

Aus der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin B
Direktor Univ.-Prof. Dr. S.B. Felix
der Medizinischen Fakultät der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald

**Funktionelle Charakterisierung endogener postischämisch
freigesetzter Mediatoren an isolierten Rattenherzmuskelzellen**

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

vorgelegt von Corina Labitzke
geboren am 11.04.1979
in Rüdersdorf bei Berlin

2005

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

1. Gutachter: PD Dr. med. Alexander Staudt

2. Gutachter: PD Dr. med. Verena Stangl

(3. Gutachter:)

Ort, Raum: Greifswald, Seminarraum der Klinik für Innere Medizin B

Tag der Disputation: 10.04.2006

Gliederung

1. Einführung	5
1.1 Die koronare Herzkrankheit	5
1.2 Folgen der Ischämie	8
1.2.1 Ischämische Präkonditionierung	8
1.2.2 Hibernating myocardium	10
1.2.3 Stunning	11
1.2.4 Komplikationen eines Herzinfarktes	12
1.2.5 Folgen für den Gesamtorganismus	12
1.3 Die Herzmuskelzelle	13
1.4 Ischämie am sequentiell perfundierten Herzen	17
1.5 Darstellung der Eicosanoide und ihres Metabolismus	18
2. Aufgabenstellung	23
2.1 Isomere des 17,18 EET	23
2.2 Effekte von Inhibitoren der Cyclooxygenase	23
2.3 Nachweis der Aktivierung ATP-sensitiver Kaliumkanäle	24
3. Material und Methoden	25
3.1 Material	25
3.1.1 Geräte	25
3.1.2 Substanzen	25
3.1.3 Lösungen und Puffer	26
3.1.4 Tiere zur Isolation der Herzmuskelzellen	28
3.2 Methoden	28
3.2.1 Gewinnung der Effluat	28
3.2.2 Bearbeitung der Effluat	29
3.2.3 Isolierung der Extrakte	29
3.2.4 Isolierung und Bearbeitung der Subfraktionen	29
3.2.5 Isolierung der adulten Rattenkardiomyozyten	30
3.2.6 Messung	34
3.2.7 Statistische Analyse	37

4. Ergebnisse	38
4.1 Studienbedingungen	38
4.2 Vorbetrachtung	38
4.3 Charakterisierung der negativ inotropen Mediatoren	40
4.3.1 Charakterisierung des ischämischen Effluates sowie der Derivate	40
4.3.1.1 Kinetik	40
4.3.1.2 Einfluss von Cyclooxygenaseinhibitoren	41
4.3.1.3 Kaliumkanalblockade	51
4.3.2 Charakterisierung der Epoxyeicosatetraensäure 17,18	55
4.3.2.1 Kinetik	55
4.3.2.2 Enantiomere des 17,18 EET	56
4.3.2.3 Cyclooxygenasehemmbarkeit	61
4.3.2.4 Kaliumkanalblockade	69
5. Diskussion	73
5.1 Kardiodepressive Faktoren im postischämischen Effluat	73
5.2 Interaktion der Mediatoren mit Indomethacin, NS-398 und SC-560	75
5.3 Einfluss von Inhibitoren kardialer ATP-sensitiver Kaliumkanäle auf die kardiodepressiven Faktoren	77
5.4 Limitationen und Ausblick	81
6. Zusammenfassung	84
7. Literaturnachweis	86
8. Abkürzungsverzeichnis	101
9. Eidesstattliche Erklärung	103
10. Lebenslauf	104
11. Dank	106

1. Einführung

1.1 Die koronare Herzkrankheit

In Deutschland ist die koronare Herzkrankheit (KHK) die häufigste zum Tode führende Organerkrankung. 5-10% der Männer und 2-5% der Frauen leiden an einer KHK.

Laut World Health Report gehen nahezu 30% der globalen Todesfälle auf kardiovaskuläre Krankheiten zurück [1]. Von 16,7 Millionen Todesfällen durch Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems werden 7,2 Millionen durch einen Herzinfarkt hervorgerufen [1]. Moens et al [2] geht sogar so weit zu behaupten, dass der Herzinfarkt die Haupttodesursache in der Welt sei.

Definitionsgemäß beruhen die klinischen Formen der koronaren Herzkrankheit auf einer stenosierenden Erkrankung der Herzkranzgefäße. Sie basiert in erster Linie auf einer Atherosklerose, die zu einer mangelhaften Sauerstoffversorgung des Myokards führt.

Die WHO definiert die Atherosklerose als variable Kombination von Intima-veränderungen, bestehend aus herdförmigen Ansammlungen von Lipiden, komplexen Kohlenhydraten, Blut und Blutbestandteilen, Bindegewebe und Kalziumablagerungen, verbunden mit Änderungen der Arterienmedia [3].

Die resultierenden Stenosen der Herzkranzgefäße drosseln die Sauerstoffversorgung des Myokards und während der suffiziente Koronarkreislauf die Durchblutung dem wechselnden Bedarf des Herzens an Sauerstoff und Blut anzupassen vermag, gelingt dieses hier nicht mehr. Man spricht von Koronarinsuffizienz. Oft verschließt auch ein Thrombus akut diese stark verengten Gefäße.

Mit mehr als 90% ist die entstehende primäre Koronarinsuffizienz die Hauptursache myokardialer Ischämien.

Der entstehende Herzinfarkt ist gekennzeichnet durch eine zusammenhängende Herzmuskelnekrose. Dabei handelt es sich um eine Koagulationsnekrose in Form eines anämischen Infarktes im Versorgungsgebiet eines der drei Koronarhauptstämme [3].

Das klinische Bild des akuten Infarktes charakterisieren häufig heftigste Herzschmerzen, die als vernichtend beschrieben werden.

Zum Teil sind die Patienten an ähnliche Beschwerden gewöhnt, wenn die Erkrankung als Angina pectoris bekannt ist, andererseits kann der Infarkt auch die Erstmanifestation der koronaren Herzkrankheit darstellen.

Beim Menschen ist die Ischämie in der Regel ein regional begrenzter Vorgang, trotzdem ist im Verlauf eines solchen Geschehens eine deutlich herabgesetzte Gesamtleistung des Herzens zu beobachten. Der Zustand einer Minderversorgung führt zu zellulären und molekularen Änderungen. Myokardiale Ischämien induzieren zahlreiche metabolische Ereignisse mit reversiblen und irreversiblen funktionellen und strukturellen Veränderungen.

