

Aus der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin B
(Direktor Univ.-Prof. Dr. Stephan Felix)
der Universitätsmedizin der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald

Weiterentwicklung eines Zellmodells zur Untersuchung der ischämischen Prä- und Postkonditionierung

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des akademischen
Grades
Doktor der Medizin
(Dr. med.)
der
Universitätsmedizin
der
Ernst-Moritz-Arndt-Universität
Greifswald
2012

vorgelegt von
Marie Louise Frenzel
Geboren am 17.10.1984
in Dresden

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. Heyo K. Kroemer

1. Gutachter: Prof. Dr. St. Felix

2. Gutachter: Prof. Dr. K. Stangl

Ort, Raum: Seminarraum O 0.88 der Klinik und Poliklinik für
Innere Medizin B, Universitätsmedizin Greifswald

Tag der Disputation: 30.01.2013

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----------|
| I. EINLEITUNG | 8 |
| I.1. DER MYOKARDINFARKT | 8 |
| I.2. VORGÄNGE WÄHREND DER ISCHÄMIE UND REPERFUSION | 9 |
| I.3. DIE ISCHÄMISCHE PRÄKONDITIONIERUNG (<i>ISCHEMIC PRECONDITIONING</i> , <i>IPC</i>)..... | 11 |
| I.3.1. <i>Triggerphase</i> | 12 |
| I.3.2. <i>Mediatorphase</i> | 13 |
| I.4. DIE POSTKONDITIONIERUNG..... | 14 |
| I.5. ZELLMODELL ZUR ERFORSCHUNG DER PRÄ- UND POSTKONDITIONIERUNG | 15 |
| I.6. AUFGABENSTELLUNG | 16 |
| II. MATERIAL UND METHODEN | 17 |
| II.1. MATERIAL | 17 |
| II.1.1. <i>Chemikalien</i> | 17 |
| II.1.2. <i>Verbrauchsmaterialien</i> | 17 |
| II.1.3. <i>Geräte</i> | 18 |
| II.1.4. <i>Medien & Lösungen</i> | 18 |
| II.1.5. <i>Verwendete Zelllinien</i> | 20 |
| II.2. METHODEN | 20 |
| II.2.1. <i>Zellkultivierung</i> | 20 |
| II.2.2. <i>Zellen einfrieren</i> | 21 |
| II.2.3. <i>Zellen auftauen</i> | 22 |
| II.2.4. <i>Messmethode: Durchflusszytometrie</i> | 22 |
| II.2.5. <i>Versuche</i> | 23 |
| II.2.6. <i>FACS-Versuche mit Propidiumiodid</i> | 26 |
| II.2.7. <i>Angaben zur Statistik</i> | 27 |
| III. ERGEBNISSE | 28 |
| III.1. DIE MESSUNG VON ZELLEN AM FACS-GERÄT | 28 |
| III.2. VERSUCHE MIT NEONATALEN RATTENKARDIOMYOZYTEN | 30 |
| III.3. HL-1 ZELLEN IM VERSUCHSMODELL I | 32 |
| III.3.1. <i>Der NO- und Häm-unabhängige lösliche Guanylylzyklaseaktivator</i> | 34 |
| III.3.2. <i>Der Mineralokortikoid-Rezeptor-Antagonist Eplerenon</i> | 36 |
| III.4. HL-1 ZELLEN IM VERSUCHSMODELL II | 38 |
| III.4.1. <i>Der sGC-Aktivator BAY 58-2667 im neuen Modell</i> | 40 |
| III.5. APOPTOSEVERSUCH VON HL-1 ZELLEN MIT PROPIDIUMIODID | 42 |
| IV. DISKUSSION | 44 |
| IV.1. WARUM IST EIN ZELLMODELL NOTWENDIG? | 44 |
| IV.2. NEONATALE RATTENKARDIOMYOZYTEN UNTER OXIDATIVEM STRESS | 45 |
| IV.3. HL-1-ZELLEN | 46 |
| IV.4. MODULATION DES HL-1-ZELL-MODELLS UNTER KALZIUMIONOPHORSTRESS | 48 |
| IV.5. PROPIDIUMIODID – EINE ALTERNATIVE | 49 |
| IV.6. AUSBLICK | 50 |
| V. ZUSAMMENFASSUNG | 51 |

| | |
|--|-----------|
| VII. ANHANG | 58 |
| VII 1. EINSTELLUNGEN DES FACS-GERÄTS..... | 58 |
| VII. 2. ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE DER FACS-VERSUCHE: | 59 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---------------------------|---|
| % (v/v) | Volumenprozent |
| % (w/v) | Volumenbezogenes Massenprozent |
| °C | Grad Celsius |
| A. dest. | Destilliertes Wasser |
| A _{1/2a/2b/3} AR | Adenosin A ₁ /A _{2a} /A _{2b} /A ₃ -Rezeptor |
| Abb. | Abbildung |
| ACh | Acetylcholin |
| Akt | Proteinkinase B |
| ANP | atriales natriuretisches Peptid |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| bzw. | Beziehungsweise |
| ca. | Circa |
| Ca ²⁺ | Kalzium |
| CaCl ₂ | Kalziumchlorid |
| cGMP | Zyklisches Guanylylmonophosphat |
| D-PBS | <i>Dulbecco's Phosphate buffered saline</i> |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DT-2 | <i>YGRKKRRQRRRPP-LRK₅H-amide</i> |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| EGF | <i>Epidermal growth factor</i> / epidermaler Wachstumsfaktor |
| EGFR | <i>Epidermal growth factor receptor</i> |
| ERK | <i>Extracellular-signal regulated kinase</i> |
| et al. | <i>et alteri</i> / und andere |
| FACS | <i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i> |
| FCS | <i>Fetal calf serum</i> / Fetales Kälberserum |
| (s)GC | <i>(soluble) guanylyl cyclase</i> / (lösliche) Guanylatzyklase |
| GPCR | <i>g-protein coupled receptor</i> / G-Protein gekoppelter Rezeptor |
| GSK-3β | Glykogensynthase-3β |
| h | Stunde |

| | |
|---------------------------------|--|
| H ⁺ | Wasserstoffkation |
| HB-EGF | <i>Heparin binding –EGF-like growth factor</i> |
| H ₂ O ₂ | Wasserstoffperoxid |
| IPC | <i>Ischemic preconditioning</i> / Ischämische Präkonditionierung |
| IPost | <i>Ischemic postconditioning</i> / Ischämische Postkonditionierung |
| KCl | Kaliumchlorid |
| K ₂ HPO ₄ | Dikaliumhydrogenphosphat |
| KH ₂ PO ₄ | Kaliumdihydrogenphosphat |
| MgSO ₄ | Magnesiumsulfat |
| min | Minute |
| mitoK _{ATP} | mitochondrialen ATP-abhängigen Kaliumkanals |
| mPTP | <i>Mitochondrial permeability transition pore</i> |
| MR | Mineralokortikoidrezeptor |
| Na ⁺ | Natriumion |
| NaCl | Natriumchlorid |
| NaHCO ₃ | Natriumhydrogenkarbonat |
| NO | <i>Nitric oxide</i> / Stickstoffmonoxid |
| NOS | Stickstoffmonoxid-Synthase |
| NRCM | Neonatale Rattenkardiomyozyten |
| O ₂ | Sauerstoff |
| ODQ | <i>1H-[1,2,4]oxadiazolo-[4,3-a]quinoxalin-1-one</i> |
| PDE-5-Hemmer | Phosphodiesterase-5-Hemmer |
| pH | Negativer dekadischer Logarithmus der H ⁺ -Ionenkonzentration |
| PI | Propidiumiodid |
| PI3-K | Phosphatidylinositol-3-Kinase |
| PKB, C, G | Proteinkinase B, C, G |
| PTCA | <i>Percutaneous transluminal coronary angioplasty</i> |
| RISK | <i>Reperfusion injury salvage kinases</i> |
| RNS | <i>Reactive nitrogen species</i> / reaktive Stickstoffspezies |
| ROS | <i>Reactive oxygen species</i> / reaktive Sauerstoffspezies |
| rpm | Umdrehungen pro Minute |
| SEM | <i>Standard error of the mean</i> / Standardfehler des Mittelwertes |

| | |
|----------------|----------------------------------|
| SR | Sarkoplasmatisches Retikulum |
| Tab. | Tabelle |
| TMRE | Tetraethylrhodaminethylester |
| $\Delta\Psi_m$ | Mitochondriales Membranpotential |

I. Einleitung

I.1. Der Myokardinfarkt

Ischämische Herzkrankheiten sind noch immer eine der häufigsten Todesursachen in den westlichen Industrieländern. Das statistische Bundesamt teilte mit, dass im Jahr 2010 bei über 41,1 % (352 689 Menschen) eine Erkrankung des Herz-/Kreislaufsystems zu Grunde lag. Dabei starben in dieser Kategorie insgesamt 59 107 Menschen an einem akuten Herzinfarkt (67).

Bei einem Infarkt kommt es durch eine anhaltende Ischämie zum Gewebeuntergang. Die Ischämie, auch Blutleere genannt, bezeichnet den Zustand einer unzureichenden Organperfusion aufgrund mangelnder oder gänzlich fehlender Blutzufuhr. Die häufigste Ursache dieser Störung sind thrombotische Gefäßverschlüsse infolge einer Arteriosklerose der versorgenden Gefäße. Dieser Vorgang kann jedes Organ befallen, so auch das Herz.

Das Behandlungsziel des Infarktes ist neben der symptomatischen Therapie eine schnelle Reperfusion des betroffenen Arterienabschnitts (revaskularisierende Therapie). Die klassische Methode ist hierbei die medikamentös durchgeführte Lyse. Durch Applikation von fibrinolytischen Substanzen, wie z.B. Streptokinase, kommt es zur Auflösung des intrakoronar gelegenen Gerinnsel (Thrombus) und damit zur Wiederdurchblutung. Während der Lyse kann es jedoch zu lebensbedrohlichen Blutungskomplikationen (z.B. Hirnblutungen) oder allergischen Reaktionen kommen. Zudem gibt es zahlreiche Patienten, bei denen diese Therapie kontraindiziert ist, also nicht empfohlen wird.

Alternativ kann eine *PTCA* (*percutaneous transluminal coronary angioplasty*), auch Ballondilatation genannt, eingesetzt werden. Dabei wird mit Hilfe der Seldinger-Technik ein kleiner Ballon arteriell bis in die Herzkranzgefäße geschoben und das verlegte oder verengte Gefäßlumen durch den Ballon aufgedehnt. Gleichzeitig kann zur Verhinderung eines Wiederverschlusses ein *Stent* (kleines röhrenförmiges Implantat) eingesetzt werden. Die Erfolgsraten liegen bei 90-95 %, obgleich eine höhere Restenoserate gegenüber der Lyse zu verzeichnen ist. Auch hier sind lebensbedrohliche Komplikationen bekannt, z.B. Gefäßdissektionen (ein teilweiser Einriss der Gefäßwandschichten) oder gar eine Perforation des Gefäßes. Eine dritte Methode ist die Bypass-Operation, bei der die Überbrückung der Stenose, z.B. durch eine anderswo entnommene Vene oder Arterie erfolgt. Diese Methode birgt ebenfalls ein hohes Risiko für chirurgische und anästhetische Komplikationen (68).

I.2. Vorgänge während der Ischämie und Reperfusion

Bereits vor Jahrzehnten beobachteten Reimer und Jennings, dass bei einer Ischämie nicht alle Zellen zeitgleich absterben, sondern die Nekrose sich mit zunehmender Ischämiedauer vom Subendokard zum Subepikard ausbreitet (1;2). Folglich ist die schnellstmögliche Wiederdurchblutung des ischämischen Areal (Reperfusion) die bisher einzige wissenschaftlich erwiesene Möglichkeit, den tatsächlichen Gewebeschaden einzuschränken (3). Es wurde jedoch gezeigt, dass auch die Reperfusion eine schädliche Wirkung für die ischämischen Zellen hat. So beobachtete Jennings zellmorphologische Veränderungen, wie Schwellungen der Herzmuskelzellen (Kardiomyozyten), Aufklaren von Mitochondrien, flockige, aus Kalzium-Phosphatablagerungen bestehende Verdichtungen im Zytosol, eine zelluläre Hyperkontraktion und den Verlust der strukturellen Sarkomeranordnung (4). Erstaunlicherweise führte die Reperfusion mit oxygeniertem Puffer zu einem stärkeren Zelluntergang als eine hypoxische Lösung. Diese Entdeckung wurde „*oxygen paradox*“ genannt (5). So brauchen ischämische Zellen zwar einerseits den Sauerstoff, um ihre normalen Stoffwechselfunktionen wieder ausführen zu können, andererseits kommt es durch die Wiederdurchblutung zur weitergehenden Schädigung von Herzzellen (6).

Die Forschungsgruppe um Piper unterschied daraufhin folgende Arten der Schädigung des ischämischen Gewebes: Als erste Gruppe beschreibt er die mechanische Dysfunktion ohne das Vorhandensein irreversibler Zellschäden, „*myocardial stunning*“ genannt. Diese bleibt trotz annähernd normalem Koronarfluss bestehen und kann bis Tage nach der Reperfusion anhalten (7;8). Trotz adäquater Wiederöffnung der verschlossenen Arterie setzt in manchen kleineren Gefäßen keine vollständige Reperfusion ein. Dieses „*no-reflow*“-Phänomen wurde zuerst in anderen Organsystemen entdeckt, ließ sich dann aber auch im Herzen nachweisen (9). Drittens können hypoxisch induzierte Arrhythmien das ischämische Herz beeinträchtigen. Eine vierte Art der Zellschädigung ist der tödliche Reperfusionsschaden. Dieser ist dadurch definiert, dass Zellen, die während der Ischämie nur reversibel verletzt wurden, durch Vorgänge während der Reperusionsphase absterben. Grund dafür sind die massiven Veränderungen der Zellhomöostase, insbesondere die Wiederherstellung der Energiereserven und die schnelle Normalisierung der Gewebosmolalität und des pH-Wertes.

Während der Ischämie können die Kardiomyozyten nicht mehr ausreichend von dem Energieträger Adenosintriphosphat (ATP) erzeugen. Es kommt zum Absinken der ATP-

Konzentration und Erliegen vieler Stoffwechselfvorgänge, z.B. der Ionentransportaktivität. Dadurch steigen unter anderem auch die intrazellulären Kalzium- und Natriumkonzentrationen an, wie in Abbildung I.1.a) schematisch dargestellt. Die Kalziumüberladung aktiviert davon abhängige Proteasen und Phospholipasen, die zelluläre Strukturveränderungen bewirken. Durch den erhöhten Natriumspiegel strömt osmotisch bedingt Wasser vom natriumarmen Extrazellulärraum in die Zelle. Dies führt zu deren Schwellung und aufgrund des beeinträchtigten Zytoskeletts zum Zerreißen ihrer Membran (3). Nebenher induziert die Umstellung des Zellmetabolismus auf anaerobe Energiegewinnung eine Akkumulation von anorganischen Phosphaten, Laktat und Wasserstoffmolekülen (10). Der erniedrigte pH-Wert kann zu dem Ionenungleichgewicht beitragen.

Wie in Abbildung I.1.b) gezeigt, wird in der Reperfusionphase durch erneute Bereitstellung von molekularem Sauerstoff und metabolischen Substraten, die für die ATP-Produktion verantwortliche mitochondriale Elektronentransportkette, reaktiviert. Es kommt zur massiven Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) und Anschalten von Transportproteinen, wie der Kalzium-ATPase des Sarkoplasmatischen Retikulums (SR) und der Natrium/Kalium-ATPase des Sarkolemm. Der erhöhte Kalziumspiegel bewirkt eine intrazelluläre Umverteilung des überschüssigen Kalziums zwischen Zellorganellen und Zytosol, was die Gesamtkonzentration nicht vermindert. Diese Verschiebungen können nur durch das Wiedereinsetzen der Kalziumauswärtstransporter, wie z.B. dem Natrium/Kalzium-Austauscher, beendet werden. Dieser funktioniert abhängig vom transsarkolemmalen Natriumgradienten. Schafft es die Zelle nicht, den Gradienten nach der Ischämie wieder herzustellen, arbeitet der Kanal im so genannten „Rückwärtsmodus“, was die intrazelluläre Natriumkonzentration senkt, wodurch im Gegenzug aber noch mehr Kalzium in die Zelle strömt. Eine massive Kalziumüberladung kann dann bei Anwesenheit von genug Energieträgern zu so schweren zytoskelettalen Veränderungen führen, wie sie unter nicht ischämischen Bedingungen nicht beobachtet werden können. Da sich der pH-Wert im extrazellulären Raum schneller normalisieren kann als in der Zelle, entsteht ein beachtlicher Wasserstoff-Gradient. Zum Ausgleich werden u.a. der Natrium/Wasserstoff-Austauscher und der Natrium/Hydrogencarbonat-Symporter aktiviert, was zu einem vermehrten Einstrom an Natriumionen führt und damit sowohl der Behebung der Kalziumüberladung entgegenwirkt, als auch die Wasserstoffkonzentration senkt. Die Gesamtkonstellation aus mitochondrialer Kalziumüberladung, ROS-Produktion und steigendem pH-Wert induziert die Öffnung der

sog. mitochondrialen Permeabilitätstransitionsporen (*mitochondrial permeability transition pore*, mPTP) (11). Unter normalen zellulären Bedingungen und bei niedrigem pH-Wert, wie z.B. während der Ischämie, bleiben diese Poren verschlossen. Die Öffnung der mPTP bewirkt einen Wassereinstrom, was zu einer Schwellung der Organelle führt. Die innere Mitochondrienmembran ist vielfach gefaltet und kann sich dem erhöhten Druck anpassen, nicht so die Äußere. Es kommt demnach zum Zerreißen der äußeren Membran und zahlreiche intermembranös befindliche Substanzen strömen in das Zytosol, unter anderem Cytochrom c und proapoptotische Faktoren, wodurch der programmierte Zelltod induziert wird (12).

