland T, Lien E, et al. Cytokine network in congestive heart failure secondary to ischemic or idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am J Cardiol.* 1999;83:376-383.
80. Burgess AW, Camakaris J, Metcalf D. Purification and properties of colony stimulating factor from mouse lung conditioned medium. *J Biol Chem.* 1977;252.
81. Metcalf D. The granulocyte-macrophage colony stimulating factors. *Science.* 1985;229:16-22.
82. Burgess AW, Metcalf D. The nature and action of granulocyte-macrophage colony stimulating factors. *Blood.* 1980;56:947-958.
83. Stahl CP, Winton EF, Munroe MC, et al. Recombinant human granulocyte-macrophage colony stimulating factor promotes megacaryocyte maturation in nonhuman primates. *Exp Hematol.* 1991;19:810-6.
84. Mc Niece IK, Stewart FM, Deacon DM, et al. Synergistic interactions between hematopoietic growth factors as detected by in vitro mouse bone marrow colony formation. *Exp Hematol.* 1988;16:383-388.

85. Welte K, Bonilla MA, Gillio AP, et al. Recombinant human Granulocyte colony-stimulating factor: effects on hematopoiesis in normal and cyclophosphamid-treated pirmates. *J Exp Med*. 1987;165:941-948.
86. Donahue RE, Wang FA, Stone DK, et al. Stimulation of haematopoiesis in primates by continious infusion of recombinant GM-CFS. *Nature*. 1986;32:872-875.
87. Filonzi EL, Zoellner H, Stanton H, et al. Cytokine regulation of GM-CSF and M-CSF produktion in human arterial smooth muscle cells. *Artherosclerosis*. 1993;99:241-252.
88. Gough NM, al. e. Structure and expression of the mRNA for murine GM-CSF. *EMBO J*. 1985;4:645-653.
89. Cantrell MA, al. e. Cloning, sequence, and expression of human GM-CSF. *Proc Natl Acad Sci*. 1985;82:6250-6254.
90. Gearing DP, al. e. Expression cloning of a receptor for human GM-CSF. *EMBO J*. 1989;8:3667-3676.
91. Chiba S, al. e. Characterization and molecular features of the cell surface receptor for human GM-CSF. *Leukaemie*. 1990;4:29-36.
92. Nakata K, Akawaga KS, Fukayama M, et al. GM-CSF promotes the proliferation of human alveolar macrophages in vitro. *J Immunol*. 1991;147:1266-1272.
93. Metcalf D. The molecular control of cell division, differentiation commitment and maturation into haemopoietic cells. *Nature*. 1989;339:27-30.
94. Metcalf D. Control of granulocytes and macrophages: molecular, cellular, and clinic aspects. *Science*. 1992;254:529-533.
95. Ölberg F, Botling J, Nilsson K. Macrophages and cytokine network. *Transplant Proc*. 1993;25:2044-2047.
96. Nathan CF. Secretory products of Macrophages. *J Clin Invest*. 1987;79:319-326.
97. Clark SC, Kamen R. The human hematopoietic colony-stimulating factors. *Science*. 1987;236:1229-1237.
98. Regis T, Costello. Therapeuthic use of GM-CSF. *Acta Oncologica*. 1993;32:403-408.