In der Doppelherzmethode können Katecholamine den Effekt, dabei freigesetzter negativ inotroper wirksamer Substanzen (NIS), in Abhängigkeit von der Ischämiedauer abschwächen [4].

Dabei finden, im Hinblick auf Durchblutung und kontraktile Funktion, Wechselwirkungen zwischen ischämischem und benachbartem nichtischämischem Myokard statt. So wird, zum Beispiel, das ischämische Areal passiv durch die Kontraktion des umgebenen Muskelgewebes gedehnt.

Durch verschiedenste Untersuchungen konnten zelluläre Veränderungen des postischämischen Gewebes festgestellt und mit dem Funktionsverlust des Ventrikel in Zusammenhang gebracht werden [5].

Ein Erklärungsansatz postuliert die herabgesetzte Sensibilität kontraktile Proteine für Kalzium [6], gleichzeitig wird auch die Bildung und Interaktion mit freien Radikalen [7] diskutiert.

Zum Teil geht man von der Bildung zytotoxischer Enzyme aus, auch scheint die veränderte Ca^{++} -Hömeostase [8] eine Rolle zu spielen. Möglicherweise ist ferner eine Dysfunktion des sarkoplasmatischen Retikulum [9] beteiligt. Zusätzlich wird angenommen, dass NO [10] und Adenosin [11, 12] das postischämische Myokard beeinflussen.

Proteine, deren Bildung erst durch das Ischämieereignis angeregt wird, wie die Phospholipase A_2 können die Funktion ebenfalls modulieren [13].

Die Bildung von Sauerstoffradikalen führt zu einer postischämisch erhöhten Lipidperoxidation kardialer Membranen [14]. Überhaupt ändern sich während einer Ischämie die Stoffwechselwege der Myozyten.

Im ischämischen Gewebe entstehen Substanzen, welche negativ inotrop auf den nicht ischämischen Myokardteil wirken. So finden sich in Patienten mit akutem Myokardinfarkt große Gebiete nicht-funktionalen, aber vitalen Gewebes. Dabei ist diese Dysfunktion reversibel [15].

Kardiodepressorische Effekte können freie Radikale [16], NO [17] oder Adenosin [18] vermitteln. Verschiedene Studien der letzten Jahre haben gezeigt, dass Produkte koronarer und endokardialer Endothelzellen hier ebenfalls eine große Rolle spielen [19]. In dieser Gruppe von Produkten des Endothel ist insbesondere das Endothelin [20] zu nennen, welches die myokardiale Kontraktilität beeinflussen kann.

Die Mediatoren, welche für die hier vorgelegte Untersuchung relevant sind, werden jedoch direkt von postischämischen Herzmuskelzellen freigesetzt und wirken sich auf die Gesamtleistung des Herzens negativ aus [21]. Felix et al [4] beschrieb, dass die Faktoren, die von einem isolierten Herzen infolge Ischämie freigesetzt werden, wahrscheinlich nicht vom Endothel abstammen.

Während bereits der Zustand der Ischämie ein erhebliches Gefährdungspotential beinhaltet, kann eine anschließende Reperfusion des ischämischen Areals, obwohl für das Überleben unabdingbar eine weitere Herabsetzung der Myokardleistung bewirken. Das entspricht dem Begriff des Ischämie-Reperfusionsschaden [22]. Die verschiedenen klinischen Manifestationen beinhalten unter anderem Muskelnekrosen, Arrhythmien, Stunning und endotheliale Dysfunktion [2]. Auf Zellebene resultiert ein Nebeneinander von nekrotischen, apoptotischen und normalen Myozyten.

So treten bereits kurz nach Beginn der Reperfusion schädigende Effekte auf, wahrscheinlich schon innerhalb der ersten Minuten.

Es erfolgt eine Änderung der Struktur und Aktivität von Myofilamenten [6], sowie eine Assoziation verschiedener Proteine mit den Myofibrillen [23], möglicherweise auch vermittelt über die MPTP (mitochondrial permeability transition pore) [24, 25] oder eine Interaktion der Mitochondrien mit radikalen Sauerstoffspezies [24].

Weiterhin setzt der ischämische Zellverband Mediatoren frei, welche die Gesamtleistung des Herzens mindern, die also kardiodepressiv wirken. Für diese Substanzen ist die Inhibition der Zellverkürzung und des Kalziumeinstroms beschrieben. So geht Zucchi et al [26] von einer Änderung des Ryanodinrezeptors und der Ca^{++} -freisetzenden Kanäle des sarkoplasmatischen Retikulum aus. Trotz allem gibt es bis heute keine zufriedenstellende Erklärung für diese Mechanismen.

Die bisher beschriebene negativ inotrope Wirkung der untersuchten Mediatoren erfolgt größtenteils durch die Reduktion des intrazellulären Kalziumgehaltes [4, 21, 27]. Eine Reihe von Kontrollmechanismen interferieren mit dem jeweiligen Freisetzungssystem.

In den Herzmuskelzellen zeichnet vor allem der L-Typ- Ca^{++} -Kanal für den Kalziumeinstrom während der Depolarisation verantwortlich. Durch verschiedene Phosphokinasen kann hier eine Modulation erfolgen. Hier ist die Signaltransduktionskaskade von besonderem Interesse, da die Phosphorylierung regulatorischer Proteine durch z.B. die cAMP abhängige Phosphokinase A zur schnellen Regulation der Kontraktilität beiträgt. Bekanntermaßen wird die Aktivität des L-Typ- Ca^{++} -Kanals durch cAMP auf- [28] und durch cGMP herunterreguliert [29]. Auch die ATP regulierten Kaliumkanäle beeinflussen den intrazellulären Kalziumgehalt. Dabei bedingt ihre Öffnung einen Abfall der Konzentration. Felix et al [27] zeigte, dass die NIS, ihren supprimierenden Effekte nicht über die cAMP-abhängige Phosphorylierung des Kanals ausüben.

