

Jürgen Knapp
Dr. med.

Dielektrische Spektroskopie als Methode zur Analyse der elektrischen Zellentkopplung am Mäuseherzen unter Ischämie

Geboren am 06.11.1976 in Heilbronn
Staatsexamen am 18.11.2004 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Chirurgie
Doktormutter: Prof. Dr. med. M.-M. Gebhard

Myokardischämie führt zu einem Verschluss der kardialen Gap Junctions. Die Messung des ischämiebedingten Gap Junction Verschlusses ist jedoch bislang an intaktem Myokard nicht möglich. Da die elektrische Entkopplung zwischen den Herzmuskelzellen jedoch eine Ursache der kardialen Rhythmusstörungen im Rahmen einer Myokardischämie sein könnte, war es Ziel der vorliegenden Arbeit, zu prüfen ob sich die dielektrische Spektroskopie zur Analyse des Gap Junction-Verschlusses eignet.

Versuchsmodell war das Myokard der Maus. Zunächst wurden die Veränderungen des dielektrischen Spektrums während einer Stop-Flow-Ischämie gemessen und durch ein elektrisches Modell beschrieben. Parallel wurden Myokardzellen zu verschiedenen Ischämiezeitpunkten durch intrazelluläre Injektion mit dem Fluoreszenzfarbstoff Lucifer Yellow, LY, beladen, der - wie aus Untersuchungen an von gepaarten Myozyten bekannt - unter der Voraussetzung offener interzellulärer Gap Junctions auf zellulärem Weg von Zelle zu Zelle diffundiert. Die zelluläre Ausbreitung des LY in Nachbarzellen wurde jeweils fluoreszenzmikroskopisch analysiert und mit dem Zeitverlauf der Dielektrizitätszahl des Gewebes korreliert.

Alle Herzen wurden vor Beginn der Ischämie mit einer modifizierten Ringerlösung perfundiert, die zur Induktion eines Herzstillstands 20 mmol/l Kalium enthielt (Gruppe KCL; n=10). In einer Gruppe wurde dieser Lösung 3 mmol/l des Gap-Junction-Blockers Heptanol (Gruppe HEP; n=4), in einer weiteren Gruppe 20 µmol/l Palmitoleinsäure hinzugefügt, das ebenfalls als Entkoppler gilt (Gruppe PA; n=7). Bei drei Mäusen wurde das dielektrische Spektrum während Perfusion mit heptanolhaltiger kardioplegischer Lösung gemessen. Zusätzlich wurde in 36 Mäuseherzen der Gehalt von ATP, Kreatinphosphat und Laktat im Ischämieverlauf gemessen, um diese Größen, die nach der Literatur direkt oder indirekt Einfluss auf die elektrische Leitfähigkeit der Gap Junctions haben sollen, mit den Veränderungen des dielektrischen Spektrums zu korrelieren.

Die Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen: Die Simulationsrechnungen ergaben, dass ein Verschluss der Gap Junctions mit einem Anstieg der Dielektrizitätszahl bei 13 kHz einhergehen sollte. Diese Veränderung zeigten die Spektren der Mäuseherzen während Ischämie ebenfalls. Nach einem primären „unteren“ Plateau und nachfolgend einem sigmoiden Anstieg erreichte die Dielektrizitätszahl in Gruppe KCL nach 61 ± 22 min Ischämie, in Gruppe PA nach 45 ± 7 min und in Gruppe HEP schon während der Perfusion ein zweites „oberes“ Plateau. Während in den Gruppen KCL und PA zu Beginn der Ischämie während des unteren Plateaus der Dielektrizitätszahl noch intrazelluläre Diffusion von LY in benachbarte Herzmuskelzellen stattfand, die Gap Junctions demnach noch offen waren, war dies in der Gruppe HEP nicht möglich. Die Gap Junctions wurden durch Heptanol somit unmittelbar entkoppelt. Sobald die Dielektrizitätszahl – bei fortschreitender Ischämie – in das obere Plateau einlief, diffundierte jedoch auch in den Gruppen KCL und PA kein Farbstoff mehr in benachbarte Zellen. Die Entkopplung erfolgte in der Gruppe KCL nach 64 ± 26 min, in der Gruppe PA nach 40 ± 11 min globaler Ischämie. Es zeigte sich, dass zwischen dem Zeitpunkt des Einlaufens der Dielektrizitätszahl in das obere Plateau und dem Ende der Farbstoffdiffusion durch Gap Junctions im ischämischen Myokard eine sehr gute Korrelation besteht ($R^2=0,95$).

Die vorliegende Arbeit belegt somit, dass der Anstieg der Dielektrizitätszahl im passiven dielektrischen Spektrum des Herzmuskels während Ischämie durch das Verschließen der interzellulären Gap Junctions verursacht wird. Damit eignet sich die dielektrische Spektroskopie als Methode zur Analyse der elektrischen Zellentkopplung durch Gap Junction-Verschluss und eröffnet die Möglichkeit, Regelfaktoren der Gap Junctions zu untersuchen sowie die pathophysiologische Bedeutung der zellulären Entkopplung im Verlauf einer Myokardischämie auch am intakten Organ zu analysieren.