99. Ishibashi T, Yokoyama K, Shindo J, et al. Human GM-CSF lowers the level of plasma cholesterol with an increase in mRNA for very low density lipoprotein receptor in rabbits. *Ann N Y Acad Sci.* 1995;748:630-633.
100. Nimer SD, R. C, Golde DW. Serum cholesterol-lowering activity of GM-CSF. *JAMA.* 1988;260:3297-3300.
101. Plenz G, Koenig C, Severs NJ, et al. Smooth muscle cells express GM-CSF in the undiseased and atherosclerotic human coronary artery. *Arteriosclerosis thrombosis & Vascular Biology.* 1997;17 (11):2489-2499.
102. Levi-Schaffer F, Lacy P, Servers NJ, et al. Association of GM-CSF with the crystalloid granules of human eosinophils. *Blood.* 1995;85:2579-2586.
103. deWeck AL, Kristensen F, Landy M. Biochemical characterization of lymphokines: Proceeding of the second international lymphokine workshop. *Academic, New York.* 1980.
104. Janeway CA, Travers P. *Immunologie*: Spektrum Akademischer Verlag; 1997.
105. Dinarello CA. Proinflammatory Cytokines. *Chest.* 2000;118:503-508.
106. Opal SM, DePalo VA. Anti-inflammatory cytokines. *Chest.* 2000;117:1162-1172.
107. Kasai T, Inada K, Takakuwa T, et al. Anti-inflammatory cytokine levels in patients with septic shock. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol.* 1997;98:34-42.
108. Masini E, Giannella E, Bianchi S, et al. Histamine and lactate dehydrogenase (LDH) release in ischemic myocardium of the guinea-pig. *Agents Actions.* 1987;203:281-283.
109. Dinarello CA. IL-1, IL-1 receptors and IL-1 receptor antagonist. *Int Rev Immunol.* 1998;16:457-499.
110. Kuhl U, Noutsias M, Seeberg B, et al. Chronic inflammation in the myocardium of patients with clinically suspected dilated cardiomyopathy. *J Card Fail.* 1994;1:13-25.
111. Kuhl U, Noutsias M, Seeberg B, et al. Immunological evidence for a chronic intramyocardial inflammatory process in dilated cardiomyopathy. *Heart.* 1996;75:295-300.

112. Pauschinger M, Doerner A, Remppis A, et al. Differential myocardial abundance of collagen type III mRNA in dilated cardiomyopathy: effects of myocardial inflammation. *Cardiovasc Res.* 1998;37:123-129.
113. Devaux B, Scholz D, Hirche A, et al. Upregulation of cell adhesion molecules and the presence of low grade inflammation in human chronic heart failure. *Eur Heart J.* 1997;18(3):470-479.
114. Kilian PL, Kaffka KL, Stern AS, et al. Interleukin 1 alpa and interleukin 1 beta bind the same receptor on T cells. *J Immonol.* 1986;136:4509-4514.
115. Dinarello CA. The interleukin-1 family: 10 years of discovery. *FASEB J.* 1994;8:1314.
116. Long CS, Palmer JN, Hartogensis W, et al. Hypoxia stimulates interleukin-1 RNA expression by cardiac non-myocytes in culture. *Clin res.* 1993;41.
117. Akira S, Hirano T, Taga T, et al. Biology of multifunctional cytokines: IL 6 and relates molecules (IL 1 and TNF). *FASEB J.* 1990;4:2860-2867.
118. Roux-Lombard P. The interleukin-1 family. *European Cytokine Network.* 1998;9:565-76.
119. Shirakawa F, Tanaka Y, Ota T, et al. Exression of IL-1 receptors on human peripheral T cells. *J. Immunol.* 1987;138:4243.
120. McMahan CJ, Slack JL, Mosley B, et al. A novell IL-1 receptor, cloned B cells by mammalian expression, is expressed in many cell types. *EMBO J.* 1991;10:2821.
121. Dinarello CA. Biology of IL-1. *FASEB J.* 1988;2:108-115.
122. Lord PCW, Wilmoth LMG, Mizel SB, et al. Expression of IL-1 alpa and beta genes by human blood polymorphonuclear leukocytes. *J Clin Invest.* 1991;87:1312-1321.
123. Loppnow H, Libby P. Proliferating interleukin 1 activated human vascular smooth muscle cells secrete copius interleukin 6. *J Clin Invest.* 1990;85:731-738.
124. Sharma HS, Das DK. Role of cytokines in myocardial ischemie and reperfusion. *Mediators of inflammation.* 1997;6(3):175-183.
125. Nakagawa M, Terracio L, Carver W, et al. Expression of collagenase and IL-1 alpha in develpoing rat heart. *Dev Dyn.* 1992;195 (2):87-99.