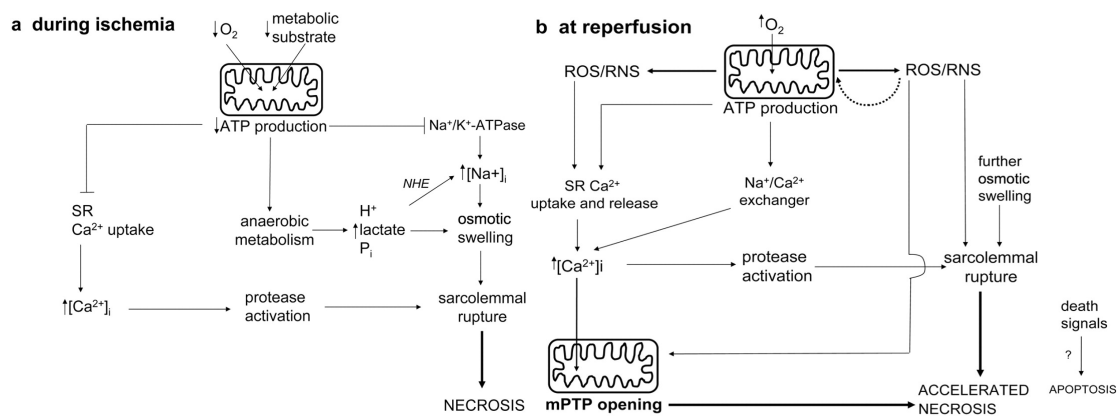


Abb. I.1. Schemata über die schädigenden Effekte von Ischämie und Reperfusion: a) Die während der Ischämie durch den Ausfall von Ionenpumpen anfallenden Kationen führen über eine Zellschwellung und Aktivierung von Proteasen und Phospholipasen zum Zelltod. b) In der Reperfusion kommt es durch den steigenden Sauerstoffgehalt zu gestörten Kationenverhältnissen, Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies und erhöhtem pH-Wert. Diese Umstände begünstigen die Öffnung der mPTP, was zum Zelltod führt (13).

I.3. Die ischämische Präkonditionierung (*ischemic preconditioning*, IPC)

Auf der Suche nach einer Möglichkeit den Umfang des nekrotischen Gewebes zu reduzieren, gelang Murry und seiner Forschungsgruppe 1986 ein Meilenstein. Mit Hilfe von 4 Zyklen 5-minütiger Ischämie im Wechsel mit 5-minütiger Reperfusion vor einer längeren Ischämiephase (Indexischämie) konditionierten sie das Herz erfolgreich, schematisch in Abbildung I.2. dargestellt. Durch diese der Ischämie vorgeschaltete Behandlung, auch ischämische Präkonditionierung (IPC) genannt, fielen die Infarktareale nach einer 40-minütigen Blutleere signifikant kleiner aus, als bei der nicht präkonditionierten Kontrollgruppe (14).



Abb. I.2. Darstellung des zeitlichen Verlaufs einer ischämischen Präkonditionierung: Die unterlegten Flächen stellen die Ischämiephasen dar. Murry etablierte das Modell von 4 Zyklen 5 min Ischämie, gefolgt von 5 min Reperfusion vor der 40 min langen Ischämiephase (14).

Während der kurzen Ischämie-Reperfusion-Zyklen werden Signalwege aktiviert, die zum ausgeprägten Schutz führen. Deren Komponenten werden in Trigger und Mediatoren unterteilt. Bei Triggern handelt es sich um Faktoren, die während der 5-minütigen Zyklen vor der Indexischämie freigesetzt werden und schützende Mechanismen initiieren. Dagegen stellen Mediatoren Faktoren dar, die während der Indexischämie agieren und den kardioprotektiven Schutz während der Reperfusion vermitteln (15).

I.3.1. Triggerphase

Als erstes wurde 1991 von Liu et al. die Beteiligung des G_i -Protein gekoppelten Adenosin- A_1 -Rezeptors (A_1 -AR) während der kurzen ischämischen Zyklen bestätigt (16). Später wurden zwei weitere Triggersubstanzen entdeckt, Bradykinin (17) und Opioide (18), die sich in der Signaltransduktion zu Adenosin parallel geschaltet darstellen. Diese Triggersubstanzen arbeiten mit Hilfe von G_i -Protein gekoppelten Rezeptoren (*G-protein coupled receptor* GPCR). Auch andere Substanzen, die eigentlich nicht an der Signaltransduktion dieser Zellen beteiligt sind, können den Schutz vermitteln, so z.B. Katecholamine, Angiotensin II und Endothelin (19). Als gemeinsames Zielprotein aller Triggerwege wurde die Proteinkinase C (PKC) identifiziert (20-22). Die Schutzwirkung blieb noch 1-2 h aktiv, nachdem die Triggersubstanzen bereits ausgewaschen wurden, was das Vorhandensein einer Signalkaskade annehmen ließ (15). Im Jahr 2000 wurde durch Pain et al. die Hypothese aufgestellt, dass die Stimulation der o.g. Rezeptoren das Öffnen eines mitochondrialen ATP-abhängigen Kaliumkanals (mitoK_{ATP}) verursacht, was zur Herstellung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) in den Mitochondrien führt, die wiederum PKC aktivieren (23).

Die Signaltransduktionswege der einzelnen Triggersubstanzen sind verschieden und schematisch in der Abbildung I.3. dargestellt. So resultiert die Stimulation von muskarinergen

Rezeptoren, z.B. durch Acetylcholin (ACh) in der Transaktivierung des EGF-Rezeptors. Die Bindung des Liganden an den GPCR bewirkt die Aktivierung von Matrix-Metalloproteinasen, die von der membranständigen pro-HB-EGF HB-EGF abspalten, welches wiederum den EGFR aktiviert. Die mit der Aktivierung des EGFR verbundene Dimierisierung und Autophosphorylation führt zur Rekrutierung von Src-Kinasen, die PI3-K (Phosphatidylinositoltriphosphat-Kinase) in einen angeregten Zustand versetzen kann.

ACh ist kein physiologischer Trigger der IPC, weil es im ischämischen Herz nicht vermehrt gebildet wird (24). Jedoch konnte gezeigt werden, dass der über Opioide vermittelte Schutz ebenfalls abhängig von Metalloproteinasen und EGFR vermittelt wird. Unabhängig von Src, der Tyrosin-Kinase oder der PI3-Kinase, vermittelt Adenosin die Schutzwirkung und aktiviert die PKC scheinbar direkt, wobei es den Schritt der ROS-Entstehung umgeht (25).

Über Phospholipid-abhängige Kinasen aktiviert die PI3-Kinase weitere Enzyme, wie z.B. die Proteinkinase B, auch Akt genannt (26). Diese Enzymkonstellation wurde frühzeitig von Hausenloy in seiner Beteiligung an der IPC erforscht (27) und *reperfusion injury salvage kinases* (RISK) genannt (28;29). Akt stimuliert bekanntlich die *nitric oxide synthase* (NOS) zur Stickstoffmonoxidproduktion (NO) (30). NO ist ein Aktivator der Guanylylzyklase (GC), die durch Produktion von zyklischem Guanosinmonophosphat (cyclic guanosine monophosphate, cGMP) die Proteinkinase G (PKG) aktiviert (19). Im Jahr 2005 wies Costa et al. nach, dass die Zugabe von exogenem PKG und cGMP zu isolierten Mitochondrien zur Öffnung von $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ führt (31). Durch den offenen Kanal strömt Kalium in das Mitochondrium, was zur Schwellung der Organelle führt. Auf bisher unbekanntem Weg kommt es konsekutiv zur Produktion der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) (32). Entgegen der früheren Annahme, ROS würde nur zum Reperfusionsschaden beitragen, wurde nun gezeigt, dass es als *second messenger* agiert und für das Einleiten von Redox-Reaktionen in verschiedenen Systemen verantwortlich ist (21;33). Das Ziel dieses Signalweges ist, genau wie der von Adenosin, das Enzym PKC (34).

I.3.2. Mediatorphase

Durch verschiedene Studien konnte gezeigt werden, dass Adenosin-Rezeptoren, im speziellen Typ A_2 (A_2 -AR), an der Reperusionsphase beteiligt (35) und hinter der PKC geschaltet sind (36). Wie bereits oben beschrieben, verhindert die ischämische Präkonditionierung die Bildung von mitochondrialen Poren (mPTP) (37;38). Die Bildung dieser Poren wird hochgradig durch die Inaktivierung der Glykogen-Synthase-Kinase-3 beta (GSK-3 β)

gehemmt. GSK-3 β kann durch PKC direkt oder indirekt über ERK oder die PI3-Kinase phosphoryliert und damit inaktiviert werden (39).

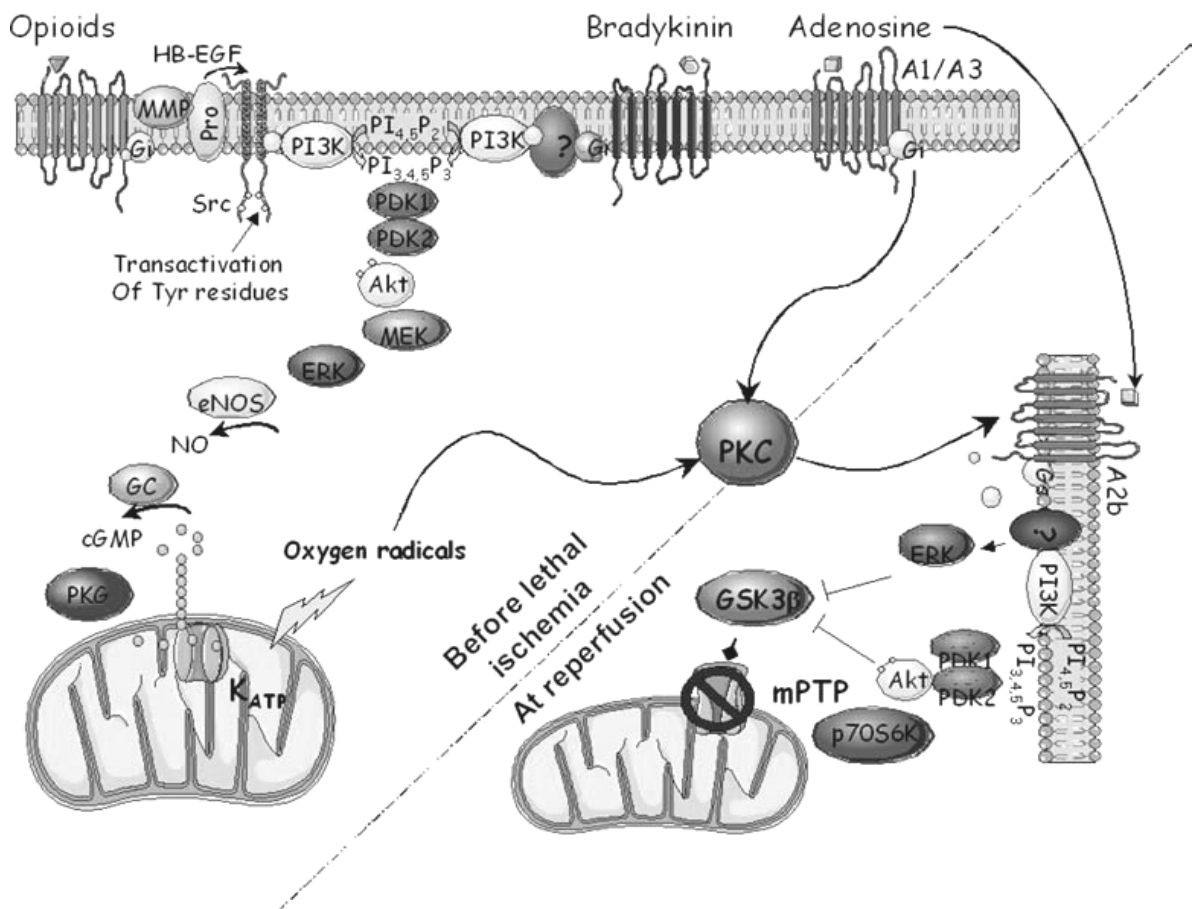


Abb. I.3. Schematische Darstellung der Signalwege der Triggersubstanzen. Opioiden und Bradykinin führen über verschiedene Zwischenschritte zur Öffnung eines mitochondrialen unselektiven Kaliumkanals, der über eine Mitochondrienschwellung die Bildung von radikalischen Sauerstoffspezies auslöst. Diese aktivieren, wie auch Adenosin auf direktem Weg, die Proteinkinase C. Es folgt in der Reperfusion über Aktivierung von A₂-AR die Hemmung der GSK-3 β und somit die Verhinderung der mPTP-Formation (40).

I.4. Die Postkonditionierung

Trotz dieser Erkenntnisse und der positiven experimentellen Ergebnisse konnten Herzinfarktpatienten bisher nicht von der Präkonditionierung profitieren, da man diese dem Infarkt vorschaltet. Dementsprechend müsste der Patient bereits vor Auftreten der ersten Symptome einer Behandlung unterzogen werden, was nicht praxistauglich ist.

Zhao et al. zeigte 2003, dass kurze Ischämie/Reperfusion-Zyklen zu Beginn der Reperfusion nach einer längeren ischämischen Periode durchgeführt, zu einer ähnlich guten

Infarktgrößenreduzierung führte, wie die ischämische Präkonditionierung (41). Dieses als ischämische Postkonditionierung bezeichnete Phänomen führt durch autakoide Trigger zur Aktivierung einer Signalkaskade mit ähnlichen Elementen wie in der IPC, z.B. Adenosin, Bradykinin, Opioide, PI3-K, PKC, sGC, ERK und $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ -Kanäle. (42).

Neben der mechanischen Postkonditionierung, die sich für den medizinischen Alltag recht aufwändig gestaltet, konnte ein ähnlicher Effekt durch die Verabreichung von Pharmaka erreicht werden (pharmakologische Postkonditionierung). Diese Substanzen stimulieren oder blockieren Schritte der oben beschriebenen Signalkaskade und erreichen dadurch eine vergleichbare Infarktgrößenreduktion. Zuerst konnte dieser Effekt im Experiment durch die Triggersubstanzen Adenosin (16), Opioide (43) und Bradykinin (20) ausgelöst werden, viele weitere Substanzen folgten. Mit der zunehmenden Erforschung der Signalkaskade wurde es möglich auch direkt auf Zwischenschritte Einfluss zu nehmen, z.B. durch den GSK3- β -Inhibitor SB 216763 (39), der Guanylylzyklaseaktivator BAY 58-2667(44) oder dem PDE-5-Hemmer Vardenafil (45;46).

1.5. Zellmodell zur Erforschung der Prä- und Postkonditionierung

In den ersten Versuchsmodellen im Rahmen der Prä- und Postkonditionierung wurde die osmotische Fragilität in isolierten Kardiomyozyten untersucht. Die Zellen wurden zentrifugiert, der Überstand entfernt und dann mit einer dünnen Schicht Mineralöl bedeckt, die keinen Sauerstoff hindurch ließ. Die zerstörten Zellen wurden dann mittels Trypan-Blau gefärbt und detektiert. Dieses Modell reagierte auf viele bekannte Triggersubstanzen, jedoch konnte nicht ausgeschlossen werden, dass die geschädigten Zellen eher aufgrund der osmotischen Instabilität zu Grunde gingen, als durch die mPTP-Formation (47).

In einem weiterentwickelten Modell wurden Herzzellen direkt Stoffen ausgesetzt, die eine Öffnung der mPTP bewirken. Ein solcher Stoff ist Wasserstoffperoxid. Die Detektion des Zelltodes erfolgte mit Hilfe des Farbstoffes TMRE, der abhängig vom transmitochondrialen Membranpotential fluoresziert (48;49).

Durch die Entdeckung, dass die ATP-sensitiven Kaliumkanäle sich in der inneren Membran befinden und Kalium verantwortlich für die Osmoseregulation der Mitochondrien ist, konnte ein weiteres Modell etabliert werden (50). Hierbei können reaktive Sauerstoffspezies (ROS) quantifiziert werden, die bei der Öffnung des o.g. Kaliumkanals und der damit verbundenen Mitochondrienschwellung entstehen (51). ROS oxidiert den Farbstoff mitotracker red, der dadurch zu fluoreszieren beginnt und detektierbar wird.

I.6. Aufgabenstellung

Die Prä- und Postkonditionierung, mechanisch wie pharmakologisch, eröffnet eine Möglichkeit die Infarktareale eines Patienten deutlich zu vermindern. Bisher haben diese Verfahren aufgrund von Schwierigkeiten in der Umsetzung, unerwünschten Nebeneffekten oder mangelnder Studienlage noch keinen relevanten Einzug in den klinischen Alltag erhalten (52).

Das Ziel dieser Arbeit ist die Weiterentwicklung eines Versuchsmodelles, das die Zellen nah an die intrazellulären Vorgänge während der Ischämie und Reperfusion bringt. Als Grundlage dienten sowohl Herz- als auch herzförmige Zellen, die Bedingungen während der frühen Phase der Reperfusion, z.B. oxidativer Stress und Kalziumüberladung, ausgesetzt wurden, um so den Ablauf der Signalkaskade zu untersuchen. Im Fortgang sollen verschiedene pharmakologische Substanzen, wie z.B. GSK3- β -Inhibitoren in diesem Modell auf ihre protektive Wirkung getestet werden.