Um den Effekt des postischämischen Effluates auf den intrazellulären Kalziumhaushalt näher zu bestimmen, wurden die Messungen mit einem UV-Lichtmikroskop durchgeführt. Dadurch konnten Änderungen der Ca^{++} -Konzentration detektiert werden.

1.2 Folgen der Ischämie

Die unterschiedlichen Auswirkungen, welche die koronare Herzkrankheit für den Organismus und vor allem für da Organ selbst haben kann, werden im folgenden Kapitel behandelt.

1.2.1 Ischämische Präkonditionierung

Der Begriff beschreibt den beobachtbaren Schutz des Herzens während einer Ischämie vor dem Auftreten des Stunning und eine Minderung der Infarktgröße nachdem kürzere Ischämie-Intervalle aufgetreten sind [30, 31]. Es wird im allgemeinen angenommen, dass die Präkonditionierung (IPC) intrazelluläre Mechanismen des Zellschutzes aktiviert, welche die Toleranz gegenüber ischämischen Ereignissen verbessern [32]. Zahlreiche Versuche an Tiermodellen belegen die Komplexität der endogenen Kardioprotektion, die mitochondriale, cytosolische, endotheliale und elektrische Vorgänge involviert [33, 34].

Ähnliche Abläufe sind auch für die Skelettmuskulatur [35], Gehirn [36], Niere [37] und Leber [38] beschrieben.

Es ist davon auszugehen, dass auch im menschlichen Herzen entsprechende Mechanismen greifen [32, 39, 40]. Im allgemeinen vermutet man zwei Phasen der Präkonditionierung, spricht dabei von einem ersten und zweiten Fenster [40] mit multiplen Kaskaden.

Ein möglicher Mechanismus ist eine Änderung an den Kanälen des sarkoplasmatischen Retikulum, jedoch bleibt die Kalzium-getriggerte-Kalzium-Freisetzung durch kurze ischämische Episoden unbeeinflusst [26]. Andererseits wird eine Beteiligung von Adenosin vermutet, da dieses unter hypoxischen Bedingungen in den Zellen akkumuliert [11, 12] und in der Lage ist, über die Phospholipase C oder einen G-Protein gekoppelten Mechanismus in den Prozess der Präkonditionierung einzugreifen [41]. Die Proteinkinase A [42] bzw. C [43] und auch MAP-Kinasen [44] (mitogen activated protein) sind vermutlich an der Signaltransduktion beteiligt und können von verschiedensten Substanzen beeinflusst werden. Eine paradoxe protektive Rolle von Sauerstoffradikalen wird diskutiert [30, 31, 45]. Während der Ischämie kommt es zu einer Anhäufung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) [46], die in der Phase der Reperfusion zu massiver kardialer Schädigung führen kann [47], aber essentiell für die Vermittlung des IPC zu sein scheint [46]. Möglicherweise wird der schützende Einfluss der ROS über eine Blockade der MPTP vermittelt [24, 48]. Zahlreiche Medikamente beeinflussen die Ausbildung eines Schutzes, wahrscheinlich ebenfalls über die Interaktion der Bildung von ROS. Dazu gehören die Inhalationsanästhetika [49], Kaliumkanalöffner wie Diazoxide [50], Opioide, Phenylephrin und Bradykinin [51].

Der Einfluss ATP-abhängiger Kaliumkanäle [52, 53] ist belegt, auch wenn weiterhin über den Einfluss mitochondrialer (mK_{ATP}) und oberflächlicher (sK_{ATP}) keine abschließende Aussage getroffen werden kann. Diese könnten durch die Reduktion der Kalziumüberladung einen Schutzmechanismus ausüben [54]. So spricht die Reduktion des Kalziumeinstromes während der Ischämie und Reperfusion durch die Öffnung von sK_{ATP} -Kanälen [55, 56] für eine Rolle der sarkolemalen Kanäle, andererseits bewirkt die Öffnung des mitochondrialen ATP-sensitiven Kaliumkanals eine erhöhte Produktion von Sauerstoffradikalen [57] und könnte über den oben beschriebenen Weg zur Kardioprotektion beitragen.

Weiterhin gibt zahlreiche Hinweise, dass das Vorhandensein der Cyclooxygenase (COX) für die Entstehung einer Präkonditionierung essentiell ist [58, 59]. Möglicherweise besteht auch eine Verbindung zwischen der Aktivierung von Kaliumkanälen und der Aktivität der Cyclooxygenase [58].

Indessen existieren auch Anhaltspunkte, die für eine eher abträgliche Rolle des Enzyms sprechen [60]. Der Schutzfaktor, der von diesem Enzym metabolisiert wird, ist weiterhin unbekannt. Es könnte sich dabei möglicherweise um Fettsäuren handeln, da während der Ischämie und Reperfusion unveresterte Arachidonsäure in den Zellen akkumuliert [61]. Daraus entstehen über die Cyclooxygenase und Lipoxygenase kardioprotektive Metaboliten wie Prostacyclin [62] und 12-HETE, aber auch durch die Verstoffwechslung mittels Cytochrom P 450 Derivate der 20-HETE, die als potente Vasokonstriktoren schädlich für das ischämische Areal wirken. So wird eine Minderung der schädlichen Ischämie-Reperfusionseffekte durch die Inhibition von Cytochrom P 450 Effekten berichtet [62]. Andererseits werden durch Epoxidation Regioisomere gebildet, die in der Lage sind die Schädigung durch Ischämie und Reperfusion für Myokard und vaskuläres System zu senken. Li et al und weitere Autoren [63, 64] beschreiben die induzierbare NO-Synthase als Mediator der späten Phase der Präkonditionierung und sehen dabei ebenfalls eine obligatorische Rolle der COX 2, deren Induktion als Stressantwort verstanden wird.

1.2.2 Hibernating myocardium

Die Ischämie wird grundsätzlich als instabiler Zustand dargestellt, bei dem ein Missverhältnis zwischen Koronardurchblutung und kontraktile Funktion besteht. Im Falle des „Hibernating myocardium“ ist diese Definition nicht zutreffend.