126. Nogae C, Makino N, Hata T, et al. Interleukin 1 alpha-induced expression of manganous superoxide dismutase reduces myocardial reperfusion injury in the rat. *J Mol Cell Cardiol.* 1995;27:2091-2099.
127. Francis SE, Holden H, Holt CM, et al. Interleukin-1 in myocardium and coronary arteries of patients with dilated cardiomyopathy. *Journal of Molecular & Cellular Cardiology.* 1998;30:215-23.
128. Tsujino M, Hirata Y, Imai T, et al. Induction of Nitric oxide synthase gene by interleukin-1 β in cultured rat cardiomyocytes. *Circulation.* 1994;90:375-383.
129. Weisensee D, Bereiter HJ, Schoeppe W, et al. Effect of cytokines on the contractility of cultured cardiac myocytes. *Int J Immunopharmacol.* 1993;15:321-330.
130. Beasley D, McGuiggin M. IL-1 activates soluble guanylate cyclase in human vascular SMC through a novel nitric oxide-dependent pathway. *J Exp Med.* 1994;179:71.
131. Balligand J-L, Ungureanu-Longrois D, Simmons WW, et al. Cytokine-inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression in cardiac myocytes. *J Biol Chem.* 1994;269:27580-27588.
132. Balligand J-L, Kelly RA, Marsden PA, et al. Control of cardiac muscle cell function by an endogenous nitric oxide signaling system. *Proc Natl Acad Sci.* 1993;90:347-351.
133. Roberts AB, Roche NS, Winokur TS, et al. Role of TGF- β in maintenance of function of cultured neonatal cardiac myocytes. Autocrine action and reversal of damaging effects of IL-1. *J Clin Invest.* 1992;90:2056-2062.
134. Sharma HS, Zimmermann R. Growth factors and development of coronary collaterals. In: Cummis P, ed. *Growth factors and the cardiovascular system*: Kluwer Academic Publishers; 1993:119-148.
135. Clinton SK, Fleet JC, Loppnow H, et al. Interleukin-1 gene expression in rabbit vascular tissue in vivo. *American Journal of Pathology.* 1991;138:1005-14.
136. Shioi T, Matsumori A, Kihara Y, et al. Increased expression of interleukin-1 beta and monocyte chemoattractant and activating factor/monocyte chemoattractant protein-1 in the hypertrophied and failing heart with pressure overload. *Circ Res.* 1997;81:664-71.

137. Han RO, Ray PE, Baughman KL, et al. Detection of interleukin and interleukin-receptor mRNA in human heart by polymerase chain reaction. *Biochem Biophys Res Comm.* 1991;181:520-523.
138. Palmer JN, Hartogensis WE, Patten M, et al. IL-1 β induces cardiac myocyte growth but inhibits fibroblast proliferation. *J Clin Invest.* 1995;95:2555.
139. Bendtzen K. Interleukin 1, interleukin 6 and tumor nekrosis factor in infection, inflammation and immunity. *Immunol Lett.* 1988;19:183-192.
140. Hirano T. Interleukin-6. In: Thompson A, ed. *The Cytokine Handbook*. Boston: Academic Press; 1991.
141. Hennein HA, Ebba H, Rodriguez JL, et al. Relationship of the porinflammatory cytokines to myocardial ischemia and dysfunction after uncomplicated coronary revascularization. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1994;108:626-635.
142. Yamauchi TK, Ihara Y, Ogata A, et al. Hypoxic stress induces cardiac myocyte-derived interleukin-6. *Circulation.* 1995;91:1520-1524.
143. Geiger T, Andus T, Iaproph J, et al. Induction of acute phase-proteins by interleukin 6 in vivo. *Eur J Immunol.* 1988;18:717-721.
144. Hirano T, Yasukawa K, Harada H, et al. Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin. *Nature.* 1986;324:73-76.
145. Morimoto S, Nabata T, Koh E, et al. Interleukin-6 stimulates proliferation of cultured vascular smooth muscle cells independently of interleukin-1 β . *J Cardiovas Pharmacol.* 1991;17(suppl 2):S177-188.
146. Kukiella GL, Youker KA, Hawkins HK, et al. Regulation of ICAM-1 and IL-6 in myocardial ischemia: effect of reperfusion. *Ann N Y Acad Sci.* 1994;723:258-270.
147. Munger MA, Johnson B, Amber IJ, et al. Circulating concentration of proinflammatory cytokines in mild or moderate heart failure secondary to ischemic or diated cardiomyopathy. *Am J Cardiol.* 1996;77:723-727.
148. Tsutamoto T, Hisanaga T, Wada A, et al. IL-6 spillover in the peripheral circulation increases with severity of the heart failure, and the high plasma level of IL-6 is an important prognostic predictor in patients with congestive heart failure. *J Clin cardiol.* 1998;31:391-398.