II. Material und Methoden

II.1. Material

II.1.1. Chemikalien

Alle nicht detailliert aufgeführten Chemikalien wurden von den Firmen Roth bezogen.

| Chemikalie | Firma | Niederlassung |
|---|-----------------------|----------------------|
| Cytosine β -D-Arabinofuranoside | Sigma | Dreisenhofen |
| Calcimycin A23187 | Sigma-Aldrich | Dreisenhofen |
| Claycomb-Medium | SAFC Bioscience | Lenexa, USA |
| D-PBS | PAA Laboratories GmbH | Pasching, OR |
| DT-2 | BioLog | Bremen |
| FACS Sheatsolution | Becton Dickinson | Heidelberg |
| FCS | Invitrogen | New York, USA |
| Fibronectin | Biochrom | Berlin |
| H ₂ O ₂ | Sigma-Aldrich | Dreisenhofen |
| L-Glutamin | PAA Laboratories GmbH | Pasching |
| MgSO ₄ | Sigma-Aldrich | Dreisenhofen |
| Medium 199 | Gibco BRL Life Tech. | |
| ODQ | Sigma-Aldrich | Dreisenhofen |
| Penizillin-Streptomycin | Invitrogen | |
| SB 216763 | Biomol | Hamburg |
| Solution A, Cellwash | Becton Dickinson | Heidelberg |
| Solution B, FACS Rinse | Becton Dickinson | Heidelberg |
| Tetramethylrhodaminethyl-ester | MolecularProbes Inc. | Eugene, OR |
| Trypsin/EDTA (0,05 %/ 0,02 % in PBS) | PAN Biotech GmbH | Aidenbach |
| Vardenafil | Bayer HealthCare GmbH | Wuppertal |

II.1.2. Verbrauchsmaterialien

| Produkt | Firma | Niederlassung |
|--|-------------------------------|----------------------|
| Eppendorfcups | Eppendorf | Hamburg |
| Kulturflaschen TissuecultureFlasks 75 cm ² | CELLSTAR® Greiner bio- one | Frickenhausen |
| Kulturflaschen TissuecultureFlasks 25 cm ² | CELLSTAR® Greiner bio- one | Frickenhausen |
| 15 ml Falcons | Becton Dickinson | Heidelberg |

| | | |
|---|---|-----------------------------|
| 50 ml Falcons Vier-Kammer-Deckgläser | Becton Dickinson Lab-Tek, Brand Products | Heidelberg New York, USA |
|---|---|-----------------------------|

II.1.3. Geräte

| Gerät | Firma | Niederlassung |
|--------------------------------------|--|------------------------|
| Analysewaage | Saroriun AG | Göttingen |
| Brutschrank | MMM Group | München |
| Brutschrank | Hareus Instruments, BBD, 6220 | Hanau |
| CASY [®] 1 Zellanalysegerät | Schärfe System GmbH | Reutlingen |
| FACS | Becton Dickinson | Heidelberg |
| Mikroskop | Axiovert 25; Zeiss | Jena |
| Mikroskop | Nikon Eclipse TE 300 Fluoreszenzmikroskop | Washington DC, USA |
| Rührer | mr 3000; Heidolph | Schwabach |
| Schüttler | duomax 3000; Heidolph | Schwabach |
| Sterilbank | HERAsafe; Hareus | Hanau |
| Stickstoffwegfrierer | ChronosBiosafe [®] | Düsseldorf |
| Wasserbad | Bachofer | Reutlingen |
| Zentrifuge | Biofuge; FrescoHeraeus | Hanau |
| Zentrifuge | Megafuge; FrescoHeraeus | Hanau |
| Zentrifuge | Rotixa 120R; Hettich AG | Ramsey, Minnesota, USA |

II.1.4. Medien & Lösungen

| Medium | Zusammensetzung |
|-----------------------|--|
| Kulturmedium Claycomb | <ul style="list-style-type: none"> • 500 ml Claycomb-Medium • 10 % (v/v) FCS • 3,24 mM L-Glutamin • 200 U/ml Penizillin-200 µg/ml Streptomycin |
| HL-1 Hungermedium | <ul style="list-style-type: none"> • 450 ml Claycomb-Medium • 3,24 mM L-Glutamin • 200 U/ml Penizillin-200 µg/ml Streptomycin |
| Stresspuffer für HL-1 | <ul style="list-style-type: none"> • Aqua dest. • 1,26 mM CaCl₂ • 0,81 mM MgSO₄ • 0,44 mM KH₂PO₄ • 0,27 mM K₂HPO₄ |

| | |
|--|---|
| | <ul style="list-style-type: none"> • 5,55 mM D-Glucose • 1 mM Orthovanadat • 142 mM KCl • 20 mM Hepes • 5 mM NaHCO₃ |
| Kontroll-Puffer für HL-1 | <ul style="list-style-type: none"> • Aqua dest. • 1,26 mM CaCl₂ • 0,81 mM MgSO₄ • 0,44 mM KH₂PO₄ • 0,27 mM K₂HPO₄ • 5,55 mM D-Glucose • 20 mM Hepes • 5 mM NaHCO₃ • 142 mM NaCl |
| Kulturmedium M199 | <ul style="list-style-type: none"> • 450 ml M199 • 10 % (v/v) FCS • 100 U/ml Penizillin-100 µg/ml Streptomycin • 10 µM Cytosine β-D-Arabinofuranoside • |
| Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS) | <ul style="list-style-type: none"> • Aqua bidest • 20 mM Natriumphosphat, pH 7,2 • 0,7 % (w/v) Natriumchlorid • |
| Einfriermedium | <ul style="list-style-type: none"> • 10 % (v/v) DMSO in FCS |

II.1.5. Verwendete Zelllinien

Für die unten beschriebenen Experimente wurden neonatale Rattenherzmyozyten und Zellen der HL-1 Linie verwendet.

Die ersten Experimente der simulierten Reperfusion wurden mit neonatalen Rattenkardiomyozyten (NRCM) durchgeführt. Dabei wurden die Zellen von 1 bis 2 Tage alten Harlan Wistar Ratten nach dem Protokoll von Wallukat und Wollenberger isoliert (53). Die fertig isolierten Zellen wurden uns freundlicherweise von der Forschungsgruppe um Staudt zur Verfügung gestellt.

Die HL-1 Zelllinie wurde von der Forschungsgruppe W.C. Claycomb von der atrialen, kardiomyozytären Tumorlinie AT-1 aus Mäusen abgeleitet. Die Zellen lassen sich ohne Verlust der morphologischen, biochemischen und elektrophysiologischen Eigenschaften passagieren, weshalb sie sich gut für die Untersuchungen eignen (54).

II.2. Methoden

Die Kultivierung aller Zellen erfolgte im Brutschrank bei konstanten 37°C und CO₂ Begasung (95 % O₂, 5 % CO₂). Alle verwendeten Lösungen wurden aufgrund der Kälteempfindlichkeit der Zellen im Wasserbad auf 37°C angewärmt. Sämtliche Zellkulturarbeiten fanden unter Sterilbänken statt.

II.2.1. Zellkultivierung

Neonatale Rattenkardiomyozyten (NRCM)

In 25 cm² großen Kulturflaschen wurden 4x10⁶ Zellen in 5 ml angereichertem Medium 199 (M199) kultiviert. Zur besseren Anhaftung der adhäsiven Zellen wurde der Boden der Zellkulturflaschen mit 1 mg/ml Fibronectin in 0,02 % Gelatine-Wasser-Lösung überschichtet. Der Mediumwechsel erfolgte 2-3-mal pro Woche. Dabei wurde zuerst das alte Medium aus den Flaschen gesogen und dann mit 2 ml D-PBS durch hin und her schwenken gewaschen. Danach wurden zügig neue 5 ml M199 eingefüllt und kultiviert. Eine Woche nach der Isolation wurde mit den Versuchen begonnen. Die Proliferation der Zellen wurde mit der Zugabe von Cytosine β-D-Arabinofuranoside durch eine Blockade der DNA-Synthese unterbunden. Die Zellen einer Zellkulturflasche wurden auf 2-3 Versuche aufgeteilt. Beim Verdünnen der Zellpopulation wurde zuerst das alte Medium abgesaugt und dann wie oben beschrieben mit D-PBS gewaschen. Nach Zugabe von 2 ml Trypsin-EDTA und

Inkubationszeit von 5 min wurden die noch nicht vom Boden gelösten Zellen mit Hilfe eines Zellschabers von der Unterfläche entfernt.

Zur Vorbereitung eines FACS-Versuchs wurden in beschichteten Vierkammerdeckgläsern pro Vertiefung 50 µl der Zell-Trypsin-Suspension zu 900 µl FCS-freiem M199 gegeben. Der nicht benötigte Anteil wurde in eine neue beschichtete Zellkulturflasche mit 5 ml angereicherten M199 überführt. Die bestückte Vierkammerplatte und die Zellkulturflaschen wurden weiterkultiviert.

HL-1 Zellen

Die HL-1 Zellen wurden ausschließlich mit angereichertem Claycomb-Medium versorgt. Pro 75 cm² Kulturflasche waren 15 ml Medium für ca. 24 Stunden vorgesehen. Beim täglichen Mediumwechsel wurde das alte Kulturmedium abgesaugt und der Zellrasen durch Schwenken mit 10 ml D-PBS gewaschen. Dann wurden langsam und zellschonend 15 ml frisches Claycomb-Medium eingefüllt. Sobald der Zellrasen den Boden der Flasche komplett bedeckte, wurden die Zellen ausgedünnt und/oder für Versuche wie unten beschrieben ausgesetzt. Die Zellen brauchten 3-4 Tage für einen optimalen Bewuchs. Beim Ausdünnen wurde der Zellrasen zunächst wieder durch Schwenken in 10 ml D-PBS gewaschen und durch Inkubation mit 5ml Trypsin-EDTA 5 bis 10 min vom Flaschenboden abgelöst. Im Anschluss wurde die Trypsinierung mit 10 ml Claycomb-Medium gestoppt und die Zellen gründlich resuspendiert. Die Aufteilung erfolgte im Verhältnis 1:2 oder 1:3, d.h. eine Flasche auf 2 oder 3 neue Zellkulturflaschen. Zur Aufzucht der Zellen wurde die gewonnene Suspension im Verhältnis 1:3, zur Ausdünnung der Zellen 1:2 verteilt. Die Zeitspanne des Trypsinierungsprozesses durfte nicht wesentlich überschritten werden, da sonst Zellschäden auftraten.

Zum Aussetzen der Zellen wurden Vierkammerdeckgläser bereitgestellt und die Zell-Trypsin-Medium-Suspension mit Hilfe eines Zellanalysegerätes so verdünnt, dass sich pro Wellvertiefung $0,5 \times 10^5$ Zellen in 500 µl angereichertem Claycomb-Medium befanden.

II.2.2. Zellen einfrieren

HL-1 Zellen

Die überwiegend konfluent bewachsene Zellkulturflasche wurde vom alten Medium befreit, mit 10 ml D-PBS gewaschen und zum Ablösen mit 5 ml Trypsin-EDTA für 5 min inkubiert. Nach Zugabe von 10 ml angereichertem Claycomb-Medium wurde die Zellsuspension in ein

50 ml fassendes Falcon überführt und bei 1400 rpm und 4°C für 10 min zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstandes wurde das Zellpellet in 4-6 ml Einfriermedium resuspendiert und 1 ml Aliquots in Kryoröhrchen überführt. Zunächst wurden die Zellen für 24 h bei -80°C eingefroren und anschließend dauerhaft in flüssigen Stickstoff eingelagert.

II.2.3. Zellen auftauen

HL-1 Zellen

Die in flüssigem Stickstoff gelagerten HL-1 Zellen wurden in einem 37°C warmen Ethanolbad wenige Minuten aufgetaut. Als die Lösung zum größten Teil flüssig war, wurden die Zellen unter einer Sterilbank noch einmal resuspendiert und in eine 75 cm² Kulturflasche mit 15 ml 37°C warmen angereicherten Claycomb-Medium überführt und konnten kultiviert werden.

II.2.4. Messmethode: Durchflusszytometrie

Beide Zellarten wurden mit Hilfe der FACS-Methode untersucht. Hierzu stand ein Durchflusszytometer FACSCalibur® zur Verfügung. Die Rohdaten wurden mit Hilfe der Software „CellQuest“ verarbeitet. Durch diese Messmethode konnten sehr flexibel Daten über Anzahl und die molekularen Eigenschaften der intakten Zellen gewonnen werden. Dazu wird eine Zellsuspension in einem Hüllstrom verdünnt und dann jede einzelne Zelle an einer rechtwinklig einfallenden Lichtquelle (15 mW Argonlaser (488 nm), 10 mW Diodenlaser (633 nm)) vorbei geführt. Dort, wo der Messstrom den Laser passiert, dienen die Streuung des anregenden Lichts und die Anregung von fluoreszenten Markern der gleichzeitigen Analyse von physikalischen und molekularen Eigenschaften der Zellen. Die Lichtstreuung der Zellen, die in einem sehr engen Winkel zum Laserlicht fällt, wird als Vorwärtsstreulicht (*forward scatter*, FSC) bezeichnet und stellt ein grobes Maß für die Größe der Zellen dar. Das im Winkel von 90° detektierte Streulicht wird als Seitwärtsstreulicht (*side scatter*, SSC) bezeichnet und vor allem durch intrazelluläre Kompartimente abgelenkt. Damit kann eine Aussage über Granularität und Binnenstruktur gemacht werden. Durch Farberteilerspiegel und Bandpassfilter werden die Emissionsspektren der verschiedenen Farbstoffe getrennt. Diese werden dann von Photomultipliern detektiert, welche mit zunehmenden spektralen Abstand des Anregungslichts aufsteigend nummeriert werden [Grünfluoreszenz (FL-1: 530 nm ± 15 nm), die Orangefluoreszenz (FL-2: 585 nm ± 21 nm) und die Rotfluoreszenz (FL-3: 650 nm ± 30 nm)]. Sie wandeln das detektierte Licht in elektrische Signale um. Die Lichtsignale werden

quantifiziert und für jede Zelle einzeln in einen Datenspeicher geschrieben. In einem weiteren Schritt werden die so gewonnenen Daten mit der oben genannten Software ausgewertet, in der zum Beispiel in einem zweidimensionalen Koordinatensystem bei bestimmten Parametern jeder Punkt einer analysierten Zelle entspricht. Es entstehen so genannte Punktwolken, die einer gewissen Zellpopulation entsprechen. Dieses Vorgehen ermöglicht, dass in wenigen Minuten 10.000 Zellen untersucht werden können. Die Punktwolken werden durch die Software in ein Koordinatensystem geordnet, so dass Graphen entstehen, die die Anzahl der Zellen bezogen auf die Fluoreszenzstärke darstellen.

Die hier verwendeten Zellen wurden mit Tetramethylrhodaminethylester (TMRE) angefärbt und der FL-2-Kanal für die Detektion der Daten gewählt. TMRE ist ein Indikator für das Membranpotential der Mitochondrien. TMRE ist ein kationischer Farbstoff, der die Zellmembran durchdringen kann und proportional zum mitochondrialen Membranpotential fluoresziert. Während in gesunden Zellen der Farbstoff in den Mitochondrien proportional zum mitochondrialen Membranpotential ($\Delta\Psi_m$) akkumuliert, wird er in apoptotischen, bzw. nekrotischen Zellen durch das verringerte Membranpotential nicht in diesem Maße aufgenommen, wodurch die Fluoreszenz nicht oder nur schwach detektiert wird (4,5). Die Messung wurde abgeschlossen, sobald entweder 10.000 fluoreszierende Zellen gezählt oder maximal eine Minute vergangen war.

II.2.5. Versuche

II.2.5.1. Vorbereitung der Zellen

Die Zellen wurden für die verschiedenen Experimente 16-18 h vor Beginn des Experimentes von den Kulturflaschen in Vierkammerplatten überführt. Nach 1½ Stunden waren die Zellen weitestgehend am Boden adhärirt. Zu diesem Zeitpunkt wurde das Kulturmedium durch 900 µl FCS-freies angereichertes Medium ersetzt, um sie für die anschließenden Versuche vorzubereiten.

II.2.5.2. Versuchsaufbau

Die Anzahl der zu bestückenden Vierkammerplatten ergab sich aus der Anzahl der Zeitpunkte, die gemessen wurden. Die Belegung der einzelnen Vertiefungen war abhängig von der Zahl der Gruppen, wie in Abb. II.1. dargestellt. Die erste Vertiefung stellte die Kontrollgruppe dar. Hierbei wurden Zellen weder mit der toxischen, noch schützenden Substanz behandelt (Kontrollgruppe). In die zweite Vertiefung wurde die Noxe zugesetzt, die eine Ischämie simulieren soll. In den hier beschriebenen Experimenten wurden Wasserstoffperoxid, das über eine Bildung freier Radikale die Zellen schädigt, und Calcimycin, ein Kalziumionophor, der eine Kalziumüberladung der Zelle verursacht, verwendet. Ein eventueller Agonist wurde in einer dritten Vertiefung zusammen mit der Noxe getestet. Unter einem Agonisten versteht man in diesem Falle einen Stoff, der vermeintlich den Schaden einer zelltoxischen Substanz auf molekularer Ebene verhindern oder hemmen kann. Ergänzend konnte die Wirkweise des Agonisten durch eine blockierende oder hemmende Substanz überprüft werden. Wenn Substanzen in Lösungsmitteln gelöst wurden, die einen möglichen Effekt auf die Zellen hatten, mussten sie den anderen Gruppen in gleicher Konzentration zugesetzt werden.

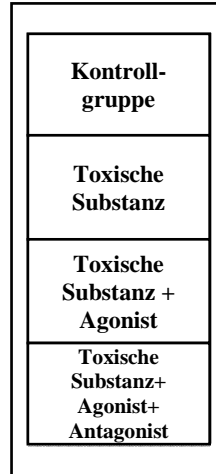


Abb. II.1. Die Bestückung einer Vierkammerplatte. In jeder Vertiefung befanden sich die gleiche Anzahl Zellen. Die erste Vertiefung diente als Kontrolle, die Zellen der zweiten Vertiefung wurden mit der toxischen Substanz inkubiert, einer weiteren wurde zur toxischen Substanz ein Agonist hinzugegeben und in einer vierten Gruppe wurde zusätzlich ein Antagonist zugesetzt.

II.2.5.3. Versuchsablauf

Die folgenden Schritte wurden nicht unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Zellen wurden zwischen den einzelnen Schritten unter den o.g. Brutschrankbedingungen gelagert. Im

ersten Schritt wurden alle mit Zellen versehenen Vertiefungen einmal mit frischem Medium gewaschen, um lose Zellen und Zelltrümmer zu entfernen. Nach 5-minütiger Inkubation wurden die Zellen mit FCS-freiem Claycomb Medium, welches den Fluoreszenzmarker TMRE enthielt und in einer markierten Vertiefung zusätzlich mit dem Agonisten versehen. Die Einwirkzeit dieser Substanzen auf die Zellen betrug 20 min. Nach Ablauf dieser Zeit wurde das mit dem Farbstoff versehene Medium abgesaugt und alle Vertiefungen zweimal mit 500 µl Medium gewaschen, um Reste des Fluoreszenzmarkers zu entfernen. Anschließend wurden alle Zellen, außer denen der Kontrollgruppe, mit einer Noxe und den bereits vorher verwendeten Agonisten inkubiert. Zu diesem Zeitpunkt wurde auch die Ausgangsmessung durchgeführt. Die weiteren Messungen schlossen sich im Abstand von 10-20 min an. Die schematische Darstellung, dieses Ablaufes findet sich in der Abb. II.2. .

Für die Messung am FACS-Gerät wurde zuerst das vorhandene Medium aus den Vierkammervertiefungen gesaugt und mit 100 µl Trypsin/EDTA versetzt. Nach 2 min Inkubation wurde die Zelltrypsinsuspension in FACS-Röhrchen überführt und im weiteren Verlauf auf Eis gelagert. Der Zellsuspension wurden 100µl Claycomb-Medium zugeführt und die Proben nacheinander am FACS-Gerät gemessen. Die Messung war nach 10.000 *gated events* oder nach einer Dauer von maximal 60 s beendet.