Ausgehend von einer moderaten Ischämie entwickelt sich eine regional reduzierte kontraktile Funktion, die sich proportional zur regionalen Durchblutung verhält [65]. Dieses stellt ein Charakteristikum der „short-term-hibernation“ dar. Dieser Zustand kann über Stunden stabil sein und sich unter Reperfusion erholen [66] ohne irreversible Schäden zu verursachen, geht allerdings mit einem zellulären Remodeling und der Modifikation der Ansprechbarkeit der kontraktile Filamente einher [66]. Ähnlich dem Stunning und Preconditioning wird hier eine veränderte Kalziumhomeostase [67] postuliert.

Auf ionotrope Stimulation sowie bei einer weiteren Abnahme der Durchblutung reagiert das Herz mit einer Unterbrechung der Situation und infarziert [68]. Der genaue Mechanismus, welcher der Hibernation zugrunde liegt, konnte noch nicht abschließend geklärt werden [69].

Die Adaption an eine länger andauernde Hypoperfusion wird als Schutzfunktion diskutiert [70], so dass die Myozyten angesichts chronischer Ischämie überleben können.

Eingriffe in das Genprogramm der Zellen werden ebenfalls belegt [69, 71]. Im Gegensatz dazu beschreibt der Begriff der „long-term-hibernation“ [72] einen Zustand chronisch andauernder schmerzloser Dysfunktion bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit, der sich unter Reperfusion bessert. Möglicherweise verursacht durch eine Kombination repetitiver postischämischer Dysfunktionen, sowie erneuter ischämischer Episoden und Ischämie-Reperfusion-induzierter Veränderungen der Zellen. Hierbei akkumulieren verschiedene Ursachen zu einer sichtbaren Schädigung der Zellen. Es treten profunde Strukturmodifikationen ohne Nekrose auf z.B. ein Verlust an kontraktilen Proteinen [73].

1.2.3 Stunning

Obwohl kurze ischämische Ereignisse protektive Funktion annehmen können, hinterlassen diese auch in einigen Fällen langanhaltende Störungen der kontraktilen Funktion [74].

Die weitgehend normalisierte Blutversorgung des ischämischen Areal widerspricht dabei der dauerhaft reduzierten kontraktilen Funktion. Man spricht von einem „stunned myocardium“ [30, 31]. Dabei ist die kontraktile Funktion im reperfundierten Myokard unter Ruhebedingungen reduziert. Eine ionotrope Stimulation führt dabei nicht zu einem Abfall der metabolischen Situation. Es handelt sich daher nicht um einen Zustand unzureichender Energiebereitstellung. Die Ursache des Phänomens sind vielfältig diskutiert [74]. Unter Umständen besteht auch ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Stunning und dem Phänomen des Hibernating. So tritt ein hibernating myocardium gehäuft nach wiederholten Phasen des Stunning auf [71, 75]. Camici et al [76] bezeichnet Stunning und Hibernating als die zwei unterschiedlichen Seiten einer Medaille.

Während zum einen eine massive Beteiligung freier Radikale postuliert wird [45, 77, 78], wird dieser Theorie auch direkt widersprochen [79] und vielmehr die Rolle der Kalziumüberladung [67] in den Vordergrund gehoben. Es scheint gesichert, dass exzessiv hohe Ca^{++} -Transienten eng mit dem Auftreten des Stunning korrelieren. Wie dies allerdings zustande kommt bzw. durch welchen Mediator hier die Vermittlung stattfindet, ist noch nicht abschließend geklärt [80].

So wird eine Kombination aus Generierung von Sauerstoffradikalen, Änderungen der Ca^{++} -Hömeostase und Modifikation der Struktur [81], der Kalziumsensitivität [82] kontraktiler Proteine [30, 31], des sarkoplasmatischen Retikulum [83] aber auch eine elektromechanische Entkopplung [7] sowie Veränderungen der extrazellulären Matrix [84] diskutiert.

Vor allem über die Veränderung der Troponine besteht Uneinigkeit. So postuliert unter anderem Feng et al [85], dass das Troponin I keine Rolle in der Entwicklung des Stunning einnimmt, während gleichzeitig andere Stimmen dafür sprechen [86]. Colantonio et al [87] wiederum sieht eher eine Beteiligung des Troponin T für erwiesen an.

1.2.4 Komplikationen eines Herzinfarktes

Jeder Myokardinfarkt kann von Komplikationen begleitet werden, die sich zum Teil aus dem beträchtlichen Eingriff in das komplexe Geschehen der Herztätigkeit, andererseits auch aus dem Heilungsprozess erklären [88]. Darunter sind der Sekundenherztod, die Pericarditis epistenocardiaca, parietale Endokardthrombosen, Herzwandaneurysmen, die Ruptur der Herzwand mit daraus resultierender Herzbeutelamponade, Klappeninsuffizienz vor allem der Mitralklappe und Herzrhythmusstörungen zu nennen.

1.2.5 Folgen für den Gesamtorganismus

Nach einem überstandenen Infarkt mit nekrotischen Veränderungen stellt sich für das Herz eine neue Situation ein, da die Muskulatur durch narbige Ereignisse gekennzeichnet ist.

Konnte der Infarkt erst spät oder unzureichend behandelt werden, manifestiert sich eine mehr oder minder ausgeprägte Herzinsuffizienz.

Die Herzinsuffizienz ist eine hämodynamische Situation, die sich als Zustand zeigt, in dem trotz ausreichendem venösen Blutangebotes und Füllungsdruckes das Herz nicht mehr in der Lage ist, den gesamten Organismus seinen Bedürfnissen entsprechend mit Blut zu versorgen.

Dabei sind die Ursachen der Herzinsuffizienz vielseitig.

Nach der EPICAL-Studie [89] ist die koronare Herzkrankheit die häufigste Ursache einer Herzinsuffizienz. In diesem Falle erfolgt durch das Infarktgeschehen eine relative Überlastung des Herzmuskels durch einen Muskelfaserverlust, womit diese Form zu den primär mechanisch bedingten Insuffizienzen gerechnet wird.

Um einer ischämischen Herzinsuffizienz vorzubeugen oder bekannte Ursachen zu beseitigen, entscheidet man sich in den meisten Fällen, je nach Diagnose für eine Bypassoperation, PTCA und/oder Stentimplantation, um den Zustand einer Gefäßstenose zu unterbinden.

Dabei zeigt die primäre intrakoronare Stentversorgung bessere Ergebnisse, als Lysetherapie und der sekundäre Einsatz von Stents [90].