149. Kunisada K, Hirota H, Fujio Y, et al. Activation of JAK-STAT and MAP kinases by leukemia inhibiting factor through gp130 in cardiac myocytes. *Circ.* 1996;94:2626-2632.
150. Pennica D, Shaw KJ, Swanson TA, et al. Biological activities and binding to the leukemia inhibitory factor receptor/gp 130 signaling complex. *J Biol Chem.* 1995;275:10915-10922.
151. Kim JM, Brannan CI, Copeland NG, et al. Structure of the mouse IL-10 gene and chromosomal localizatin of the mouse and human genes. *J Immunol.* 1992;148:3618-3623.
152. Moore KW, O'Garra A, de Waal Malefyt R, et al. Interleukin-10. *Rev Immunol.* 1993;11:165-190.
153. Liu Y, Wei SHY, Ho ASY, et al. Expression, cloning and characterization of a human IL-10 receptor. *J Biol Chem.* 1994;152:1821-1819.
154. Tan JC, Braun S, Rong H, et al. Characterization of recombinant extracellular domain of human interleukin-10 receptor. *J Biol Chem.* 1995;152:12906-12911.
155. Goldman M, Velu T, Pretolani M. Interleukin-10. Actions and therapeutic potentials. *Biodrugs.* 1997;7:6-14.
156. de Waal Malefyt R, Haanen J, Spits H, et al. IL-10 and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. *J Exp Med.* 1991;174:915-924.
157. Mallat Z, Heymes C, Ohan J, et al. Expression of IL-10 in advanced human atherosclerotic plaques: relation to inducible nitric oxide synthase expression and cell death. *Arterioscler thromb Vasc Biol.* 1999;19:611-616.
158. Uyemura K, Demer LL, Castel SC, et al. Cross-regulatory roles of IL-12 and IL-10 in atherosclerosis. *J Clin Invest.* 1996;97:2130-2138.
159. Pinderski Oslund LJ, Hedrick CC, Olvera T, et al. IL-10 blocks atherosclerotic events in vitro and in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999;19:2847-2853.
160. Mallat Z, Besnard S, Duriez M, et al. Protective role of IL-10 in artherosclerosis. *Circ Res.* 1999;85:e17-25.