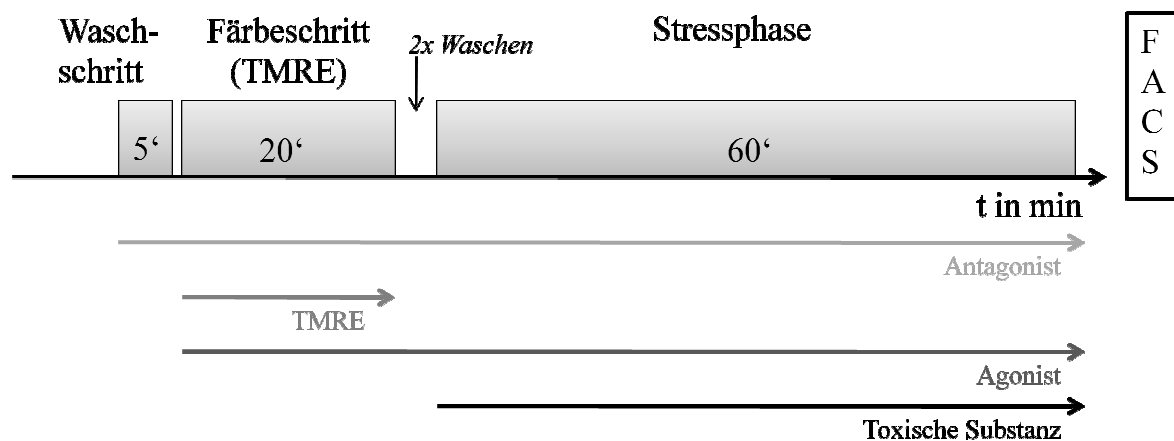


Abb. II.2. Der zeitliche Ablauf eines FACS- Versuches schematisch dargestellt. Die unterhalb der Zeitachse befindlichen Pfeile beziehen sich auf die Einwirkdauer der einzelnen Substanzgruppen.

II.2.5.4. Versuche mit Neonatalen Rattenkardiomyozyten (NRCM)

Die neonatalen Rattenkardiomyozyten wurden, wie im Kapitel Zellkultur beschrieben, ausgesetzt und kultiviert. Die Versuche wurden mit angereichertem Medium 199 durchgeführt, bei welchem kein FCS zugesetzt wurde.

Um oxidativen Stress auf die Zellen auszuüben, wurde in diesem Experiment H_2O_2 (50 μM) verwendet. Bei dieser Zelllinie wurde der Agonist SB 216763 (3 μM), ein GSK-3-Inhibitor, untersucht.

II.2.5.5. HL-1 Zellen

Die HL-1 Zellen wurden weitgehend nach dem eben beschriebenen Modell durchgeführt. Ursprünglich wurde der gesamte Versuch mit dem HL-1 Hungermedium durchgeführt. Bei den HL-1 Zellen wurde die Noxe Calcimycin, ein Kalziumionophor, eingesetzt. Um die Zellen auf diese Weise zu stressen, wurden sehr hohe Konzentrationen an Calcimycin verwendet. Aus diesem Grund wurde ein neues Modell entwickelt, bei welchem das Medium in der Stressphase durch Puffer ersetzt wurde. Es kamen zwei verschiedene Puffer zum Einsatz: Zum einem der „Stresspuffer“, welcher in den Zellen eine Kalziumüberladung erzeugt. Dieser wurde nur für die Zellen, welche mit Calcimycin behandelt wurden, verwendet. Die Kontrollgruppe wurde mit einem ähnlichen Puffer („Kontrollpuffer“) behandelt, welcher nicht mit Orthovanadate versetzt und in dem Kaliumchlorid gegen Natriumchlorid ersetzt worden war. In den Versuchsansätzen wurden die Substanzen BAY 58-2667 (50 nM), ein Aktivator der löslichen Guanylylzyklase, und Eplerenon (10 μM), ein Aldosteronantagonist, untersucht.

II.2.6. FACS-Versuche mit Propidiumiodid

Propidiumiodid ist ein Farbstoff, der oft in der Tumorzellforschung eingesetzt wird und der nekrotische Zellen markiert. In diesem Verfahren wurden ca. 18 h vor Versuchsbeginn wie oben beschrieben HL-1 Zellen in Sechskammerplatten ausgesetzt. Dabei wurden ca. 200 μl Trypsin-Zellgemisch aus der abtrypsinierten Zellkulturflasche in jede Vertiefung gegeben und 1,5 ml angereichertes Claycomb-Medium hinzu gegeben. Nach 1-2 h waren die Zellen am Boden adhäsiv und das Zellmedium konnte durch 3 ml FCS-freies Medium ersetzt werden.

Für den Versuch wurden die Zellen in einem 5-minütigen Waschschrift von Zelltrümmern und dem alten Zellkulturmedium befreit. Anschließend wurden die Zellen in Gruppen unterteilt und mit den entsprechenden Lösungen 80 min lang inkubiert. Eine Gruppe wurde

ausschließlich mit Calcimycin, eine zweite Gruppe zusätzlich mit Vardenafil, einem Phosphodiesterase-V-Hemmer, behandelt. Später wurden noch die Blocker ODQ (hochselektiver sGC-Inhibitor) und DT-2 (PKG-Inhibitor) angewandt, um die Signalkaskade der Reperfusion näher zu untersuchen. Das Medium wurde aus den Vertiefungen einzeln in 15 ml Falcons überführt. Die Vertiefungen wurden jeweils mit 1 ml PBS gespült und der Überstand in das entsprechende Falcon gegeben. In einem letzten Schritt wurden dann 200 µl Trypsin/EDTA pro Vertiefung appliziert und nach einer Inkubationszeit von 2 min abtrypsiniert und zum restlichen Überstand hinzugefügt. Die Falcons wurden bei 4°C 10 min bei 3000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend entfernt und die Falcons auf Eis gestellt. Für die Messung wurde der Überstand mit 500 µl PBS resuspendiert und mit 2 µg/ml Propidiumiodid 10 min inkubiert. Nach dieser Zeit wurde der Überstand in FACS-Röhrchen überführt und vermessen.

II.2.7. Angaben zur Statistik

Für die Auswertung der mit der FACS-Methode erhobenen Daten wurde mit der Software SigmaStat gearbeitet. Zur Bestimmung der Signifikanz wurde der T-Test und der One-Way-ANOVA (*analysis of variance*)/Fisher's LSD verwendet. Während der T-Test berechnet, ob der Durchschnitt zweier Gruppen in einem Merkmal statistisch unterschiedlich ist, können beim One-Way-ANOVA die Unterschiede von drei oder mehreren voneinander unabhängigen Gruppen untersucht werden. Diese Tests waren am besten dafür geeignet, um die Unterschiede in der Anreicherung des Fluoreszenzfarbstoffes TMRE der unterschiedlich behandelten Zellgruppen auf Signifikanz zu prüfen. Ergebnisse mit $p \leq 0,05$ wurden als statistisch signifikant bewertet.

III. Ergebnisse

Ziel der Arbeit war es, ein zellbasiertes Modell zu etablieren, welches die Untersuchung der ischämischen Postkonditionierung erlaubt. Des Weiteren sollten potentiell kardioprotektive Substanzen untersucht, durch Zugabe von Antagonisten der schützende Effekt des Pharmakons bestätigt und die zugrunde liegende Signalkaskade analysiert werden.

Es wurden verschiedene Zellen und Modelle getestet. Zum einen wurden neonatale Rattenkardiomyozyten unter der Einwirkung von Wasserstoffperoxid untersucht. Des Weiteren wurden Kardiomyozyten der HL-1-Zelllinie mit dem Kalziumionophor Calcimycin gestresst und die Wirkung des Guanylylzyklaseaktivators BAY 58-2667 und des Mineralokortikoid-Rezeptor-Antagonisten Eplerenon getestet. In dieser Versuchsreihe wurden zur Optimierung des Modells verschiedene Pufferlösungen eingesetzt. Ein anderer Ansatz lieferte der Apoptoseversuch mit Propidiumiodid, bei dem ebenfalls HL-1 Zellen unter Calcimycinstress untersucht wurden.

III.1. Die Messung von Zellen am FACS-Gerät

Im FACS-Gerät wird jede Zelle einzeln auf ihre Fluoreszenz überprüft. Ein Fluoreszieren der Zellen wurde hier mit dem Farbstoff TMRE erreicht, das in intakten Zellen abhängig vom mitochondrialen Membranpotential in den Mitochondrien akkumuliert. Bricht dieses Potential zusammen, wie es beim Zelltod der Fall ist, sinkt auch die detektierbare Fluoreszenz der Zelle. Je niedriger die Fluoreszenz, desto wahrscheinlicher ist der Zelltod. Der Fluoreszenzfarbstoff Propidiumiodid, ein Nukleinsäureninterkalator, kann die perforierte Membran von toten Zellen durchdringen, während Membranen von vitalen Zellen eine unüberwindbare Barriere darstellen. Dies macht die Diskriminierung von toten gegenüber lebenden Zellen möglich. Calcimycin und Wasserstoffperoxid bewirken auf unterschiedliche Weise einen tödlichen Stress auf die Zellen, der in seiner Auswirkung durch die FACS-Methode quantifiziert werden kann.

Die durch das FACS-Gerät gemessenen Daten wurden mit Hilfe der Software „Cellquest“ unter anderem in einem zweidimensionalen Koordinatensystem dargestellt (siehe Abbildung III.1.). Dabei wird die Abszisse durch die logarithmische Darstellung der Fluoreszenzstärke belegt und die Anzahl der gezählten Zellen auf der Ordinate sichtbar (*counts*). Eine hohe Fluoreszenzstärke der Zellen weist auf ein intaktes mitochondriales Membranpotential hin. Und je höher die *counts* einer Zellpopulation bei einer bestimmten Fluoreszenzstärke, desto

mehr Zellen sind vital. Zur Analyse der Behandlung wurde die mittlere Fluoreszenzintensität berechnet und die einzelnen Gruppen miteinander verglichen.

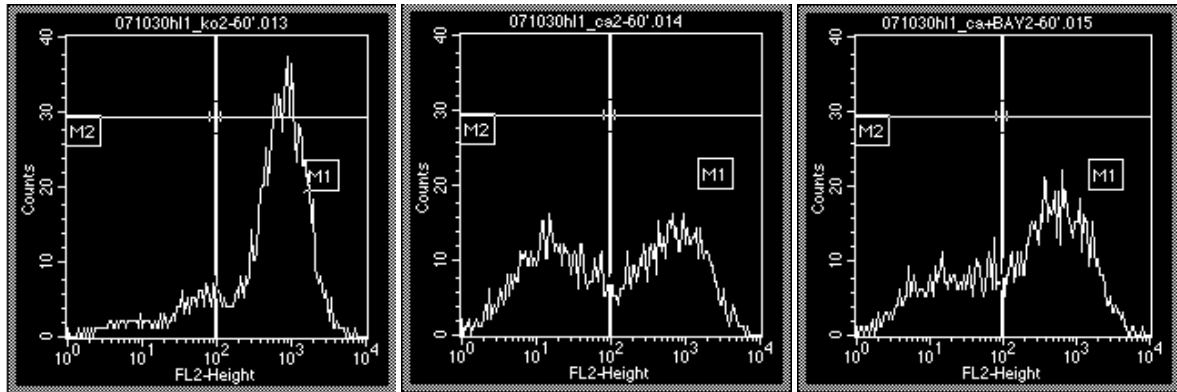


Abb. III.1. Darstellung repräsentativer Histogramme der FACS-Analyse. Im linken Bild wurden HL-1-Zellen mit TMRE angefärbt. Diese weisen eine hohe Fluoreszenzintensität auf. Werden Zellen zusätzlich mit Calcimycin behandelt (mittleres Bild) verschiebt sich die Fluoreszenzstärke in Richtung niedrigere Intensität, gleichbedeutend mit dem Verlust des mitochondrialen Membranpotentials. Werden die Zellen zusätzlich zum Calcimycin mit BAY 58-2667, einem Guanylatzyklaseaktivator, inkubiert, befinden sich mehr Zellen im Bereich höherer Fluoreszenz als im Bereich der niedrigen. Aufgetragen ist die Fluoreszenzintensität (*FL2-Height*) gegenüber der Anzahl (*Counts*) an detektierten Teilchen.

III.2. Versuche mit neonatalen Rattenkardiomyozyten

Im ersten Versuchsmodell kamen isolierte Rattenkardiomyozyten zum Einsatz, die mit Wasserstoffperoxid gestresst wurden. Wasserstoffperoxid (H_2O_2) wirkt in hohen Konzentrationen durch die Entstehung freier Radikale stark oxidativ und damit toxisch auf Zellen. In geringen Mengen kann eine Zelle die entstehenden radikalen Sauerstoffspezies mittels Antioxidanzien neutralisieren, oberhalb dieser Schwelle kommt es jedoch zum sogenannten „oxidativen Stress“.

In einer Reihe von vier Versuchen wurden über einen Zeitraum von 60 min zwei Zellgruppen untersucht. Beide Gruppen wurden mit jeweils 50 μM Wasserstoffperoxid behandelt. Die zweite Gruppe wurde mit zusätzlich 3 μM SB 216763, einem GSK3- β -Inhibitor, vorbehandelt. Dieser sollte die Entstehung der mPTP verhindern und somit die Zelle vor dem Untergang schützen.

Wie in der Abbildung III.2. zu sehen ist, sank die mittlere TMRE-Fluoreszenz der mit H_2O_2 gestressten Gruppe zum Zeitpunkt 40 min signifikant von $283,7 \pm 60,3$ auf $106,7 \pm 7,0$, während die Fluoreszenzintensität der mit SB 216763 behandelten Gruppe weitestgehend stabil blieb. Diese Ergebnisse konnten auch bei den Zeitpunkten 40 min und 60 min signifikant bestätigt werden.

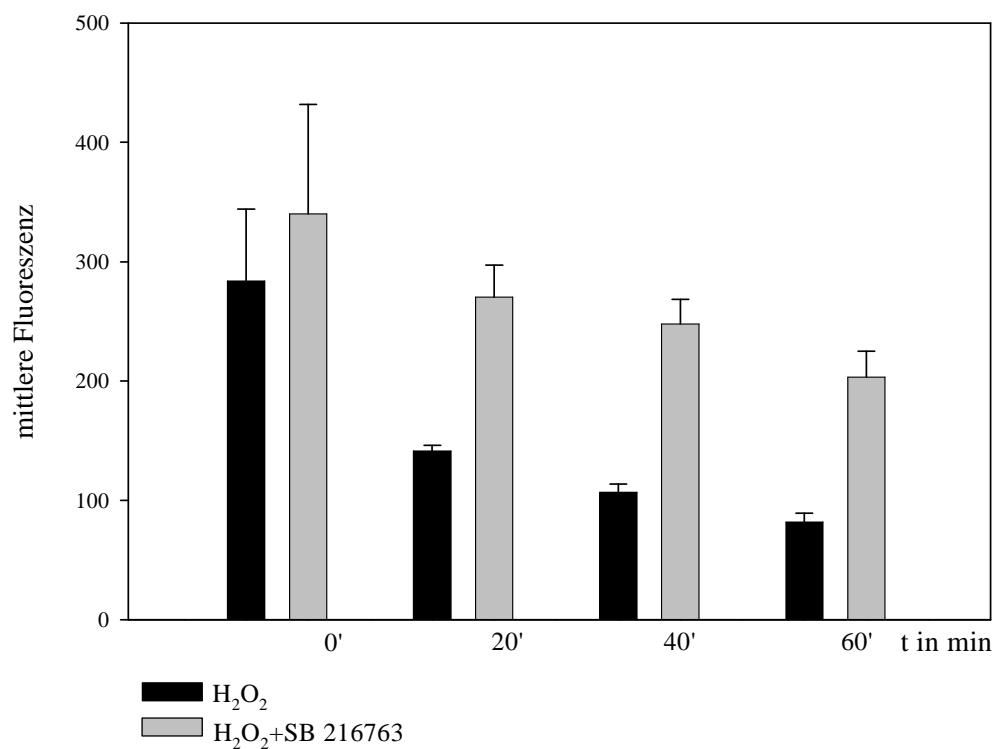


Abb. III.2. Neonatale Rattenkardiomyozyten im Versuch mit H₂O₂ und SB 216763. Neonatale Rattenkardiomyozyten wurden mit TMRE gefärbt, mit Wasserstoffperoxid gestresst und anschließend die mittlere Fluoreszenz gemessen. Die mit H₂O₂ behandelten Zellen zeigen einen schnelleren Abfall der Fluoreszenz (p[H₂O₂ 40 min] = 0,027 vs. H₂O₂ 0 min) im Vergleich zu den Zellen, die zusätzlich mit SB 216763 behandelt wurden (p[20 min] = 0,003; p[40 min] ≤ 0,001; p[60 min] = 0,002 vs. H₂O₂ des jeweiligen Zeitpunktes). Dargestellt sind die jeweiligen Mittelwerte ± SEM, n = 4.

III.3. HL-1 Zellen im Versuchsmodell I

Die HL-1 Zellen wurden zuerst hinsichtlich ihres Verhaltens gegenüber einer Calcimycindosis von 100 μM getestet. Die Dosis wurde aus Vorarbeiten mit HL-1-Zellen der eigenen Arbeitsgruppe übernommen. Calcimycin ist ein Ionophor für bivalente Kationen, z.B. Mangan, Kalzium oder Magnesium. Es ermöglicht diesen Kationen die Membran zu überwinden und führt aufgrund dessen zu erhöhten intrazellulären Kalziumkonzentrationen (55). Somit konnten Zellen in einen der Ischämie vergleichbaren Stress versetzt werden.

Auch hier wurden mit Hilfe der FACS-Technik Unterschiede zwischen der Aktivität des Fluoreszenzmarkers Tetramethylrhodaminethylester (TMRE) in verschieden behandelten Zellgruppen über einen Zeitraum von 80 min ermittelt.

In Abb. III.3. ist ein Abnehmen der mittleren Fluoreszenz in der mit Calcimycin behandelten Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe zu erkennen. Dabei korreliert die Abnahme der mittleren Fluoreszenz mit der Dauer der Einwirkzeit von Calcimycin. Die Kontrollgruppe wurde mit der entsprechenden Konzentration DMSO, in der auch Calcimycin gelöst wurde, behandelt. Zum Zeitpunkt 40 min betrug die mittlere Fluoreszenz nur noch $812,8 \pm 113,3$ im Gegensatz zur Kontrollgruppe ($1533,5 \pm 151,4$). Nach 60 min wiesen die Zellen eine mittlere Fluoreszenz von $597,0 \pm 79,6$ gegenüber der Kontrollgruppe von $1336,1 \pm 146,1$ auf. Da sich 60 min nach Calcimycingabe ein Fluoreszenzverlust von ca. 50 % einstellte und somit erstens zur Kontrolle eine signifikante Differenz bestand und zweitens noch genug vitale Zellen vorhanden waren, um einen Schutzmechanismus auslösen zu können, fiel die Entscheidung für die weiteren Experimente auf diesen Zeitpunkt.