Die primäre Erfolgsrate der alleinigen Ballondilatation liegt bei über 90% [91]. Durch die zunehmende Implantation von Koronarstents konnte die Zahl notfallmässiger Bypassoperationen von ca. 3% auf 0,5% reduziert, die Zahl auftretender Myokardinfarkte von 4-5% auf etwa 1% und die Zahl tödlicher Komplikationen von 1% auf 0,3% gesenkt werden.

Weiterhin besteht das Ziel der klinischen und experimentellen Forschung neue, alternative Therapiekonzepte zu entwickeln.

Die Untersuchung der entstehenden negativ ionotropen Substanzen könnte als Grundlage eines kausalen Therapieansatzes postischämischer Verläufe dienen.

Das postischämische Mediatorengemisch enthält eine Vielzahl von Faktoren, die in Abhängigkeit von der Ischämiedauer kardiodepressorische Effekte vermitteln.

Durch ihre Eigenschaften werden diese näher bestimmt und mittels biochemischer Verfahren soll Aufschluss über die genaue chemische Struktur gewonnen werden, um eine Aussage zu einzelnen Mediatoren treffen zu können.

1.3 Die Herzmuskelzelle

Die durchgeführten Versuche wurden an isolierten, feldstimulierten Rattenherzmuskelzellen realisiert, daher soll im folgenden die Funktion des Herzmuskels auf zellulären Ebene dargestellt werden. Auf die zugrunde liegenden Änderungen der Ionenleitfähigkeit soll an dieser Stelle nur so weit eingegangen werden, wie es den Umfang dieser Arbeit betrifft.

Wird eine Herzmuskelzelle depolarisiert, so folgt dieser Depolarisation ein Aktionspotential (AP), welches programmartig abläuft. Das AP breitet sich entlang des Sarkolemm aus und wird über Einstülpungen der äußeren Zellmembran (T-Tubuli) rasch ins Innere der Muskelfaser fortgeleitet [92]

Der Kontraktionsvorgang der Zelle ist in erster Linie von der intrazellulären Kalziumkonzentration abhängig. Kalziumionen sorgen dafür, dass bei elektrischer Erregung der Zelle eine Kontraktion stattfindet (elektromechanische Kopplung). Dabei ändert sich diese, synchron zu den Schwankungen des Membranpotentials.

An der beschriebenen Änderung der cytosolischen Ca^{++} -Konzentration sind verschiedene Systeme beteiligt.

Es erfolgt ein transmembranöser Kalziumeinstrom, welcher durch die Änderung des Membranpotentials ausgelöst wird.

Dabei unterscheidet man verschiedene Typen spannungsabhängiger Ca^{++} -Kanäle [93]. Der T-Typ Ca^{++} -Kanal weist eine schnelle Aktivierung des Ioneneinstroms auf, ist am Herzen allerdings nur in geringer Anzahl vertreten, so dass der L-Typ Ca^{++} -Kanal den Großteil des transmembranösen Kalziumeinstroms ausmacht, im Gegensatz zum T-Typ-Kanal jedoch nur langsam auf den elektrischen Reiz reagiert. Des Weiteren wurde ein Kanal beschrieben, der noch andere kinetische Eigenschaften aufweist, der N-Typ Ca^{++} -Kanal.

Die L-Typ-Kanäle (Dihydropyridinrezeptoren) sind in den Wänden der T-Tubuli lokalisiert. Das hier, entlang dem Konzentrationsgradienten in die Zelle strömende Calcium gelangt per Diffusion zu unmittelbar benachbarten Ionenkanälen, den Ryanodin-empfindlichen- Ca^{++} -Kanälen. Diese befinden sich in den terminalen Zisternen der L-Tubuli (sarkoplasmatisches Retikulum) und lösen eine Efflux von Kalzium aus.

Den beschriebenen Mechanismus bezeichnet man als Kalzium-getriggerte-Kalzium-Freisetzung, infolge dessen es zu einem massiven Ausstrom vom Kalzium aus dem SR kommt.

Es resultiert eine Kontraktion, wenn die cytosolische Ca^{++} -Konzentration den Ruhewert von 10^{-7} mol/l überschreitet. Dabei spricht man von einer elektromechanischen Kopplungsfunktion des Ca^{++} , denn es verbindet das ablaufende Aktionspotential mit der mechanischen Antwort der Kontraktion. Die Höhe des Calciumeinstroms aus dem Extrazellulärraum und dem SR bestimmt letztlich die Kontraktion der Zelle, dabei steigt die intrazelluläre Kalziumkonzentration etwa um das 15fache des Ruhewertes.

Dieser Anstieg ermöglicht den Übergang von ruhenden zu aktiven Myofilamenten [23]. Hierbei dienen Aktin und Myosin als kontraktile Proteine, die zu Filamenten aufgebaut sind. Daran angelagert befinden sich Regulatorproteine.

Während die dickeren Myosinfilamente hauptsächlich aus Myosin bestehen, ist das Aktinfilament aus dem Aktin selbst, Tropomyosin und dem Troponinkomplex zusammengesetzt.

Eine Erhöhung der cytosolischen Kalziumkonzentration löst eine Konformationsänderung des Troponinkomplexes, bestehend aus Troponin T, C und I aus und ermöglicht damit die Ausbildung einer Querbrücke zwischen Aktin und Myosin.

Die eigentliche Kontraktion findet als Verschiebung der Aktin- und Myosinfilamente gegeneinander statt (Gleitfilamenttheorie).

Die Gesamtheit dieser subzellulär ablaufenden Prozesse bewirkt eine geordnete Kontraktion des Herzmuskel und damit den Auswurf des Schlagvolumens.

Um nachfolgend eine adäquate diastolische Füllung der Ventrikel zu ermöglichen, muss das Myokard relaxieren. Auf molekularer Ebene erfolgt dazu eine Inaktivierung der Aktin-Myosin-Bindung.

Hierzu wird die intrazelluläre Ca^{++} -Konzentration schnell abgesenkt, wodurch es zu einer Dissoziation des Troponinkomplexes kommt, um die Bindungsstellen des Aktin erneut zu blockieren. Die Geschwindigkeit der Relaxierung hängt davon ab, wie schnell die cytoplasmatische Kalziumkonzentration sinkt. Dafür sind vor allem zwei Mechanismen verantwortlich.