161. Marriott JB, Goldman JH, Keeling PJ, et al. Abnormal cytokine profiles in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy and their asymptomatic relatives. *Heart*. 1996;75:287-290.
162. Yokota T, Otsuka T, Mosmann T, et al. Isolation and characterization of a human interleukin cDNA clone, homologous to mouse B cell stimulatory factor-1, that expresses B cell-stimulatory activities. *Proc Nat Acad Sci*. 1986;83:5894.
163. Nelms K, Keegan AD, Zamorano J, et al. The IL-4 receptor: signaling mechanisms and biologic function. *Annu Rev Immunol*. 1999;17:701-738.
164. Chomarat P, Bancherau J. An update on interleukin-4 and its receptors. *Euro Cytokine Network*. 1997;8(4):333-344.
165. Thornhill MH, Wellicome SM, Mahiouz DL, et al. TNF combines with IL-4 or INF-gamma to selectively enhance endothelial cell adhesiveness for T cells. The contribution of vascular cell adhesion molecule-1-dependent and-independent binding mechanisms. *J Immunol*. 1991;146:592.
166. Sato Y, Takatsu Y, et al. Serial circulating concentrations of CPR, IL-4, and IL-6 in patients with left heart decompensation. *Clin Cardiol*. 1999;22:811-813.
167. Minty A, Chalon P, Deroq JM, et al. IL-13 is a new human lymphokine regulating inflammation and immune responses. *Nature*. 1993;362:248-50.
168. Zurawski G, de Vries JE. IL-13, an IL-4-like cytokine that acts on monocytes and B cells, but not on T cells. *Immunol Today*. 1994;15:19-26.
169. Aversa G, Punnonen J, Cocks BG, et al. An IL-4 mutant protein inhibits both IL-4 or IL-13-induced human immunoglobulin G4 (IgG4) and IgE synthesis and B cell proliferation: Support for a common component shared by IL-4 and IL-13 receptors. *J Exp Med*. 1993;178:2213.
170. Zurawski SM, Vega FJ, Huyghe B, et al. receptors for IL-13 and IL-4 are complex and share a novel component that functions in signal transduction. *EMBO J*. 1993;12:2663.
171. Murata T, Husain SR, Mohri H, et al. Two different IL-13 receptor chains are expressed in normal human skin fibroblasts, and IL-4 and IL-13 mediate signal transduction through a common pathway. *Int Immunol*. 1998;10:1103-1110.

172. Obiri NI, Debinski W, Leonard WJ, et al. Receptor for IL-13. Interaction with IL-4 by a mechanism that does not involve the common gamma chain share by receptors for IL-2, 4, 7, 9, and 15. *J Biol Chem*. 1995;270:8797-8804.
173. Debinski W, Miner R, Leland P, et al. receptor for IL-13 does not interact with IL-4 but receptor for IL-4 interacts with IL-13 on human glioma cells. *J Biol Chem*. 1996;271:22428-22433.
174. Husain SR, Obiri NI, Gill P, et al. Receptor for IL-13 on AIDS-associated Kaposi's sarcoma cells serves as a new target for a potent Pseudomonas exotoxin-based chimeric toxin protein. *Clin Cancer Res*. 1997;3:151-156.
175. McKenzie ANJ, Culpepper JA, de Waal Malefy R, et al. IL-13, a T-cell-derived cytokine that regulates human monocyte and B-cell function. *Proc Natl Acad Sci*. 1993;90:3735.
176. Masson S, Latini R, Bevilacqua M, et al. Within-patient variability of hormone and cytokine concentrations in heart failure. *Pharmacol Res*. 1998;37 (3):213-217.
177. Tracey KJ, Cerami A. Tumor necrosis factor: a pleiotropic cytokine and therapeutic target. *Ann Rev Med*. 1994;45:491-503.
178. Heller RA, Kronke M. Tumor necrosis factor receptor-mediated signaling pathway. *J Cell Biol*. 1994;126:5-12.
179. Tartaglia LA, Weber RF, Figari IS, et al. The two different receptors for tumor necrosis factor mediate distinct cellular responses. *Proc Natl acad Sci*. 1991;88:9292-9296.
180. Wiegmann K, Schutze S, Kampen E, et al. Human 55-kDa receptor for tumor necrosis factor coupled to signal transduction cascades. *J Biol Chem*. 1992;267:17997-18001.
181. Rothe J, Gehr G, Loetscher H, et al. TNF receptors- structure und function. *Immunol Res*. 1992;11:81-90.
182. Aukrust P, Lien E, Kristofferson AK, et al. Persistent activation of the TNF system in a subgroup of patients with common variable immunodeficiency - possible immunological and clinical consequences. *Blood*. 1996;87:674-681.
183. Bendtzen K. Cytokines and natural regulators of cytokines. *Immunol Lett*. 1994;43:111-123.