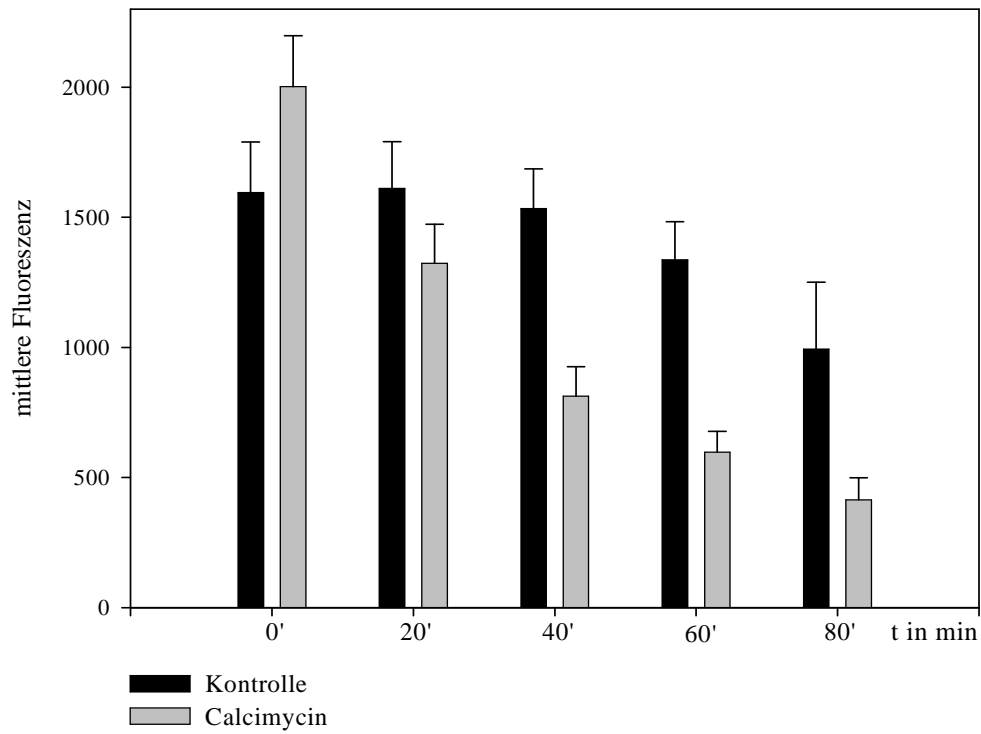


Abb. III.3. Darstellung des Verlustes der mittleren Fluoreszenzintensität nach Calcimycinbehandlung in HL-1-Zellen. Mit steigender Behandlungsdauer sinkt die mittlere TMRE-Fluoreszenzintensität unter der Einwirkung von Calcimycin rapide. ($p[40 \text{ min}] = 0,001$, $p[60 \text{ min}] \leq 0,001$ vs. Kontrolle desselben Zeitpunktes). Dargestellt sind die jeweilige Mittelwerte \pm SEM, Zeitpunkte 0-60 min, $n = 10$, Zeitpunkt 80 min, $n = 5$.

III.3.1. Der NO- und Häm-unabhängige lösliche Guanylylzyklaseaktivator

In einer weiteren Versuchsreihe wurde getestet, ob der lösliche Guanylylzyklase-Agonist (sGC-Agonist) BAY 58-2667 durch sein Eingreifen in die Signalkaskade die Zellen vor den Auswirkungen des Kalziumstresses schützen kann. Über eine Stimulation der löslichen Guanylylzyklase wird der cGMP-Spiegel der Zelle erhöht, was zu einer Aktivierung der Proteinkinase G führt und damit die schützende Signalkaskade anregt (56).

In drei Gruppen, wobei zwei mit Calcimycin behandelt wurden und eine dieser beiden zusätzlich mit BAY 58-2667, wurde diese Vermutung getestet. Die dritte, nicht mit Lösungen behandelte Gruppe stellte eine Kontrolle dar. Wie in Abbildung III.4. graphisch dargestellt, wurde nach 60min in der oben beschriebenen FACS-Technik ein Absinken der Fluoreszenz der Calcimycingruppe (100 μ M) gegenüber der Kontrollgruppe auf $485,9 \pm 20,2$ detektiert. Im Gegensatz dazu weisen die Zellen, die mit BAY 58-2667 inkubiert wurden, noch eine Fluoreszenz von $562,7 \pm 24,7$ auf. Statistisch beläuft sich die Signifikanz von der mit BAY 58-2667 zu der nur mit Calcimycin behandelten Gruppe auf $P = 0,044$ bei $n = 23$.

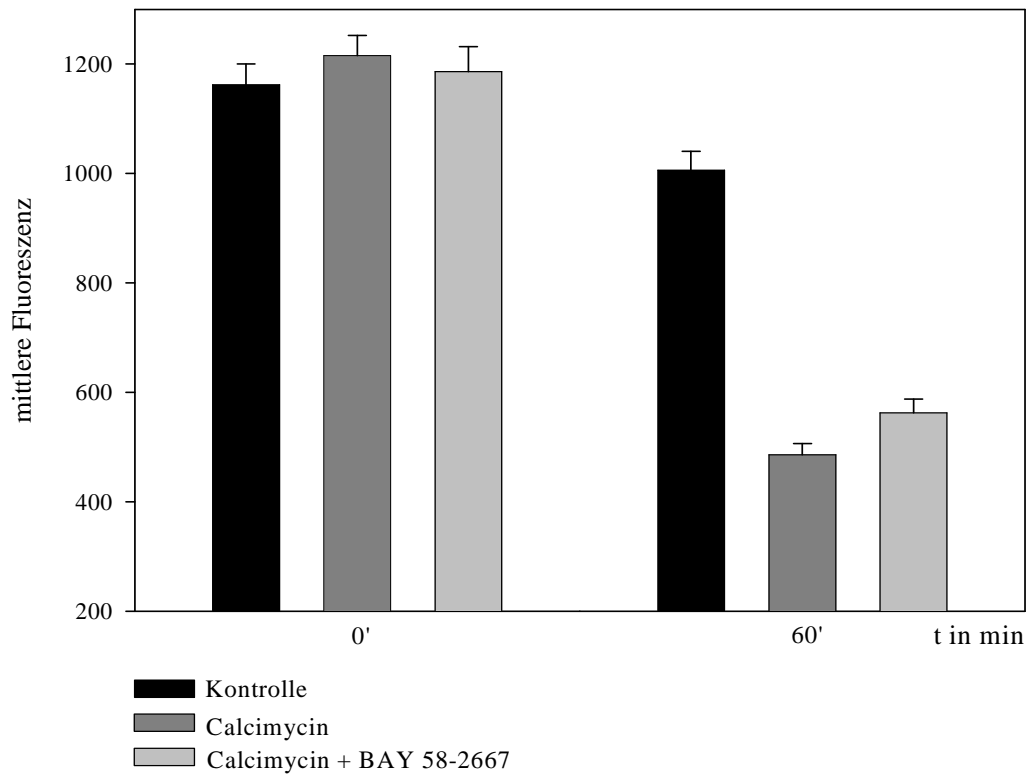


Abb. III.4. Zellschutz durch den sGC-Aktivator BAY 58-2667 (50 nM). Die HL1-Zellen wurden mit TMRE gefärbt und 60 min lang mit Calcimycin gestresst. Der davor und während dessen zugesetzte lösliche Guanylylzyklaseaktivator bewirkte eine signifikante Verzögerung des Fluoreszenzverlustes ($P[60 \text{ min}] = 0,044$ vs. Calcimycin). Dargestellt sind die jeweiligen Mittelwerte \pm SEM, $n = 23$.

III.3.2. Der Mineralokortikoid-Rezeptor-Antagonist Eplerenon

Eplerenon ist ein Aldosteronantagonist, der zur Behandlung der Herzinsuffizienz nach einem Herzinfarkt zugelassen ist. Es wirkt über eine kompetitive Hemmung von Aldosteron, führt zur vermehrten Natrium-, Chlorid- und Wasserausscheidung, retiniert Kalium, führt somit zur Blutdruck- und Vorlastsenkung und stärkt die Kontraktionskraft des Herzens.

Bisher ist nur wenig über den Wirkmechanismus bekannt, mit dem Eplerenon eine kardioprotektive Wirkung im Sinne der Postkonditionierung entfacht. Dennoch konnte auch in diesem Modell, wie in Abb. III.5. dargestellt, ein signifikanter Schutz der HL-1 Zellen vor Kalziumüberladung durch Calcimycin nach einer Behandlungszeit von 60 min nachgewiesen werden. Die mit Calcimycin (100 μ M) behandelte Gruppe sinkt nach 60 min auf $677,6 \pm 37,2$, während eine Behandlung der Zellen mit Eplerenon einen Teil des Fluoreszenzverlustes verhindern konnte. Die Fluoreszenzintensität der mit Eplerenon behandelten Zellen lag bei $800,5 \pm 50,2$.

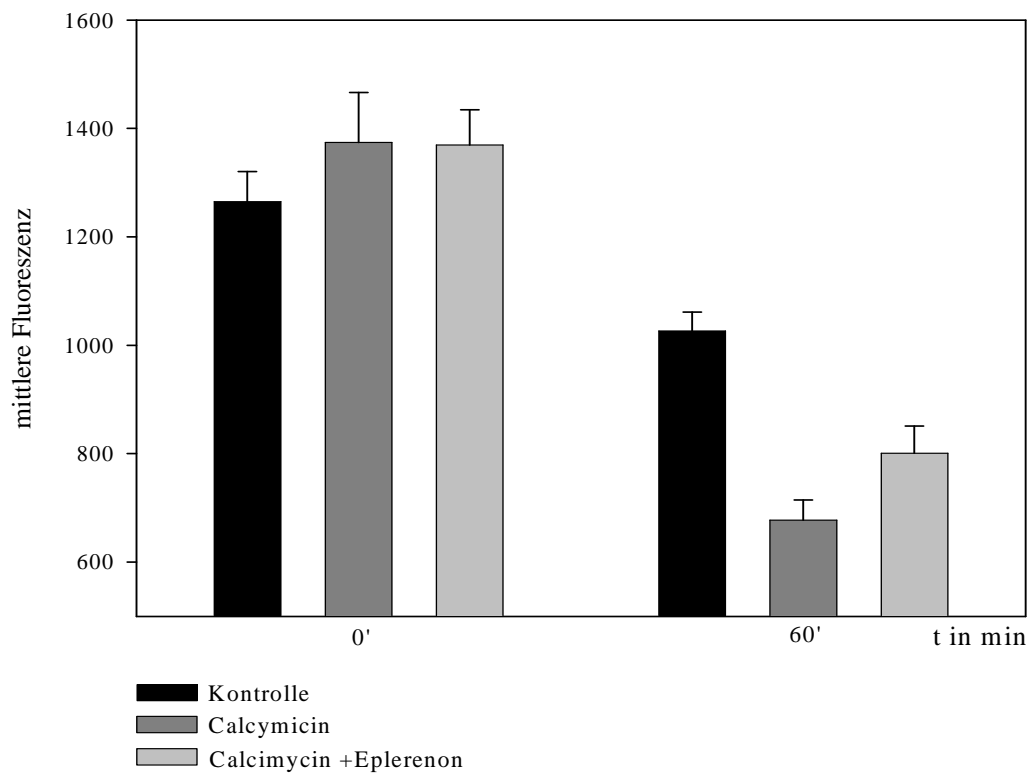


Abb. III.5. Zellschutz durch den Mineralokortikoidantagonisten Eplerenon. HL-1-Zellen wurden mit TMRE gefärbt und mit Calcimycin gestresst, wodurch es zu einem Absinken der mittleren Fluoreszenz kam. Eplerenon (10 μ M) konnte diesen Fluoreszenzverlust signifikant aufheben ($P = 0,043$ vs. Calcimycin 60 min). Dargestellt sind die jeweiligen Mittelwerte \pm SEM, $n = 11$.

III.4. HL-1 Zellen im Versuchsmodell II

Durch die hohe Calcimycinkonzentration von 100 μM konnte nicht sicher differenziert werden, ob der intrazelluläre Kalziumstress oder andere, viel unspezifischere Reize, zum Absterben der Zellen führen. Mit einem neuen Modell konnte die Konzentration an Calcimycin deutlich gesenkt werden. Dazu wurde das Medium, in dem die Zellen während der Versuche aufbewahrt wurden, durch spezielle Pufferlösungen ersetzt. Diese waren in der Elektrolytzusammensetzung so angepasst, dass ausreichend Kalzium zur Verfügung stand, um die Zellen spezifisch mit einem Kalziumionophor zu stressen (siehe Material und Methoden).

In der Abbildung III.6. ist eine Reihe mit zehn Versuchen dargestellt, bei welcher die Kontrolle unter Verwendung des Kontrollpuffers stabil bleibt. Währenddessen sinkt die Fluoreszenzintensität der mit Calcimycin behandelten Gruppe unter dem Einfluss des Stresspuffers über die Zeit von 20 min signifikant auf $799,99 \pm 53,8$ gegenüber der Kontrollgruppe ($1085,34 \pm 111,46$). Nach 30 min war die Fluoreszenz bereits auf 1/3 der Kontrollfluoreszenz abgesunken.

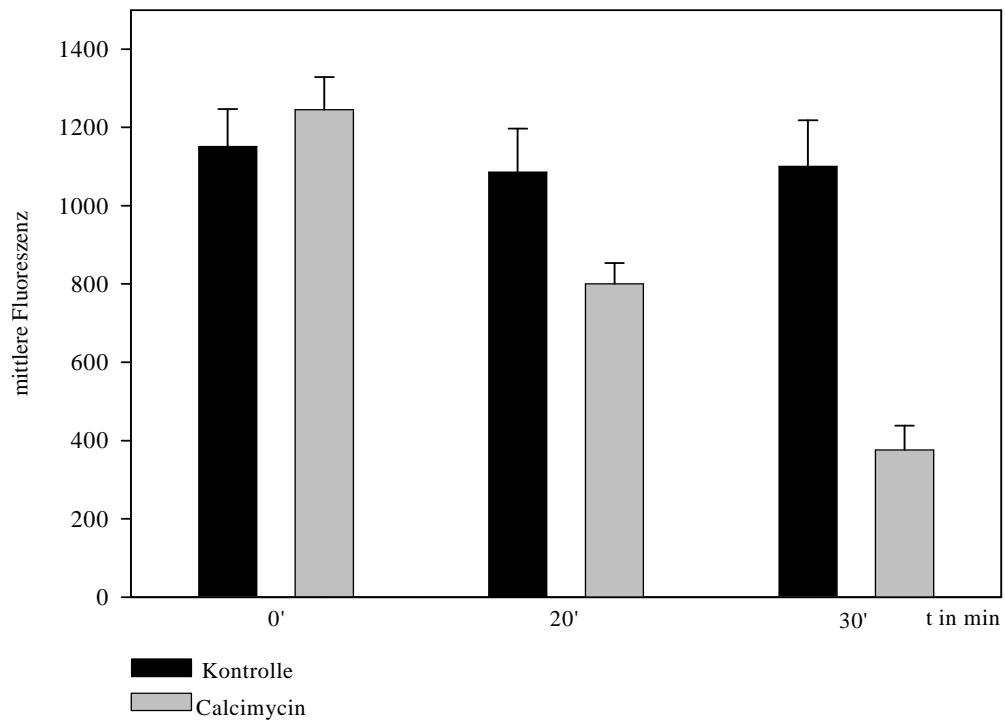


Abb. III.6. Die Wirkung von Calcimycin (1 μM) unter Kontroll- und Stresspuffer. Mit TMRE angefärbte HL1-Zellen wurden über einem Zeitraum von 30 min Calcimycin ausgesetzt. Dargestellt ist ein Absinken der Fluoreszenz in der mit Calcimycin gestressten Gruppe gegenüber der Kontrolle. Der Fluoreszenzverlust korreliert dabei mit der Einwirkzeit ($p[20 \text{ min}] = 0,029$; $p[30 \text{ min}] \leq 0,001$ vs. Calcimycin des jeweiligen Zeitpunktes). Dargestellt sind die jeweiligen Mittelwerte \pm SEM, $n = 10$.

III.4.1. Der sGC-Aktivator BAY 58-2667 im neuen Modell

Die zellschützende Wirkung des sCG-Aktivators BAY 58-2667 konnte bereits gezeigt werden (siehe Abb. III.4.). Dieses Resultat wurde nun zur Etablierung der neuen Pufferlösungen erneut untersucht. Gleichzeitig wurde der hochselektive PKG-Inhibitor DT-2 untersucht. Da BAY 58-2667 über die Guanylylzyklase zur Aktivierung der PKG führt, wurde erwartet, dass der schützende Effekt der pharmakologischen Postkonditionierung durch den Blocker DT-2 abgeschwächt werden kann.

In Abb. III.7. sind die Ergebnisse zum Zeitpunkt 20 min gezeigt und die Calcimycin-Gruppe wurde auf 100 % gesetzt. BAY 58-2667 konnte wie auch schon in den vorherigen Versuchen HL-1 Zellen signifikant vor dem Kalziumstress durch Calcimycin schützen. Der PKG-Inhibitor DT-2 konnte den durch BAY 58-2667 vermittelten Schutz aufheben. Die mittlere Fluoreszenz der mit Calcimycin, BAY 58-2667 und DT-2 inkubierten Zellen lag im Bereich der ungeschützten Calcimycin-Gruppe. DT-2 allein hatte keinen signifikanten Einfluss auf das Überleben der Zellen.

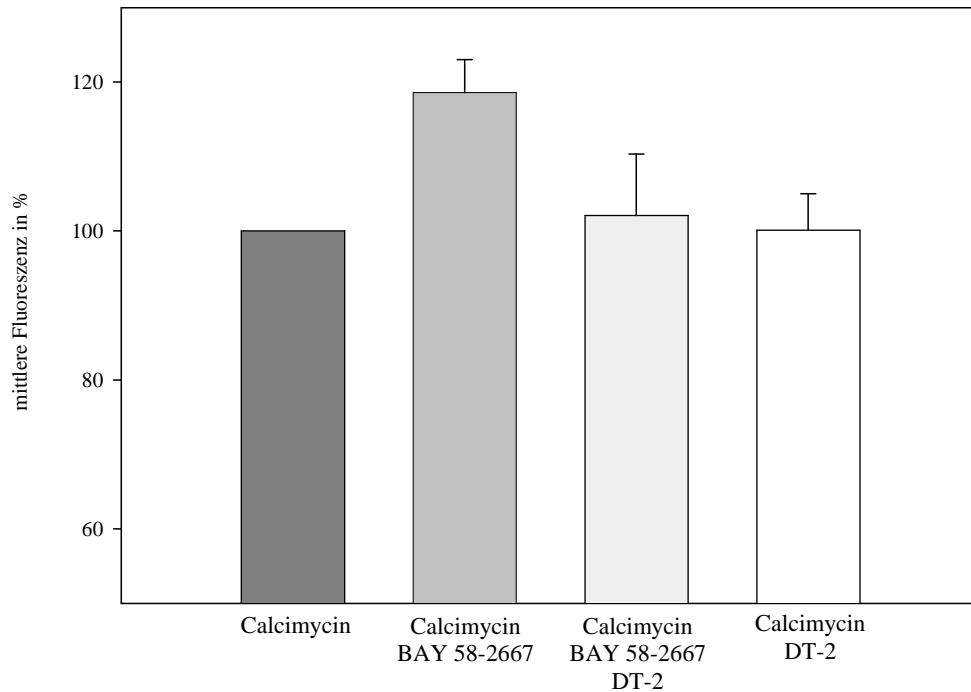


Abb. III.7. Die Wirkung von BAY 58-2667 und DT-2 auf Calcimycin behandelte HL-1 Zellen. Die HL-1-Zellen wurden mit TMRE gefärbt und mit Calcimycin gestresst. BAY 58-2667 schützt die Zellen signifikant, während der PKG Blocker DT-2 den Schutz aufheben kann. DT-2 allein hat keinen signifikanten Effekt auf das Verhalten der Zellen. ($P[\text{Calcimycin vs. Calcimycin} + \text{BAY 58-2667}] = 0,014$; $P[\text{Calcimycin} + \text{BAY 58-2667 vs. Calcimycin} + \text{BAY 58-2667} + \text{DT-2}] = 0,028$ bei $n = 16$). Dargestellt sind die jeweiligen Mittelwerte \pm SEM zum Zeitpunkt 20 min, die Calcimycingruppe wurde auf 100 % gesetzt, die Gruppen mit zusätzlichen Agonisten in % jener Gruppe.