Das Ca^{++} wird sowohl direkt aus der Zelle entfernt, über einen $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ -Austauscher durch eine membranständige sarkolemmale Ca^{++} -ATPase [94], als auch durch Sequestrierung der Ionen in das SR abgesenkt. Hier steht es bei einer erneuten Depolarisation der Zelle wieder zur Verfügung.

An Rattenkardiomyozyten zeigte sich, dass die Aufnahme des Kalzium ins SR unter Katalyse einer Ca^{++} -ATPase für bis zu 87% der Entfernung des Ca^{++} aus dem Cytoplasma verantwortlich ist [95], während außerhalb dieses Mechanismus mit 67% die sarkolemmale Ca^{++} -ATPase die Hauptrolle zur Absenkung des intrazellulären Ca^{++} -Gehaltes beiträgt, insgesamt also weniger über den $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ -Austauscher [96].

Als Modulator der Ca^{++} -ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums (SERCA) fungiert Phospholamban [9]. Dessen Phosphorylierung erhöht die Affinität des Kalzium zur Pumpe und führt zu einer Erhöhung der Aktivität [97].

Die Ca^{++} -Regulation erfolgt auch über andere Wege. So beeinflussen z.B. die Dauer des Aktionspotentials und die Änderung der Ca^{++} -Permeabilität den Gehalt der intrazellulären Speicher. Dabei bewirken neuronale, humorale und parakrine Faktoren eine rezeptorvermittelte Aktivierung membran-ständiger Enzyme, wie der Adenylatzyklase. Die Signalübertragung erfolgt hier oft durch Generierung von „second messenger“ wie Ca^{++} , cAMP, cGMP, IP_3 , DAG.

Bei Stimulation von β -Rezeptoren durch adrenerge Innervation wird G-protein-vermittelt die Adenylatzyklase aktiviert, was zu einer Erhöhung der cytosolischen Konzentration von cAMP führt, während eine muskarinerge Innervation dessen Abnahme bewirkt.

Zyklisches AMP aktiviert eine Proteinkinase, diese wiederum phosphoryliert Proteine des Ca^{++} -Kanals und erhöht damit dessen Öffnungszeit, so dass der Kalziumeinstrom über eine längere Zeit erfolgen kann und im Endeffekt eine stärkere Kontraktion auslöst [28]. Im Gegensatz dazu setzt die intrazelluläre Perfusion mit cGMP den Ca^{++} -Einstrom herab [98].

Für viele andere Proteine ist ebenfalls die Phosphorylierung als Modifikation des Aktivitätszustandes beschrieben. So führt die Phosphorylierung von Troponin I zu einer verringerten Ca^{++} -Affinität von Troponin C und damit zu einer beschleunigten Relaxation [99].

Der Erregung der Herzmuskelzelle durch ein Aktionspotential folgt die Normalisierung des Membranpotentials durch den langsamen Anstieg der Leitfähigkeit für Kaliumionen. Die Öffnung von Kaliumkanälen erfolgt physiologisch während der Repolarisationsphase des AP. Dabei strömen Kaliumionen aus und bringen die Herzmuskelzelle in den Ruhezustand zurück.

An einer Herzmuskelzelle sind eine Vielzahl von Kaliumkanälen beschrieben. Sie werden definiert nach Kaliumselektivität und Sensitivität für Kalzium, die intrazelluläre ATP-Konzentration, sowie die pharmakologischen Manipulationsmöglichkeiten [100].

Für das Ruhemembranpotential sind hier depolarisationsaktivierte Kaliumkanäle verantwortlich. Ein anderer Typ des Kaliumkanals ist am Ablauf des Aktionspotentials beteiligt. Weiterhin kommen Kalzium-aktivierte- und ATP-regulierte Kanäle vor. Die letzteren sind aktiv, wenn die Zelle an ATP verarmt, also z.B. während einer Ischämiephase. K_{ATP} -Kanäle wurden initial in pankreatischen β -Zellen und kardialen Zellen entdeckt [101]. Dabei reagiert der Subtyp, der bereits durch geringsten Mengen ATP blockiert wird stets auf Sulfonylhureasen [100]. Die ATP-regulierten Kaliumkanäle können möglicherweise auch unabhängig von ATP beeinflusst werden [102] zum Beispiel durch eine Interaktion mit Myofilamenten.

Die Öffnung von K^+ -Kanälen und der daraus resultierende Efflux von Kaliumionen aus dem Cytosol führt zur Repolarisation und/oder Hyperpolarisation der Zellmembran [103]. Dem folgt eine Reduktion der freien Kalziumkonzentration in der Zelle bzw. eine Inhibition der Produktion von freiem Ca^{++} [104]. Möglicherweise ergibt sich aus der Hyperpolarisation eine verminderte Ansprechbarkeit kontraktile Elemente auf Kalzium [105]. Die Effekte eines Kaliumausstroms aus den Herzmuskelzellen werden unterschiedlich beurteilt, so gibt es Darlegungen, dass ein erhöhtes extrazelluläres Kalium, gerade unter Ischämiebedingungen, zur Entwicklung ventrikulärer Tachykardien und Fibrillationen [106] sowie zum Versagen des Herzens beiträgt. Andererseits werden für den gleichen Vorgang antiarrhythmische Eigenschaften beschrieben [107].

Die kurz angerissenen vielfältigen Regulationsmechanismen können jeweils einzeln, aber auch in der Gesamtheit die Ursache für eine gestörte Kontraktilität bilden.

1.4 Ischämie am sequentiell perfundierten Herzen

Das ischämische Herzgewebe des Infarktgebietes bildet Mediatoren, die sich durch eine kardiodepressive Wirkung auszeichnen. Die Aufgabe der vorliegenden Untersuchung ist es, die Wirkstoffe zu spezifizieren und näher zu charakterisieren.

Die Untersuchungen des postischämischen Effluates wurden an enzymatisch isolierten Rattenkardiomyozyten vorgenommen. Die dafür benötigten Effluare gewann man durch eine spezielle Methodik, bei der Rattenkardiomyozyten sequentiell perfundiert wurden. Vorangegangene Validierungsuntersuchungen zeigten, dass unter Kontrollbedingungen eine sequentielle Perfusion eines Herzens möglich ist, ohne zu einer relevanten Änderung der kontraktile Parameter zu führen [21].