184. Bonavida B. Tumor necrosis factor: structure, mechanism of action, role in disease and therapy. *Basel*: Granger, G.; 1990.
185. Torre-Amione G, Kapadia S, Lee J, et al. Expression and functional significance of TNF receptors in myocardium. *Circulation*. 1995;92:1487-1493.
186. Torre-Amione G, Kapadia S, Lee J, et al. TNF-alpha and TNF receptors in failing human heart. *Circulation*. 1996;93:704-711.
187. Ikeda U, Ikeda M, Kano S, et al. Neutrophil adherence to rat cardiac myocyte by proinflammatory cytokines. *J Cardiovas Pharmacol*. 1994;23:647-652.
188. Sherry B, Cerami A. Cachectin/tumor necrosis factor exerts endocrine, paracrine, and autocrine control of inflammatory response. *J Cell Biol*. 1988;107:1269-1277.
189. Kapadia S, Oral H, Lee J, et al. Hemodynamic regulation of tumor necrosis factor-alpha gene and protein expression in adult feline myocardium. *Circ Res*. 1997;81:187-195.
190. Kapadia S, Lee JR, Torre-Amione G, et al. TNF gene and protein expression in adult feline myocardium after endotoxin administration. *J Clin Invest*. 1995;96:1042-1052.
191. Maury CP, Tempo AM. Circulation of TNF-Alpha (cachectin) in myocardial infarction. *Am J Pathol*. 1989;139:709-715.
192. Herkowitz A, Choi S, Ansari AA, et al. Cytokine mRNA expression in postischemic/reperfused myocardium. *Am J Pathol*. 1995;146:419-428.
193. Eddy IJ, Goeddel DV, Wong GH. TNF-alpha pretreatment is protective in a rat model of myocardial ischemia-reperfusion injury. *Biochem Biophys Res Comm*. 1992;184:1056-1059.
194. Higuchi Y, Otsu K, Nishida K, et al. Involvement of reactive oxygen species-mediated TNF-kappa B activation in TNF-alpha-induced cardiomyocyte hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol*. 2002;34:233-240.
195. Yokoyama T, Nakano M, Bednarczyk J, et al. Tumor necrosis Factor-alpha provokes a hypertrophic growth in adult cardiac myocytes. *Circulation*. 1997;95:1247-1252.

196. Yokoyama T, Vaca L, Rossen VD, et al. Cellulare basis of the negative inotropic effect of human necrosis factor-alpha in the adult mammalian heart. *J Clin Invest.* 1993;92:2303-2312.
197. Pagani FD, Baker LS, Hsi C, et al. Left ventricular systolic and diastolic dysfunction after infusion of TNF-alpha in conscious dogs. *J Clin Invest.* 1992;90:389-398.
198. Bozkurt B, Kribbs S, Clubb FJJ, et al. Pathophysiological relevant concentrations of TNF-alpha promote progressive left ventricular dysfunction and remodeling in rats. *Circ.* 1998;97:1382-1391.
199. Murray DR, Freeman GL. TNF-alpha induces a biphasic effect on myocardial contractility in conscious dogs. *Circ Res.* 1996;78:154-160.
200. Deswal A, Bozkurt B, Seta Y, et al. Safety and efficacy of a soluble p75 TNF receptor (Enbrel, Etanercept) in Patients with advanced heart failure. *Circulation.* 1999;99:3224-3226.
201. Bozkurt B, Torre-Amione G, Warren MS, et al. Results of targeted anti-TNF therapy with entanercept (ENBREL) in patients with advanced heart failure. *Circulation.* 2001;103:1044.
202. Li W, Gan R, Sun G. Chronic treatment of enbrel in rats with isoproterenol-induced congestive heart failure limits left ventricular dysfunction and remodeling. *Chin Med J (Engl).* 2002;115:1166-1169.
203. de'Clari F, Salani I, Safwan E, et al. Sudden death in a patient without heart failure after a single infusion of 200 mg Infliximab: does TNF-alpha have protective effects on the failing heart, or does Infliximab have direct harmful cardiovascular effects? *circulation.* 2002;105:e183.
204. Reichardt P, Dahnert I, Tiller G, et al. Possible activation of an intramyocardial inflammation process (Staphylococcus aureus) after treatment with infliximab in a boy with Crohn disease. *European Journal of Pediatrics.* 2002;161:281-283.
205. Redaktion. Einschränkungen für Infliximab (Remicade). *Arznei-Telegramm.* 2002;33:24.
206. Lisman K, Stetson S, Koerner M, et al. The role of tumor necrosis factor alpha blockade in the treatment of congestive heart failure. *Congest Heart Fail.* 2002;8:275-279.