III.5. Apoptoseversuch von HL-1 Zellen mit Propidiumiodid

In einem weiteren Ansatz wurden HL-1-Zellen mit Propidiumiodid (2 µg/ml) als fluoreszierenden Marker angefärbt, mit der FACS-Technik gemessen und ausgewertet. Dabei wurde der Prozentsatz der zerstörten Zellen ermittelt, da Propidium nur die perforierten Membranen toter Zellen durchdringen kann. In dieser Reihe wurde Vardenafil eingesetzt, um die Zellen pharmakologisch zu postkonditionieren. Vardenafil, ein Phosphodiesterasehemmer, bewirkt über die Inhibierung der Phosphodiesterase V einen Anstieg der intrazellulären cGMP-Konzentration. Diese wiederum führt zur Aktivierung der PKG und somit zur Einleitung des schützenden Effektes der pharmakologischen Postkonditionierung (45). Um dies zu bestätigen, wurden zwei Inhibitoren eingesetzt. Zum einen DT-2, der die durch cGMP aktivierte PKG inhibiert. Zum anderen ODQ, ein hochselektiver sGC-Inhibitor, der die cGMP-Produktion hemmt.

In Abb. III.8. sind die Ergebnisse des Propidiumiodidversuchs als Zelltodrate bezogen auf die Gesamtzellzahl dargestellt. In der Gruppe, welche nur mit Calcimycin inkubiert wurde, konnten $80,0 \pm 1,6$ % tote Zellen detektiert werden. Dem gegenüber wurden in der mit Vardenafil behandelte Gruppe mit $74,4 \pm 1,1$ % signifikant weniger toten Zellen nachgewiesen. ODQ konnte diesen Effekt tendenziell aufheben, hier wurden $78,3 \pm 0,29$ % tote Zellen detektiert. Der Blocker DT-2 konnte den Vardenafil-Schutz signifikant mindern ($83,2 \pm 0,1$ % tote Zellen). In Abwesenheit von Vardenafil haben diese beiden Substanzen keinen Effekt auf das Überleben der Zellen unter dem Einfluss von Calcimycin.

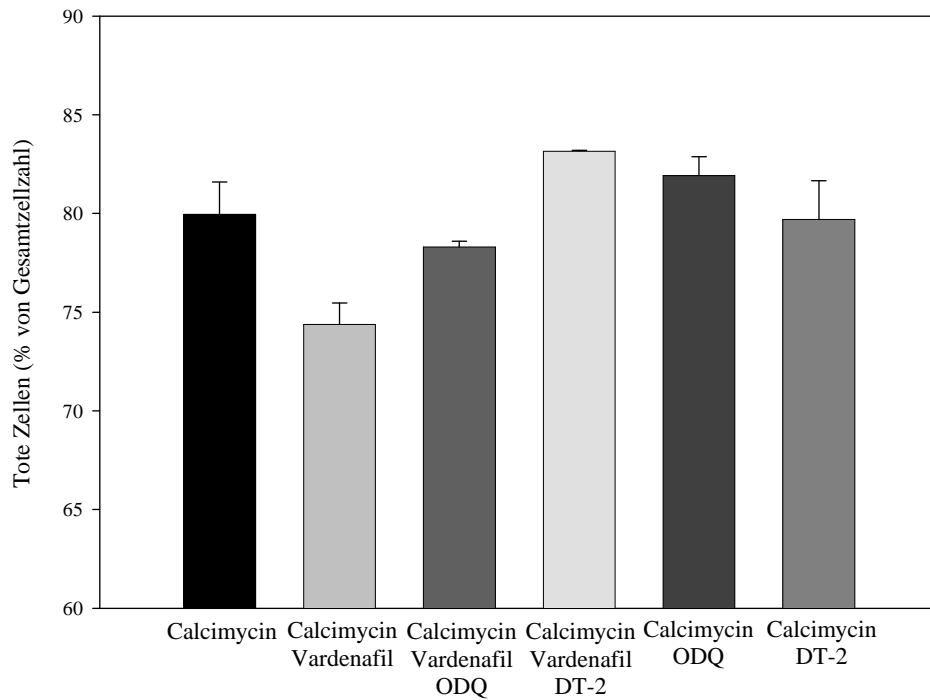


Abb. III.8. Die Wirkung von Vardenafil und verschiedener Blocker. HL-1 Zellen wurden mit Propidiumiodid angefärbt, mit Calcimycin gestresst und anschließend mittels FACS-Technik vermessen. Während Vardenafil einen signifikant positiven Effekt auf das Überleben von Zellen hat, konnte der Blocker ODQ tendenziell und DT-2 signifikant diesen Schutz vor dem Zelluntergang aufheben. Die beiden Blocker allein besitzen keinen signifikanten Effekt auf die HL-1 Zellen. (P[Calcimycin vs. Calcimycin + Vardenafil] = 0,005 bei n = 13; P[Calcimycin + Vardenafil vs. Calcimycin + Vardenafil + DT-2] = 0,02 bei n = 2). Dargestellt ist der Prozentsatz toter Zellen zur Gesamtzellzahl \pm SEM.

IV. Diskussion

Der Myokardinfarkt gehört derzeit zur Gruppe der häufigsten Todesursachen in der westlichen Welt (57). Es ist daher neben einer umfassenden Prävention notwendig, eine optimale Versorgung der betroffenen Patienten zu gewährleisten, um die Folgen einer myokardialen Ischämie für das Individuum und die daraus entstehenden Kosten für das Gesundheitssystem möglichst gering zu halten.

Es ist weithin bekannt, dass die schnelle Reperfusion des betroffenen Gewebes die wichtigste Maßnahme zur Reduktion der Mortalität des Myokardinfarktes ist. Jedoch wird das Herz nicht nur durch die Ischämie an sich geschädigt. Mit der einsetzenden Reperfusion entsteht in einem Teil des Gewebes eine Stoffwechsellage, die den Zelluntergang induzieren kann. Demnach führt die für das Überleben des Patienten unbedingt notwendige Wiederdurchblutung des ischämischen Areals noch zur Vergrößerung des Schadens am Myokard. Durch die ischämische Präkonditionierung, die erstmals 1986 durch Murry beschrieben wurde, konnte das Ausmaß dieses Reperfusionsschadens vermindert werden (14). Die Präkonditionierung ist jedoch eine dem Infarkt vorgeschaltete Behandlung. Da es unmöglich ist, die Therapie vor Einsetzen der ersten Symptome durchzuführen, fand die Präkonditionierung keine praktische Anwendung in der Klinik. Mit der Entdeckung, dass die Applikation von Ischämie-Reperusionszyklen, bzw. spezieller Pharmaka ähnlich wirken, wenn sie der Indexischämie nachgeschaltet werden, rückte die Postkonditionierung im Jahr 2003 ins Blickfeld der Forschung (41).

IV.1. Warum ist ein Zellmodell notwendig?

Viele Versuche wurden unter Verwendung von Tierherzen, z.B. isoliert an Langendorff-Anlagen und *in situ* durchgeführt. Tierexperimente stellen einen wichtigen Anteil der Forschung dar, die jedoch aus ethischen Gründen in der Anzahl auf ein notwendiges Minimum beschränkt werden sollte. Darüber hinaus sind strenge Bestimmungen bei der Tierhaltung und der experimentellen Durchführung zu beachten. Zudem stellen die hohen Kosten mancher Substanzen ein weiteres Problem dar, da in einem isolierten Herzen oder *in situ* mehrere Liter Pufferlösung mit den Substanzen in ausreichender Konzentration versetzt werden müssen, um eine nahezu physiologische Perfusion der Herzkranzarterien zu erzeugen. Um die Wahrscheinlichkeit positiver Ergebnisse in Tierversuchen zu erhöhen, kann ein zellbasiertes Modell dazu genutzt werden die Substanzen im Vorfeld zu testen (15). Die

verbrauchte Menge einer Substanz ist bei wenigen Zellen in einer Vertiefung der Platte gegenüber Tierversuchen ungleich geringer.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden mehrere Zellarten in verschiedenen Versuchsmodellen auf die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse getestet, die mit anderen Methoden erhoben wurden.

IV.2. Neonatale Rattenkardiomyozyten unter oxidativem Stress

Neonatale Rattenkardiomyozyten sind Zellen, die von neugeborenen Ratten gewonnen und kultiviert werden. Der Vorteil neonataler Zellen sind noch erhaltene Fähigkeiten, wie Zellteilung, die während der Reifung zum adulten Stadium verloren gehen (53). Die Forschung mit dieser Zelllinie ist in der molekularen Kardiologie weit verbreitet und gut akzeptiert. So wurde bereits gezeigt, dass oxidativer Stress, z.B. durch Wasserstoffperoxid (100 μM), zur Öffnung der mitochondrialen Permeabilitätstransitions-poren und damit zum Zelltod führt (48).

In dieser Arbeit wurden neonatale Rattenkardiomyozyten mit dem Fluoreszenzfarbstoff TMRE, der proportional zum mitochondrialen Membranpotential fluoresziert, angefärbt und mit Wasserstoffperoxid gestresst. Die mittlere Fluoreszenzintensität der mit TMRE beladenen Zellen nahm bereits bei einer H_2O_2 -Konzentration von 50 μM nach 40 Minuten signifikant ab. Durch die geringere Konzentration wurde das TMRE-Signal der Zellen auf 50-60 % des Ausgangswertes reduziert, so dass der Anteil vitaler Zellen noch ausreichend groß war, um einen schützenden Effekt von applizierten Pharmaka im Experiment erzeugen zu können. Anhand dieses Modells wurde die Wirkung des GSK-3 β -Inhibitors SB 216763 überprüft. GSK3- β ist in der Mediatorphase für die Öffnung der mitochondrialen Permeabilitätstransitions-poren (mPTP) verantwortlich und deren Blockierung sollte somit in der Zelle einen Schutz vor dem Reperfusionsschaden induzieren (58). Unter H_2O_2 -Einwirkung sank die mittlere Fluoreszenzaktivität der mit SB 216763 Gruppe nicht so stark ab, wie die der Kontrolle. Dies zeigt, dass die neonatalen Rattenkardiomyozyten unabhängig vom Gewebsverband und anderen im Herzen vorkommenden Zellarten die Fähigkeit haben, die Mediatorphase der postulierten Signalkaskade auszulösen. Die Einleitung des Zelltodes durch die Öffnung von mPTP konnte, wie auch in anderen Versuchsmodellen, erfolgreich durch die pharmakologische Intervention mit dem GSK-3 β Blocker verhindert werden.

Trotz positiver Ergebnisse ist die Verwendung neonataler Rattenherzmyozyten aufgrund der aufwändigen Isolierung, der begrenzten Zellzahl und der begrenzten Fähigkeit zur Zellteilung für diesen Zweck nicht praktikabel. Außerdem ist die Behandlung mit Wasserstoffperoxid als

Korrelat für ischämische Bedingungen in Herzzellen kritisch zu hinterfragen. Wasserstoffperoxid scheint zwar erfolgreich einen Zellschaden auszulösen, dennoch wird die Triggerphase größtenteils übersprungen. So wird beispielsweise von der Zelle kein Adenosin ausgeschüttet, was im weiteren Verlauf der Mediatorphase noch als Trigger für einige andere Zielproteine, wie dem Adenosin-2b-Rezeptor, wirkt. Dadurch entsteht die Möglichkeit, dass einige biochemische Interaktionen in diesem Modell außer Acht gelassen werden.

IV.3. HL-1-Zellen

Eine der Hürden zur Entwicklung eines zellbasierten Modells ist die mangelnde Teilungsfähigkeit der Kardiomyozyten, die lediglich eine Primärkultur zulässt. Durch die Verwendung der immortalen HL-1-Linie, die von einer atrialen Tumorklinie der Maus abstammt, wurde es möglich, Zellen ohne Verlust ihres kardiospezifischen Phänotypes zu passagieren. HL-1-Zellen haben nicht nur morphologische, biochemische und elektrophysiologische Ähnlichkeiten, sondern auch eine vergleichbare Genexpression zu adulten, atrialen Kardiomyozyten (54).

In dieser Arbeit wurden HL-1-Zellen durch überhöhte intrazelluläre Kalziumspiegel gestresst, wodurch es über die Aktivierung von Proteasen zur Öffnung der mPTP kommt (59). Der erhöhte Spiegel entsteht durch eine Behandlung mit Calcimycin, einem Kalziumionophor der u.a. durchlässig für Magnesium und Kalzium, aber undurchlässig für Kalium ist (60). In Vorarbeiten wurde gezeigt, dass Zugabe von Calcimycin einen schnellen Anstieg der zytosolischen Kalziumkonzentration bewirkt, die eine Öffnung der mPTP veranlasst (61). Es wurde bereits eine optimale Konzentration von 100 μM ermittelt. Bei zunehmender Behandlungsdauer mit Calcimycin tritt eine Schwächung der mittleren TMRE-Fluoreszenzaktivität, als Zeichen für den Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials, auf. Die folgenden drei Experimente belegen, dass die durch die oben genannte Calcimycindosis ausgelöste Kalziumüberladung den Zelltod bedingen kann. Die Zellen sterben durch diesen Stress zeitabhängig, wodurch es möglich wird einen Untersuchungszeitpunkt zu finden, bei dem ein Teil der Zellen noch vital genug ist, den Zelluntergang zu verhindern. Die Vorstellung der unterschiedlich stark geschädigten Zellen entspricht dem Risikoareal am Rande des ischämischen Gewebes, in dem die Zellen erst durch den Reperfusionsschaden sterben. Als Untersuchungszeitpunkt für weitere Versuche war die Messung nach 60min Inkubation mit Calcimycin optimal, da die mittlere Fluoreszenz der Calcimycingruppe gegenüber der Kontrolle signifikant auf ca. 50-60 % des

Ausgangswerts abgenommen hatte und die mittlere Fluoreszenz der unbehandelten Zellen gegenüber dem Anfangswert stabil erschien.

Zur Testung des Modells wurde BAY 58-2667, ein Aktivator der löslichen Guanylylzyklase (sGC) verwendet (62). Dieser wurde mit dem Ziel entwickelt, eine Alternative zur Nitratbehandlung zu finden, die unabhängig von Stickstoffmonoxid ist und damit keiner Toleranzentwicklung unterliegt (63). Die lösliche Guanylylzyklase führt durch die Bildung von cGMP in der Zelle zur Aktivierung der Proteinkinase G (PKG), die wiederum weitere Schritte der schützenden Signalkaskade vermittelt (19). Weitere Studien zeigten, dass eine Aktivierung der partikulären GC durch atriales natriuretisches Peptid (ANP) oder B-Typ natriuretisches Peptid, bzw. die direkte Aktivierung der PKG einen signifikanten Schutz der gestressten Zellen auslösen kann. Somit lag die Vermutung nahe, dass auch BAY 58-2667 eine positive Wirkung auf das Überleben der durch Reperfusion geschädigten Zellen hat. Nach 60 min simulierter Ischämie, konnte ein signifikanter Teil der Zellen durch die Applikation von BAY 58-2667 vor dem Zelltod bewahrt werden. Dieses Ergebnis zeigte sich gleichsam an den Versuchen unseres Labors am isolierten Rattenherz (64).

Eplerenon ist ein Mineralokortikoidrezeptorantagonist (MR-Antagonist), der seinen hauptsächlichlichen Effekt über die Wasser- und Natriumretention in der Niere entfaltet. Dabei wirkt der Hormon-Rezeptorkomplex im Zellkern als Transkriptions-regulierender Faktor. Die Wirkung durch die daraufhin vermehrt erzeugten Proteine tritt erst Stunden bis Tage nach Gabe des Medikaments ein. Kürzlich wurde festgestellt, dass es neben dieser Funktion auch noch nicht-genomisch vermittelte Wirkungsweisen gibt (65). Solche nicht genomischen Wirkungen können Änderungen in Iontentransporteraktivitäten oder die Beeinflussung zellulärer Proteine sein, wie z.B. der alpha-Isoform der PKC durch das Mineralokortikoid Aldosteron (66). Grund für die Annahme war die Entdeckung, dass die Applikation von Aldosteron, die Infarktgrößen in einem in-situ-Modell am Hund verschlimmerte (67). Im Umkehrschluss würde demnach die Blockierung der Aldosteronrezeptoren eine Verkleinerung des Infarktareals bewirken, was es anhand von Eplerenon im Zellmodell zu überprüfen galt. Die HL-1-Zellen wurden mit Calcimycin gestresst und Eplerenon als vermeintlich schützende Substanz verabreicht. Nach 60 Minuten war ein signifikanter Teil der Zellen durch die Behandlung mit dem Antagonisten geschützt. An isolierten Rattenherzen an der Langendorffanlage führte die Applikation von Eplerenon 5 min vor Einsetzen der Reperfusion zu deutlich reduzierten Infarktgrößen (68). Weitere Studien müssen nun klären,

ob dieser Effekt durch die Inhibierung schädlicher Aldosteroneffekte, eine Rezeptorantwort oder einen unspezifischen unabhängigen Effekt des Mineralokortikoidrezeptors ausgelöst wird.

Anhand der zwei Substanzen BAY 58-2667 und Eplerenon konnte gezeigt werden, dass die Schutzkaskade in der HL-1-Zelllinie ausgelöst werden kann. Kritisch zu bemerken ist, dass die verwendete Calcimycindosis toxisch ist. Je höher die Konzentrationen an Substanzen sind, desto gravierender und unspezifischer werden Rezeptoren besetzt und Zellreaktionen ausgelöst. Es ist demnach nicht auszuschließen, dass der durch 100 μM Calcimycin induzierte Zelltod durch andere Effekte als der Kalziumüberladung ausgelöst wird.