Anders stellte sich die Situation in Voruntersuchungen dar. Die nach einer zehnminütigen globalen Ischämie gewonnenen Effluare präsentieren einen starken negativ inotropen Effekt auf isolierte Kardiomyozyten.

Um die postischämischen Effluare mit Kontrollwerten zu vergleichen, wurden vor der Ischämiephase nichtischämische Kontrolleffluare gewonnen.

Die Inkubation von Kardiomyozyten mit unverdünntem postischämischen Effluat führt zu einer vollständigen Inhibition des systolischen Kalziumeinstromes und der Zellverkürzung. In Vorversuchen stellte sich ein Beginn der negativ inotropen Wirkung bei einer Verdünnung von 1:32 dar, die ihr Maximum bei der Konzentration von 1:2 in Form einer vollständigen Blockade des Kalziumtransienten erreichte [21]. Die Konzentrations-Wirkungskurven von systolischer Kalziumkonzentration und Zellverkürzung bzw. deren Inhibition verliefen nahezu deckungsgleich [21].

In unseren Versuchen lag die verwendete Konzentration der Effluare bei 1:4. Eine Fraktionierung in Zusammenarbeit mit der AG Hagen Schunck, Max-Delbrück-Center, Berlin erbrachte in Vorversuchen eine weitere Einengung des Faktors. Die kardiodepressorische Wirkung konnte für die organische Phase nachgewiesen werden, während der anorganische Rückstand diesen Effekt nicht mehr beinhaltete.

Durch eine HPLC-Fraktionierung und der damit verbundenen Aufteilung der organischen Phase in acht Subfraktionen in Zusammenarbeit mit der AG Hagen Schunck, Max-Delbrück-Center, Berlin erfolgte eine weitere Charakterisierung.

Dabei zeigte sich in der Fraktion 5 erneut der kardiodepressive Effekt

Parallel zu diesen Messungen wurde die Eicosatetraensäure 17,18 und sein vermuteter Antagonist, die Eicosatriensäure 11,12 untersucht, wobei sich die gegensätzliche Wirkung bestätigte. Hierzu inkubierten die Zellen vor der Aufnahme der Ruhewerte 20 min mit 11,12 EET. Danach konnte unter Zugabe von 17,18 EET keine kardiodepressive Wirkung mehr nachgewiesen werden.

11,12 EET wurde in beschriebener Weise mit dem ischämischen Effluat, der organischen Phase und der Fraktion 5 inkubiert und hier dokumentierte sich ebenfalls eine antagonistische Funktion.

Die Eicosatriensäure 11,12 wie auch 17,18 EET ist als potenter Aktivator kalziumabhängiger Kaliumkanäle in glatten Gefäßmuskeln der Koronarien bekannt [108, 109], auch die Aktivierung ATP-sensitiver Kaliumkanäle von Kardiomyozyten gehört zu ihrem Wirkspektrum und man vermutet darin einen wichtigen endogene Regulator kardialer Erregbarkeit [110].

Unter Ruhebedingungen beeinflusst die Anwesenheit von 11,12 EET die Kontraktilität von Myozyten nicht, aber nach einer low-flow Ischämie ist die Erholung deutlich verzögert. Später steigt die Zellverkürzung und die intrazelluläre Kalziumkonzentration [111] wieder an.

1.5 Darstellung der Eicosanoide und ihres Metabolismus

Da 17,18 EET als Mediator in dem postischämischen Faktorengemisch vermutet wird, soll an dieser Stelle auf den Metabolismus und die Bedeutung der Eicosanoide im menschlichen Organismus eingegangen werden.

Eicosanoide, mehrfach ungesättigte Fettsäuren spielen im gesamten Körper als Präkursoren von Prostaglandinen, Leukotrienen und Thromboxanen eine besondere Rolle. Essentielle Fettsäuren wie Linol, Linolen- und Arachidonsäure bilden dabei die Ausgangsstoffe. Die Metabolisierung kann über verschiedene Stoffwechselwege ablaufen [61].

Eicosanoide gehören zu den Membranlipiden aus denen unter Einwirkung einer Phospholipase A₂ Arachidonat, eine Eicosatetraensäure abgespalten wird. Durch die Cyclooxygenase entsteht die Muttersubstanz der Prostaglandine und Thromboxane der Serie 2, das Prostaglandin H₂.

Derivate von Eicosatriensäuren bezeichnet man als der Serie 1 zugehörig und dementsprechend leitet sich die Serie 3 aus den Eicosapentaensäuren ab.

Mit der Ausnahme der Erythrozyten werden Prostaglandine von nahezu jedem Gewebe und jeder Zellart gebildet. Im Gegensatz zu den meisten anderen Hormonen erfolgt keine Lagerung in den Zellen, vielmehr werden Prostaglandine synthetisiert und direkt freigesetzt.

Die Wirkungen der entstandenen Substanzen sind vielfältig und oft gegensätzlich.

Während der Ischämiephase akkumuliert in der Herzmuskelzelle Arachidonsäure, die auf unterschiedlichen Wege verstoffwechselt wird [112] und zur Vasodilatation, Vasokonstriktion, myokardialen Schädigung und Kardioprotektion beiträgt [113].

So entstehen durch die Vermittlung der Cyclooxygenase-1 vor allem Thromboxane (TXA₂) und Prostaglandine (PGI₂, PGE₂), deren Schutzfunktion gut beschrieben ist [114]. Hingegen wird die Isoform 2 der Cyclooxygenase durch den Vorgang der Ischämie bzw. verschiedene Pharmaka wie Opioide [115] selbst erst induziert [59] und trägt durch die Bildung von PGE₂ und PGI₂ [115-117] zum Schutz des Herzens bei. Interessanterweise können schädigende Effekte auf die Magenschleimhaut von Indomethacin durch Kaliumkanalöffner gemindert werden [118], so dass ein Zusammenhang zwischen diesen beiden Effektoren besteht.