207. Wunsch M, Sharma HS, Markert T, et al. In situ localization of TGF- β 1 in procine heart: Enhances expression after chronic coronary artery constriction. *J Mol Cell Cardiol.* 1991;23:1051-1062.
208. Eghbali M. Cellular origin and distribution of transforming growth factor β in the normal rat myocardium. *Cell Tissue Res.* 1989;256:553-558.
209. Thompson NL, Basoberry F, Spier EH, et al. TGF- β 1 in acute myocardial infarction in rats. *Growth Factor.* 1988;1:91-99.
210. Lefer AM, Tsao P, Aoki N, et al. Mediation of cardioprotection by TGF- β . *Science.* 1990;249:61-64.
211. Bogdan C, Paik J, Vodovotz y, et al. Contrasting mechanisms for suppression of macrophage cytokine release by TGF- β and IL-10. *J Biol Chem.* 1992;267:23301-23308.
212. Wahl S. TGF- β in inflammation: a cause and a cure. *J Clin Immunol.* 1992;12:61-74.
213. Mustoe TA, Pierce GF, Thomason A, et al. Accelerated healing of incisional wounds in rats induced by TGF- β . *Science.* 1987;237:1333-1336.
214. Folkman J, Shing Y. Angiogenesis. *J Biol Chem.* 1992;267:10931-10934.
215. Roberts AB, Sporn MB, Assoian RK, et al. TGF- β : Rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro. *Proc Natl Acad Sci.* 1986;83:4167-4171.
216. Chen MM, Lam A, Abraham JA, et al. TGF Expression is induced by TGF- β in cardiac Fibroblasts and cardiac myocytes: a potential role in heart fibrosis. *J Mo Cell Cardiol.* 2000;32:1805-1819.
217. Sanderson N, factor v, Nagy P, et al. Hepatic expression of mature transforming growth factor beta 1 in transgenic mice results in mulible tissue lesions. *Proc Natl Acad Sci.* 1995;92:2572-2576.
218. Lefer AM. Mechanism of the protective effect of TGF- β in reperfusion injury. *Biochem Pharmacol.* 1991;42:1323-1327.
219. Roberts AB, Sporn MB. Physiological action and clinical applications of TGF- β . *Growth Factors.* 1993;8:1-9.
220. Stryer L. *Biochemie.* 4 ed: Spektrum Akademischer Verlag; 1999.