IV.4. Modulation des HL-1-Zell-Modells unter Kalziumionophorstress

Ein Ansatz die Konzentration des Ionophores zu senken ist, die Umgebung der Zellen zu verändern. Bisher wurde für die Versuche Nährmedium (Claycomb) verwendet, das speziell für HL1-Zellen entwickelt wurde. Dieses Medium stellte ausreichend Nährstoffe und eine ideale Elektrolytzusammensetzung sicher, in dem die Zellen proliferieren und ihre herzzellähnlichen Eigenschaften nicht verlieren. Im Falle einer Ischämie des Herzens sind diese optimalen Bedingungen jedoch unrealistisch, da sich die gesamte Stoffwechsellage des Gewebes verändert.

Eine gesunde Zelle unter optimalen Stoffwechselbedingungen ist für die Simulation einer Ischämie durch Kalziumstress nur wenig geeignet, da die Homöostase noch recht lange aufrechterhalten werden kann. Im Gegensatz dazu liegen bei den meisten Patienten mit einer koronaren Herzkrankheit schon lange Gefäßveränderungen vor, die zu einer relativen Ischämie und somit zur (zeitweisen) Minderversorgung des myokardialen Gewebes mit Sauerstoff führen, woran sich die Zellen teils adaptieren. Nach einem Erfahrungsaustausch mit Prof. Fabio Di Lisa wurde das während der Versuche verwendete Claycomb-Medium mit einem modifizierten Puffer ausgetauscht, der die Bedingungen einer Ischämie besser widerspiegeln und somit die Calcimycinwirkung optimieren soll.

Während Calcimycin allein nur zu einem mäßigen Kalziumeinstrom führt, bewirkt die Substitution von Natrium mit Kalium eine Zelldepolarisation und erleichtert den Kalziumeinstrom, so dass eine Kalziumüberladung entsteht. Das zugesetzte Orthovanadat inhibiert membranständige P-Typ-ATPasen, so dass sich der entstandene Ionengradient nicht ändert. Diese Pufferzusammensetzung (siehe Material und Methoden) wurde „Stresspuffer“ genannt, da er die kulturierte Zelle für die Ischämie zugänglich macht.

Die mit dem Stresspuffer inkubierten HL-1-Zellen benötigten zur signifikanten Schädigung nur 1/50 der ursprünglichen Calcimycin-Dosis (2 μ M) und das mitochondriale Membranpotential erlosch bereits nach 20 min signifikant.

Zur Etablierung dieses Modells wurde noch einmal der sGC-Aktivator BAY 58-2667 getestet. Bei der gleichen BAY 58-2667-Konzentration konnte nach 20 min auch hier signifikant ein Teil der HL-1 Zellen vor dem Zelluntergang bewahrt werden. Weiterhin konnte durch die Verwendung des PKG-Inhibitors DT-2 und der dadurch aufgehobenen Schutzwirkung gezeigt werden, dass auch eine Modulation der Schutzkaskade in diesem Modell möglich ist. Der durch BAY 58-2667 vermittelte Schutz braucht die Proteinkinase G, um die Apoptose erfolgreich zu verhindern. Auch diese Erkenntnisse entsprachen den Ergebnissen, die an isolierten Herzen in unserem Labor erhoben wurden (69).

Es ist somit möglich mittels des adaptierten Zellmodells, das die Umstände im ischämischen Herzgewebe besser simuliert, weitere Schritte der Signalkaskade bei Prä- und Postkonditionierung zu untersuchen. Die Ergebnisse können dann Tierversuchen verifiziert werden.

IV.5. Propidiumiodid – eine Alternative

Die Messung des mitochondrialen Membranpotentials ist nicht die einzige Methode zur Untersuchung der Vitalität von Zellen. In der Tumorforschung ist zum Beispiel die Messung mit dem Fluoreszenzfarbstoff Propidiumiodid (PI) verbreitet. Dieser Nukleinsäureinkalator besitzt die Fähigkeit, die perforierten Zellmembranen der toten Zellen zu durchdringen. Damit ist eine Diskriminierung zwischen toten und vitalen Zellen, deren Membran nicht überwunden werden kann, möglich. Eine Information, um welche Art von Zelltod es sich handelt, liefert diese Methode nicht.

Durch Vorarbeiten im Labor stellte sich der PDE-5-Hemmer Vardenafil, sowohl in isolierten Rattenherzen, als auch im Zellmodell als Agonist der schützenden Signalkaskade heraus (46). Es folgte die Überprüfung, ob sich bei anders gefärbten HL-1-Zellen und die Behandlung mit Calcimycin und einem Agonisten, die gleichen Resultate ergeben.

Die HL-1-Zellen wurden in zwei Gruppen mit Calcimycin behandelt, wobei eine der beiden zusätzlich mit Vardenafil inkubiert wurde. Unter dem Einfluss des PDE-5-Hemmers waren die Prozentzahlen der toten Zellen signifikant geringer als bei der Kontrollgruppe. Zur Untersuchung, ob der Zelltod wirklich durch die postulierte Signalkaskade verhindert wurde, wurden noch verschiedene Blocker eingesetzt. DT-2 bewirkte durch seine PKG-Blockierung

die Aufhebung des Vardenafil-vermittelten Schutzes. Der hochselektive sGC-Inhibitor ODQ zeigte durch die Reduktion des cGMP-Spiegel ebenfalls den Trend den Postkonditionierungseffekt zu negieren. Damit ließen sich die Ergebnisse der vorangegangenen Experimente und auch die Abhängigkeit der Vardenafil-induzierten Schutzkaskade von den PKG und sGC bestätigen.

Dieses Modell bietet die Möglichkeit, die in anderen Modellen erhobenen Ergebnisse zu verifizieren.

IV.6. Ausblick

Die Verwendung der HL-1-Zellen ermöglicht eine neue Qualität der Experimente, da es eine herzähnliche, immortale Zelllinie ist, die kultiviert werden kann. Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente erzielten verglichen mit den Ergebnissen bei isolierten Herzen an der Langendorffanlage ähnliche Ergebnisse. Die Modifizierung des Modells mit der Pufferlösung ermöglicht eine spezifischere Wirkung des Kalziumionophors Calcimycin auf die Zellen und simuliert so die Umstände während der Reperfusion besser, als das vorangegangene Modell mit Claycomb-Medium.

Die Erforschung der medikamentösen Postkonditionierung im Zellmodell kann als Vorstufe von Tierversuchen die Kosten und Anzahl der Versuche minimieren. Zu bedenken bleibt, dass sich die Ergebnisse von Zell- und Tierversuchen jedoch erheblich voneinander unterscheiden können. So ist eine Zelle immer losgelöst von den Zellverbindungen und umgebenden Strukturen, wie z.B. Endothelzellen oder neuronalen Leitungsbahnen, die durch Hormone oder Transmitter Einfluss auf die Vorgänge während des Infarktes und der Reperfusion haben. Zudem sind neonatale Rattenkardiomyozyten und HL-1-Zellen den menschlichen Herzzellen nur bedingt ähnlich. Aus diesem Grund kann ein zelluläres Modell nicht die weitere Forschung am Tier und im klinischen Rahmen am Menschen, bzw. Patienten ersetzen. Jedoch dient das hier etablierte Zellmodell dazu, die Erforschung der Postkonditionierungskaskade, z.B. zur vorherigen Testung von Substanzen, sinnvoll zu ergänzen.

V. Zusammenfassung

In der westlichen Welt zählen der Myokardinfarkt, bzw. die kardiovaskulären Erkrankungen, zu den häufigsten Todesursachen. Dies ist einer der Gründe, warum in den vergangenen Jahrzehnten intensiv nach Möglichkeiten gesucht wurde, die Folgen von Herzinfarkten zu minimieren. Grundlage für viele neuere Versuche war die Entdeckung, dass die Wiederdurchblutung des ischämischen Gewebes eine weitere Zellschädigung verursacht, genannt Reperfusionsschaden. Diese Zellen sterben nicht durch die Ischämie, sondern durch ein intrazelluläres Ungleichgewicht der Elektrolytkonzentrationen und einem ATP-Mangel. Es wurde gezeigt, dass man mit Hilfe von Präkonditionierung, später auch Postkonditionierung, diese Gruppe von Zellen vor dem Untergang schützen und somit das verbleibende Infarktareal verkleinern kann.

Im Rahmen dieser experimentellen Arbeit wurde ein zellbasiertes Modell zur Erforschung der Postkonditionierung an Herzzellen so weiterentwickelt, dass Bestandteile der postulierten Signalkaskade der Postkonditionierung auch auf zellulärer Ebene erforscht werden können. Darüber hinaus war es möglich, verschiedene Substanzen in ihrer Fähigkeit diesen Schutz auszulösen, zu untersuchen. Mit Hilfe einer immortalen Tumorzelllinie der Maus (HL-1-Zellen), die herzzellähnliche Eigenschaften besitzt, konnten Zellen so kultiviert werden, dass eine Vielzahl von Experimenten möglich wurde. Durch den Farbstoff TMRE, ein Marker für das mitochondriale Membranpotential, konnte bei Messungen mit der FACS-Technik eine gute Diskriminierung zwischen den toten und vitalen Zellen erreicht werden. Der Austausch des Nährmediums mit einem speziellen Puffer während der Experimente bewirkte, dass die Konzentration von Calcimycin, bei gleicher Wirkung, herabgesetzt werden konnte. Calcimycin ist ein Kalziumionophor, der den tödlichen Reperfusionsschaden auf der Basis einer Kalziumüberladung auslöst. So konnte anhand dieses Zellmodells die schützende Wirkung von z.B. BAY 58-2667 und Eplerenon auf ischämiegeschädigte Zellen bestätigt werden.

Es konnte gezeigt werden, dass es ein Modell auf dieser Basis ermöglicht, Bestandteile der Signalkaskade zu identifizieren und Pharmaka auf ihren infarktgrößenreduzierenden Effekt zu testen. Die Methode stellt allerdings keinen Ersatz zu Tierexperimenten und klinischen Forschungen dar, dennoch ist sie eine gute Möglichkeit die Substanzen vorab auf ihre Tauglichkeit zu testen und somit gezielter Tierversuche durchzuführen.

VI. Quellenverzeichnis

- (1) Reimer KA, Lowe JE, Rasmussen MM, Jennings RB. The wavefront phenomenon of ischemic cell death. 1. Myocardial infarct size vs duration of coronary occlusion in dogs. *Circulation* 1977; 56(5):786-794.
- (2) Reimer KA, Jennings RB. The "wavefront phenomenon" of myocardial ischemic cell death. II. Transmural progression of necrosis within the framework of ischemic bed size (myocardium at risk) and collateral flow. *Lab Invest* 1979; 40(6):633-644.
- (3) Piper HM, Garcia-Dorado D, Ovize M. A fresh look at reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 1998; 38(2):291-300.
- (4) Jennings RB, Sommers HM, Smyth GA, Flack HA, Linn H. Myocardial necrosis induced by temporary occlusion of a coronary artery in the dog. *Arch Pathol* 1960; 70:68-78.
- (5) Hearse DJ, Humphrey SM, Chain EB. Abrupt reoxygenation of the anoxic potassium-arrested perfused rat heart: a study of myocardial enzyme release. *J Mol Cell Cardiol* 1973; 5(4):395-407.
- (6) Downey JM, Cohen MV. Reducing infarct size in the setting of acute myocardial infarction. *Prog Cardiovasc Dis* 2006; 48(5):363-371.
- (7) Bolli R. Mechanism of myocardial "stunning". *Circulation* 1990; 82(3):723-738.
- (8) Heyndrickx GR, Millard RW, McRitchie RJ, Maroko PR, Vatner SF. Regional myocardial functional and electrophysiological alterations after brief coronary artery occlusion in conscious dogs. *J Clin Invest* 1975; 56(4):978-985.
- (9) Reffelmann T, Kloner RA. The no-reflow phenomenon: A basic mechanism of myocardial ischemia and reperfusion. *Basic Res Cardiol* 2006; 101(5):359-372.
- (10) Ferdinandy P, Schulz R, Baxter GF. Interaction of cardiovascular risk factors with myocardial ischemia/reperfusion injury, preconditioning, and postconditioning. *Pharmacol Rev* 2007; 59(4):418-458.
- (11) Haworth RA, Hunter DR. The Ca²⁺-induced membrane transition in mitochondria. II. Nature of the Ca²⁺ trigger site. *Arch Biochem Biophys* 1979; 195(2):460-467.
- (12) Hausenloy DJ, Yellon DM. The mitochondrial permeability transition pore: its fundamental role in mediating cell death during ischaemia and reperfusion. *J Mol Cell Cardiol* 2003; 35(4):339-341.
- (13) Ferdinandy P, Schulz R, Baxter GF. Interaction of cardiovascular risk factors with

myocardial ischemia/reperfusion injury, preconditioning, and postconditioning. *Pharmacol Rev* 2007; 59(4):418-458.

- (14) Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 1986; 74(5):1124-1136.
- (15) Downey JM, Krieg T, Cohen MV. Mapping Preconditioning's Signaling Pathways: An Engineering Approach. *Ann N Y Acad Sci* 2008; 1123:187-196.
- (16) Liu GS, Thornton J, Van Winkle DM, Stanley AW, Olsson RA, Downey JM. Protection against infarction afforded by preconditioning is mediated by A1 adenosine receptors in rabbit heart. *Circulation* 1991; 84(1):350-356.
- (17) Wall TM, Sheehy R, Hartman JC. Role of Bradykinin in Myocardial Preconditioning. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 1994; 270(2):681-689.
- (18) Schultz JE, Rose E, Yao Z, Gross GJ. Evidence for involvement of opioid receptors in ischemic preconditioning in rat hearts. *Am J Physiol* 1995; 268(5 Pt 2):H2157-H2161.
- (19) Downey JM, Davis AM, Cohen MV. Signaling pathways in ischemic preconditioning. *Heart Fail Rev* 2007; 12(3-4):181-188.
- (20) Goto M, Liu Y, Yang XM, Ardell JL, Cohen MV, Downey JM. Role of bradykinin in protection of ischemic preconditioning in rabbit hearts. *Circ Res* 1995; 77(3):611-621.
- (21) Baines CP, Goto M, Downey JM. Oxygen radicals released during ischemic preconditioning contribute to cardioprotection in the rabbit myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 1997; 29(1):207-216.
- (22) Miki T, Cohen MV, Downey JM. Opioid receptor contributes to ischemic preconditioning through protein kinase C activation in rabbits. *Mol Cell Biochem* 1998; 186(1-2):3-12.
- (23) Pain T, Yang XM, Critz SD, Yue Y, Nakano A, Liu GS, Heusch G, Cohen MV, Downey JM. Opening of mitochondrial K(ATP) channels triggers the preconditioned state by generating free radicals. *Circ Res* 2000; 87(6):460-466.
- (24) Krieg T, Cui L, Qin Q, Cohen MV, Downey JM. Mitochondrial ROS generation following acetylcholine-induced EGF receptor transactivation requires metalloproteinase cleavage of proHB-EGF. *J Mol Cell Cardiol* 2004; 36(3):435-443.
- (25) Qin Q, Downey JM, Cohen MV. Acetylcholine but not adenosine triggers preconditioning through PI3-kinase and a tyrosine kinase. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003; 284(2):H727-H734.
- (26) Krieg T, Qin Q, Philipp S, Alexeyev MF, Cohen MV, Downey JM. Acetylcholine and bradykinin trigger preconditioning in the heart through a pathway that includes Akt and NOS. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004; 287(6):H2606-H2611.
- (27) Hausenloy DJ, Tsang A, Mocanu MM, Yellon DM. Ischemic preconditioning protects

- by activating prosurvival kinases at reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; 288(2):H971-H976.
- (28) Hausenloy DJ, Maddock HL, Baxter GF, Yellon DM. Inhibiting mitochondrial permeability transition pore opening: a new paradigm for myocardial preconditioning? *Cardiovasc Res* 2002; 55(3):534-543.
- (29) Hausenloy DJ, Yellon DM. New directions for protecting the heart against ischaemia-reperfusion injury: targeting the Reperfusion Injury Salvage Kinase (RISK)-pathway. *Cardiovasc Res* 2004; 61(3):448-460.
- (30) Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, Zeiher AM. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature* 1999; 399(6736):601-605.
- (31) Costa AD, Garlid KD, West IC, Lincoln TM, Downey JM, Cohen MV, Critz SD. Protein Kinase G Transmits the Cardioprotective Signal From Cytosol to Mitochondria. *Circ Res* 2005; 97(4):329-336.
- (32) Forbes RA, Steenbergen C, Murphy E. Diazoxide-induced cardioprotection requires signaling through a redox-sensitive mechanism. *Circ Res* 2001; 88(8):802-809.
- (33) Tritto I, D'Andrea D, Eramo N, Scognamiglio A, De Simone C, Violante A, Esposito A, Chiariello M, Ambrosio G. Oxygen radicals can induce preconditioning in rabbit hearts. *Circ Res* 1997; 80(5):743-748.
- (34) Korichneva I, Hoyos B, Chua R, Levi E, Hammerling U. Zinc release from protein kinase C as the common event during activation by lipid second messenger or reactive oxygen. *J Biol Chem* 2002; 277(46):44327-44331.
- (35) Solenkova NV, Solodushko V, Cohen MV, Downey JM. Endogenous adenosine protects preconditioned heart during early minutes of reperfusion by activating Akt. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; 290(1):H441-H449.
- (36) Philipp S, Yang XM, Cui L, Davis AM, Downey JM, Cohen MV. Postconditioning Protects Rabbit Hearts Through a PKC-Adenosine A_{2b} Receptor Cascade. *Cardiovasc Res* . 2006.
- (37) Halestrap AP, Clarke SJ, Javadov SA. Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion--a target for cardioprotection. *Cardiovasc Res* 2004; 61(3):372-385.
- (38) Hausenloy DJ, Yellon DM, Mani-Babu S, Duchon MR. Preconditioning protects by inhibiting the mitochondrial permeability transition. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004; 287(2):H841-H849.
- (39) Juhaszova M, Zorov DB, Kim SH, Pepe S, Fu Q, Fishbein KW, Ziman BD, Wang S, Ytrehus K, Antos CL, Olson EN, Sollott SJ. Glycogen synthase kinase-3beta mediates convergence of protection signaling to inhibit the mitochondrial permeability

- transition pore. *J Clin Invest* 2004; 113(11):1535-1549.
- (40) Tissier R, Cohen MV, Downey JM. Protecting the acutely ischemic myocardium beyond reperfusion therapies: are we any closer to realizing the dream of infarct size elimination? *Arch Mal Coeur Vaiss* 2007; 100(9):794-802.
 - (41) Zhao ZQ, Corvera JS, Halkos ME, Kerendi F, Wang NP, Guyton RA, Vinten-Johansen J. Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003; 285(2):H579-H588.
 - (42) Ovize M, Baxter GF, Di Lisa F, Ferdinandy P, Garcia-Dorado D, Hausenloy DJ, Heusch G, Vinten-Johansen J, Yellon DM, Schulz R. Postconditioning and protection from reperfusion injury: where do we stand?: Position Paper from the Working Group of Cellular Biology of the Heart of the European Society of Cardiology. *Cardiovasc Res* 2010.
 - (43) Miki T, Cohen MV, Downey JM. Opioid receptor contributes to ischemic preconditioning through protein kinase C activation in rabbits. *Mol Cell Biochem* 1998; 186(1-2):3-12.
 - (44) Krieg T, Liu Y, Rütz T, Methner C, Yang XM, Dost T, Felix SB, Stasch JP, Cohen MV, Downey JM. BAY 58-2667, a nitric oxide-independent guanylyl cyclase activator, pharmacologically post-conditions rabbit and rat hearts. *Eur Heart J* 2009; 30(13):1607-1613.
 - (45) Kukreja R, Salloum F, Xi L. Anti-ischemic effects of sildenafil, vardenafil and tadalafil in heart. *Int J Impot Res* 2007; 19(2):226-227.
 - (46) Maas O, Donat U, Frenzel M, Rütz T, Kroemer HK, Felix SB, Krieg T. Vardenafil protects isolated rat hearts at reperfusion dependent on GC and PKG. *Br J Pharmacol* 2008.
 - (47) Armstrong SC, Liu GS, Downey JM, Ganote CE. Potassium channels and preconditioning of isolated rabbit cardiomyocytes: effects of glyburide and pinacidil. *J Mol Cell Cardiol* 1995; 27(8):1765-1774.
 - (48) Akao M, O'Rourke B, Teshima Y, Seharaseyon J, Marban E. Mechanistically distinct steps in the mitochondrial death pathway triggered by oxidative stress in cardiac myocytes. *Circulation Research* 2003; 92(2):186-194.
 - (49) Förster K, Paul I, Solenkova N, Staudt A, Cohen MV, Downey JM, Felix SB, Krieg T, NECA at reperfusion limits infarction and inhibits formation of the mitochondrial permeability transition pore by activating p70S6 kinase. *Basic Res Cardiol* 2006; 101(4):319-326.
 - (50) Garlid KD, Paucek P, Yarov-Yarovoy V, Murray HN, Darbenzio RB, D'Alonzo AJ, Lodge NJ, Smith MA, Grover GJ. Cardioprotective effect of diazoxide and its interaction with mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channels. Possible mechanism of

- cardioprotection. *Circ Res* 1997; 81(6):1072-1082.
- (51) Krenz M, Oldenburg O, Wimpee H, Cohen MV, Garlid KD, Critz SD, Downey JM, Benoit JN. Opening of ATP-sensitive potassium channels causes generation of free radicals in vascular smooth muscle cells. *Basic Res Cardiol* 2002; 97(5):365-373.
 - (52) Yetgin T, Manintveld OC, Duncker DJ, van der Giessen WJ. Postconditioning against ischaemia-reperfusion injury: ready for wide application in patients? *Neth Heart J* 2010; 18(7-8):389-392.
 - (53) Wallukat G, Will-Shahab L, Schulze W, Wollenberger A. Incidence of noradrenaline in the cultures of isolated heart ventricle cells of newborn rats. *Acta Biol Med Ger* 1974; 33(4):K57-K62.
 - (54) Claycomb WC, Lanson NA, Jr., Stallworth BS, Egeland DB, Delcarpio JB, Bahinski A, Izzo NJ Jr. HL-1 cells: a cardiac muscle cell line that contracts and retains phenotypic characteristics of the adult cardiomyocyte. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95(6):2979-2984.
 - (55) Abbott BJ, Fukuda DS, Dorman DE, Occolowitz JL, Debono M, Farhner L. Microbial transformation of A23187, a divalent cation ionophore antibiotic. *Antimicrob Agents Chemother* 1979; 16(6):808-812.
 - (56) Stasch JP, Schmidt P, Alonso-Alija C, Apeler H, Dembowski K, Haerter M, Heil M, Minuth T, Perzborn E, Pleiss U, Schramm M, Schroeder W, Schröder H, Stahl E, Steinke W, Wunder F. NO- and haem-independent activation of soluble guanylyl cyclase: molecular basis and cardiovascular implications of a new pharmacological principle. *Br J Pharmacol* 2002; 136(5):773-783.
 - (57) Murray CJ, Lopez AD. Alternative projections of mortality and disability by cause 1990-2020: Global Burden of Disease Study. *Lancet* 1997; 349(9064):1498-1504.
 - (58) Gomez L, Paillard M, Thibault H, Derumeaux G, Ovize M. Inhibition of GSK3beta by postconditioning is required to prevent opening of the mitochondrial permeability transition pore during reperfusion. *Circulation* 2008; 117(21):2761-2768.
 - (59) Ferdinandy P, Schulz R, Baxter GF. Interaction of cardiovascular risk factors with myocardial ischemia/reperfusion injury, preconditioning, and postconditioning. *Pharmacol Rev* 2007; 59(4):418-458.
 - (60) Reed PW, Lardy HA. A23187: a divalent cation ionophore. *J Biol Chem* 1972; 247(21):6970-6977.
 - (61) Penzo D, Petronilli V, Angelin A, Cusan C, Colonna R, Scorrano L, Pagano F, Prato M, Di Lisa F, Bernardi P. Arachidonic acid released by phospholipase A(2) activation triggers Ca(2+)-dependent apoptosis through the mitochondrial pathway. *J Biol Chem* 2004; 279(24):25219-25225.
 - (62) Schmidt HH, Schmidt PM, Stasch JP. NO- and haem-independent soluble guanylate cyclase activators. *Handb Exp Pharmacol* 2009;(191):309-339.

- (63) Lösel RM, Feuring M, Falkenstein E, Wehling M. Nongenomic effects of aldosterone: cellular aspects and clinical implications. *Steroids* 2002; 67(6):493-498.
- (64) Lösel RM, Falkenstein E, Feuring M, Schultz A, Tillmann HC, Rossol-Haseroth K, Wehling M. Nongenomic steroid action: controversies, questions, and answers. *Physiol Rev* 2003; 83(3):965-1016.
- (65) Fujita M, Minamino T, Asanuma H, Sanada S, Hirata A, Wakeno M, Myoishi M, Okuda H, Ogai A, Okada K, Tsukamoto O, Koyama H, Hori M, Kitakaze M. Aldosterone nongenomically worsens ischemia via protein kinase C-dependent pathways in hypoperfused canine hearts. *Hypertension* 2005; 46(1):113-117.
- (66) Schmidt K, Tissier R, Ghaleh B, Drogies T, Felix SB, Krieg T. Cardioprotective effects of mineralocorticoid receptor antagonists at reperfusion. *Eur Heart J* 2010; 31(13):1655-1662.
- (67) <https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Todesursachen/Aktuell.html>, 05.03.2012 13Uhr
- (68) Renz- Polster H, Krautzig S, Braun J, 1.5.4. Koronare Herzkrankheiten - Therapie, Urban & Fischer, Elsevier, Basislehrbuch Innere Medizin 3. Auflage, März 2004, Jena, 71-75

VII. Anhang

VII 1. Einstellungen des FACS-Geräts

Neonatale Rattenkardiomyozyten

| Parameter | Detektor | el. Spannung | Ampere-Verstärkung | Modus |
|------------------|-----------------|---------------------|---------------------------|---------------|
| P1 | FSC | E-1 | 1,00 | linear |
| P2 | SSC | 366 | 1,16 | linear |
| P3 | FL-1 | 407 | 1,00 | logarithmisch |
| P4 | FL-2 | 450 | 1,00 | logarithmisch |
| P5 | FL-3 | 443 | 1,00 | logarithmisch |

HL-1 Zellen

| Parameter | Detektor | el. Spannung | Ampere-Verstärkung | Modus |
|------------------|-----------------|---------------------|---------------------------|---------------|
| P1 | FSC | E00 | 1,00 | linear |
| P2 | SSC | 400 | 1,16 | linear |
| P3 | FL-1 | 407 | 1,00 | logarithmisch |
| P4 | FL-2 | 450 | 1,00 | logarithmisch |
| P5 | FL-3 | 443 | 1,00 | logarithmisch |

HL-1 Zellen im Apoptose-Versuch

| Parameter | Detektor | el. Spannung | Ampere-Verstärkung | Modus |
|------------------|-----------------|---------------------|---------------------------|---------------|
| P1 | FSC | E-1 | 8,62 | linear |
| P2 | SSC | 396 | 1,16 | linear |
| P3 | FL-1 | 407 | 1,00 | logarithmisch |
| P4 | FL-2 | 380 | 1,00 | logarithmisch |
| P5 | FL-3 | 443 | 1,00 | logarithmisch |

VII. 2. Zusammenfassung der Ergebnisse der FACS-Versuche:

Tab. Die Wirkung von SB 216763 auf Neonatale Rattenkardiomyozyten unter Wasserstoffperoxid-Stress (siehe auch Abb. III.2.). Aufgetragen wurden die vier Zeitpunkte 0 min, 20 min, 40 min und 60 min. Die gezeigten Werte sind die mittleren TMRE-Fluoreszenzintensitäten \pm SEM. Die Signifikanzen wurden mittels T-Test ermittelt und beziehen sich jeweils auf die mit H₂O₂ behandelte Kontrollgruppe desselben Zeitpunktes.

| Gruppe | n | Mittelwert \pm SEM | Signifikanz |
|--|---|----------------------|--|
| H ₂ O ₂ 0 min | 4 | 283,70 \pm 60,29 | |
| H ₂ O ₂ + SB 216763 0 min | 4 | 340,03 \pm 91,66 | ns (vs. H ₂ O ₂ desselben Zeitpunktes) |
| H ₂ O ₂ 20 min | 4 | 141,48 \pm 4,73 | ns (vs. H ₂ O ₂ 0 min) |
| H ₂ O ₂ + SB 216763 20 min | 4 | 270,23 \pm 26,84 | p = 0,003 (vs. H ₂ O ₂ desselben Zeitpunktes) |
| H ₂ O ₂ 40 min | 4 | 106,69 \pm 6,96 | p = 0,027 (vs. H ₂ O ₂ 0 min) |
| H ₂ O ₂ + SB 216763 40 min | 4 | 247,67 \pm 20,82 | p \leq 0,001 (vs. H ₂ O ₂ desselben Zeitpunktes) |
| H ₂ O ₂ 60 min | 4 | 81,77 \pm 7,45 | p = 0,016 (vs. H ₂ O ₂ 0 min) |
| H ₂ O ₂ + SB 216763 60 min | 4 | 203,40 \pm 21,65 | p = 0,002 (vs. H ₂ O ₂ desselben Zeitpunktes) |

Tab. Die Wirkung von Calcimycin auf Zellen der HL-1-Linie im zeitlichen Verlauf (siehe auch Abb. III.3.). Zu fünf Zeitpunkten [0, 20, 40, 60 und 80 min] wurden jeweils eine Kontrolle und eine mit Calcimycin behandelte Gruppe gemessen. Gezeigt sind die mittlere TMRE-Fluoreszenzaktivität der einzelnen Gruppen und deren Signifikanzen versus Kontrolle desselben Zeitpunktes.

| Gruppe | n | Mittelwert \pm SEM | Signifikanz vs. Kontrolle desselben Zeitpunktes |
|-------------------|----|----------------------|---|
| Kontrolle 0 min | 10 | 1595,25 \pm 193,03 | |
| Calcimycin 0 min | 10 | 2001,65 \pm 195,82 | ns |
| Kontrolle 20 min | 10 | 1610,34 \pm 179,17 | |
| Calcimycin 20 min | 10 | 1322,58 \pm 150,88 | ns |
| Kontrolle 40 min | 9 | 1533,47 \pm 151,44 | |
| Calcimycin 40 min | 10 | 812,76 \pm 113,28 | p = 0,001 |
| Kontrolle 60 min | 10 | 1336,09 \pm 146,14 | |
| Calcimycin 60 min | 10 | 596,98 \pm 79,65 | p \leq 0,001 |
| Kontrolle 80 min | 5 | 992,61 \pm 258,42 | |
| Calcimycin 80 min | 5 | 413,20 \pm 85,76 | ns |

Tab. Die Wirkung von BAY 58-2667 auf mit Calcimycin gestresste Zellen der HL-1-Linie (siehe auch Abb. III.4.). Aufgetragen sind Kontrolle, Calcimycin-Gruppe und eine mit BAY 58-2667 und Calcimycin behandelte Gruppe zum Zeitpunkt 0 und 60 min. Angegeben wurde die mittlere Fluoreszenzaktivität \pm SEM und deren Signifikanz.

| Gruppe | n | Mittelwert \pm SEM | Signifikanz |
|------------------------------------|----|----------------------|--|
| Kontrolle 0 min | 23 | 1161,99 \pm 38,02 | |
| Calcimycin 0 min | 23 | 1215,85 \pm 36,12 | |
| Calcimycin + BAY 58-2667 0 min | 23 | 1185,86 \pm 45,95 | |
| Kontrolle 60 min | 22 | 1006,19 \pm 33,96 | |
| Calcimycin 60 min | 23 | 485,89 \pm 20,23 | p \leq 0,001 (vs. Kontrolle 60 min) |
| Calcimycin + BAY 58-2667 60 min | 23 | 562,67 \pm 24,69 | p = 0,044 (vs. Calcimycin 60 min) |

Tab. Die Wirkung von Eplerenon auf Calcimycin gestresste HL-1-Zellen (siehe auch Abb. III.5.). Aufgetragen sind Kontrolle, Calcimycin-Gruppe und eine mit Eplerenon und Calcimycin behandelte Gruppe zum Zeitpunkt 0 und 60 min. Angegeben wurde die mittlere Fluoreszenzaktivität \pm SEM und deren Signifikanz.

| Gruppe | n | Mittelwert \pm SEM | Signifikanz |
|----------------------------------|----|----------------------|--|
| Kontrolle 0 min | 11 | 1264,72 \pm 55,97 | |
| Calcimycin 0 min | 11 | 1374,06 \pm 91,86 | |
| Calcimycin Eplerenon 0 min | 11 | 1369,33 \pm 64,82 | |
| Kontrolle 60 min | 11 | 1026,33 \pm 34,55 | |
| Calcimycin 60 min | 11 | 677,56 \pm 37,22 | p \leq 0,001 (vs. Kontrolle 60 min) |
| Calcimycin + Eplerenon 60 min | 11 | 800,50 \pm 50,17 | p = 0,043 (vs. Calcimycin 60 min) |

Tab. Die Wirkung von Calcimycin auf HL-1-Zellen in Pufferlösung (siehe auch Abb. III.6.). Aufgetragen ist die mittlere TMRE-Fluoreszenz \pm SEM einer Kontrolle und einer mit Calcimycin behandelten Gruppe und deren Signifikanzen gegenüber der Kontrolle desselben Zeitpunktes.

| Gruppe | n | Mittelwert \pm SEM | Signifikanz vs. Kontrolle desselben Zeitpunktes |
|-------------------|----|----------------------|---|
| Kontrolle 0 min | 10 | 1151,34 \pm 95,48 | |
| Calcimycin 0 min | 10 | 1245,62 \pm 82,69 | ns |
| Kontrolle 20 min | 9 | 1085,34 \pm 111,46 | |
| Calcimycin 20 min | 10 | 799,99 \pm 53,80 | p = 0,029 |
| Kontrolle 30min | 8 | 1099,99 \pm 117,98 | |
| Calcimycin 30 min | 8 | 375,97 \pm 61,63 | p \leq 0,001 |

Tab. Die Wirkung von BAY 58-2667 und DT-2 auf Calcimycin-Stress in Pufferlösung (siehe auch Abb. III.7.) Aufgetragen ist die mittlere TMRE-Fluoreszenzaktivität \pm SEM der einzelnen Gruppen. Calcimycin allein wurde auf 100% gesetzt und die weiteren Gruppen im Verhältnis dazu.

| Gruppe | n | Mittelwert \pm SEM | Signifikanz |
|---------------------------------------|----------|--|--|
| Calcimycin | 21 | 100,00 \pm 0,0 | |
| Calcimycin + BAY 58-2667 | 21 | 118,57 \pm 4,42 | p = 0,014 (vs. Calcimycin) |
| Calcimycin + BAY 58-2667 + DT2 | 21 | 102,09 \pm 8,24 | p = 0,028 (vs. Calcimycin + BAY 58-2667) |
| Calcimycin +DT-2 | 16 | 100,10 \pm 4,88 | ns (vs. Calcimycin) |

Tab. Wirkung von Vardenafil auf Propidiumiodid gefärbte Zellen unter Calcimycinstress (siehe auch Abb. III.8.). Aufgetragen ist die mit Propidiumiodid angefärbten toten Zellen in % bezogen auf die Gesamtzahl.

| Gruppe | n | Mittelwert \pm SEM | Signifikanz |
|---------------------------------------|----------|--|---|
| Calcimycin | 13 | 79,96 \pm 1,64 | |
| Calcimycin + Vardenafil | 13 | 74,38 \pm 1,09 | p = 0,005 (vs. Calcimycin) |
| Calcimycin + Vardenafil + ODQ | 2 | 78,31 \pm 0,29 | ns (vs. Calcimycin + Vardenafil) |
| Calcimycin + Vardenafil + DT-2 | 2 | 83,15 \pm 0,05 | p = 0,020 (vs. Calcimycin + Vardenafil) |
| Calcimycin + ODQ | 2 | 81,92 \pm 0,96 | ns (vs. Calcimycin) |
| Calcimycin + DT-2 | 2 | 79,69 \pm 1,97 | ns (vs. Calcimycin) |

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass diese Arbeit bisher von mir weder an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald noch einer anderen wissenschaftlichen Einrichtung zum Zwecke der Promotion eingereicht wurde.

Ferner erkläre ich, dass ich diese Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die darin angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Wissenschaftliche Arbeiten

Originalpublikationen

Maas O, Donat U, Frenzel M, Rütz T, Kroemer HK, Felix SB. (2008) Vardenafil protects isolated rat hearts at reperfusion dependent on GC and PKG. Br J Pharmacol.2008 May; 154(1):25-31

Abstracts

Frenzel M, Methner C, Felix SB, Krieg T. (2008) The guanylyl cyclase activator BAY58-2667 protects isolated rat hearts against ischemia-reperfusion injury. Clin Res Cardiol 97-Suppl 1.

Rydel-Könecke K, Frenzel M, Felix SB, Krieg T. (2008) Cardioprotective effects of eplerenone at reperfusion in isolated rat hearts. Clin Res Cardiol 97- Suppl