221. McCoy MT, Aguanno JJ, Ritzmann SE. Lactate dehydrogenase isoenzyme 1. A rapid assay for ischemic myocardial disease. *Arch Intern Med.* 1983;143:434-436.
222. Miltner E, Fiehn W, Schmidt G. Diagnostic value of LDH, CK, GOT, Gamma-GT, activities in pericardial fluid. *Zeitschrift für Rechtsmedizin.* 1989;102:25-32.
223. Stewart RV, Zumwalt RE, Hirsch CS, et al. Postmortem diagnosis of myocardial disease by enzyme analysis of pericardial fluid. *Am J Clin Pathol.* 1984;82:411-417.
224. Luna A, Villanueva E, Castellano M, et al. The determination of CK, LDH and its isoenzymes in pericardial fluid and its application to the postmortem diagnosis of myocardial infarction. *Forens Sci Int.* 1981;19:85-91.
225. Luna A, Villanueva E. Valeur du liquide pericardique dans le diagnostic de la mort subite et du temps probable d'agonie. *J Med Leg Droit med.* 1982;25:373-384.
226. Long CS. The role of IL-1 in the failing heart. *Heart Failure Rev.* 2001;6:81-94.
227. Fosse E, Mollnes TE, Ingvaldsen B. Complement activation during major operations with cardiopulmonary bypass. *J Thoracic Cardiovasc Surg.* 1987;93:860-866.
228. Tanaka T, Hasegawa K, Fujita M, et al. Marked elevation of brain natriuretic peptide levels in pericardial fluid is closely associated with left ventricular dysfunction. *J Am Coll Cardiol.* 1998;31:399-403.
229. Nathan C, Sporn M. Cytokines in context. *J Cell Biol.* 1991;113:981-986.

8. Danksagung

An dieser Stelle danke ich all denen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, ganz herzlich.

Mein besonderer Dank gilt Frau Professor Dr. Dr. h. c. Jutta Schaper für ihre sehr herzliche und intensive Betreuung im Verlauf der Erstellung dieser Dissertation. Ohne ihre kompetente und fürsorgliche Unterstützung hätte diese Arbeit nicht fertiggestellt werden können.

Herrn Dr. rer. nat. Thomas Kubin danke ich für die Überlassung des Themas und die Einweisung in die erforderlichen Labortechniken, Herrn Dr. med. Stefan Hain für das Bereitstellen der gesammelten Perikardergüsse.

Herrn Gerd Stämmeler danke ich für kompetente Hilfe bei der elektronischen Datenverarbeitung, sowie Frau Annemarie Möbs für das Abfotografieren der Gele.

Frau Natascha Scholz danke ich für ihre Unterstützung und Hilfsbereitschaft während der Laborarbeiten und Dr. med. vet. Marie-Luise von Brühl für die freundschaftliche und prompte Hilfe beim Umgang mit den diversen Computerprogrammen während des Verfassens dieser Arbeit.

Weiterhin danke ich allen, die diese Arbeit in Teilen oder insgesamt Korrektur gelesen haben.

Besonders wertvoll war mir auch der liebevolle tatkräftige und moralische Beistand meines Mannes, meiner Eltern und meiner Schwester während der gesamten Zeit.

9. Curriculum vitae

Name: Negin Peters, geb. Sharifzadeh Mohaddam

Geburtsdatum: geboren am 27.02.1976 in Teheran/Iran als erste von zwei Töchtern

Eltern: Jalal Sharifzadeh Moghaddam und Zhila Rezvani

Familienstand: seit 15.07.2000 verheiratet mit Nicolai Peters

Ausbildung:

1982-1983	Grundschule, Teheran/Iran
1984-1986	Grundschule, Nieder-Rosbach
1986-1988	Humboldt-gymnasium, Bad Homburg
1988-1995	Augustinerschule Friedberg
19.06.1995	Abitur
1995- 1996	Freiwilliges Jahr des Dienstes in Haifa/Israel
1996-2002	Studium der Humanmedizin an der Justus–Liebig-Universität Gießen
17.09.1998	Ärztliche Vorprüfung
13.04.2000	Erstes Staatsexamen
12.09.2001	Zweites Staatsexamen
21.10.2002	Drittes Staatsexamen
seit 1999	Dissertation am Max-Planck-Institut für physiologische und klinische Forschung, Abteilung Experimentelle Kardiologie, in Bad Nauheim