Die Eigenschaften von Inhibitoren der Cyclooxygenase 2 sind Gegenstand zahlreicher Diskussionen. So werden ihnen einerseits schädigende kardiale Wirkungen nachgewiesen [119] zum anderen wird dieses auch bezweifelt und von einem Risikoausgleich zwischen Magenschutz und kardialen Risiken gesprochen [120].

Die Verstoffwechslung durch die Lipoxygenase resultiert in Leukotrienen und HETEs (hydroxyeicosatrienoic acids), die wiederum das Herz schützen können [61].

Weiterhin können aus der anfallenden Arachidonsäure durch Cytochrom P 450 Epoxygenasen Epoxyeicosatriensäuren z.B. 5,6 EET, 8,9 EET, 11,12 EET, 14,15 EET gebildet werden, die als potente Vasodilatoren bekannt sind [121]. Dabei handelt es sich um Regioisomere, die unterschiedliche Eigenschaften aufweisen [122]. Es gibt Hinweise, dass die Produktion der 17,18 Epoxyeicosatetraensäure in der Zelle selektiv für das 17r,18s Isomer abläuft [123]. Sie wirken über die Aktivierung ATP abhängiger Kaliumkanäle, indem sie die Sensitivität des Kanals für ATP erhöhen.

Daraus ergibt sich eine höhere Öffnungswahrscheinlichkeit [110]. Ob die EET über die sarkolemmalen [122], die mitochondrialen [124] oder gar beide Kanäle wirken erfreut sich einiger Diskussion. Cytochrom P 450 Hydroxylasen können die Generierung von Hydroxyeicosatetraensäuren wie 16-, 17-, 18-, 19-, 20-HETE bewirken [125]. Diese können in glatten Gefäßmuskelzellen eine Vasokonstriktion durch Inhibition des Kaliumkanals und daraus folgender Depolarisation und Aktivierung des L-Type Kalziumkanals bewirken [126].

Campbell et al [127] beschrieb die EET als EDHF (endothel derived hyperpolarizing factor) und 11,12-EET wurde als endogener Öffner von Kaliumkanälen untersucht und könnte ein vom CYP 450 abstammender Arachidonsäuremetabolit sein [128].

Die Eicosatetraensäure 17,18 (im folgenden abgekürzt als 17,18 EET) wurde von Lauterbach et al [108] als potenter Modulator des Gefäßtonus beschrieben. Die Aktivierung von Kaliumkanälen durch Cytochrom P450 abhängige Metaboliten der Eicosatetraensäure wurde bereits in Gefäßmuskelzellen dargestellt [108].

Mehrfach ungesättigte Fettsäuren reduzieren die spontane Kalziumfreisetzung und die Kontraktilität, außerdem reduzieren sie reversibel das Ruhelevel des Kalzium. Der negativ inotrope Effekt wird über eine Hemmung des L-Typ Ca^{++} -Kanals vermittelt. Der verminderte Ca^{++} -Einstrom ist dabei wahrscheinlich der Hauptmechanismus [129].

So reduzieren die Fettsäuren die Verfügbarkeit des Kalziums für die Aufnahme ins sarkoplasmatische Retikulum, inhibieren aber genauso dessen Freisetzung.

Weiterhin vermitteln sie einen antiarrhythmischen Effekt, der wahrscheinlich durch das erniedrigte Level des intrazellulären Kalziums bewirkt wird.

Verschiedene Medikamente interferieren mit diesem Stoffwechsel.

Nichsteroidale Arzneimittel (NSAIDs) wie Aspirin, Indomethacin und Phenylbutazon finden breiten therapeutischen Einsatz und blockieren irreversibel die Cyclooxygenase, während steroidale antiinflammatorische Substanzen die Phospholipase A_2 hemmen, sozusagen die Arachidonsäure in der Zellmembran immobilisieren.

Der vermutete Mediator 17,18 EET wird als Epoxyeicosatetraensäure durch das Cytochrom P450 dargestellt, welches im Körper ubiquitär vorliegt. Jedoch wird angenommen, dass erst die Cyclooxygenase (COX) das 17,18 EET in seine Wirkform umwandelt.

Seit längerem ist bekannt, dass man nicht von einer Cyclooxygenase sprechen kann, sondern vielmehr zwei Isoformen unterscheidet.

Während die COX 1 als konstitutives Enzym in den meisten Zellen vorliegt und die physiologische Synthese der Prostaglandine bestimmt, liegt die COX 2 nur in wenigen Geweben des Körpers ständig vor. Dazu gehören das Rückenmark, der Uterus und die Niere.

Jedoch kann die COX 2 als „immediate early gene“ durch verschiedene Faktoren zum Beispiel Zytokine schnell induziert werden. Charakteristisch ist ein verstärktes Vorliegen bei Entzündungen, Schmerzreaktionen und anderen Gewebsschäden. Andererseits beteiligt sich die Cyclooxygenase 2 an physiologischen Adaptationsvorgängen wie der Wundheilung.

Die große Gruppe der nichtsteroidalen antiinflammatorischen Medikamente bewirkt eine Hemmung beider Isoformen. Die Hauptindikation bilden Schmerzzustände verschiedener Art, wie Fieber, pathologischen Nocizeptorschmerzen und Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises. Es erfolgt ein breiter Einsatz dieser Medikamentengruppe zur Herabsetzung der Blutviskosität durch Hemmung der Thrombozytenaggregation in Patienten mit Atherosklerose, KHK, Myokardinfarkt und cerebrovaskulären Ischämien. Dabei ergeben sich, je nach Selektivität des Inhibitors eine große Anzahl unerwünschter Arzneimittelwirkungen, die zum größten Teil auf die Hemmung der COX 1 zurückgeführt werden. Mit der Entwicklung selektiver Hemmstoffe der COX 2 hofft man die Nebenwirkungen unselektiver Substanzen weitgehend zu unterbinden. Besonders die Anzahl unerwünschter Wirkungen auf den Magen und Darm konnte somit deutlich reduziert werden.

Für die Beteiligung der Cyclooxygenase an pathophysiologischen Vorgängen am Herzen, insbesondere die Ischämie betreffend gibt es zahlreiche Hinweise.

Die nach einer Ischämie stark ansteigende Prostaglandinkonzentration in den Zellen, könnte ein Hinweis auf eine vermehrte Produktion von Schutzfaktoren sein.

Bei der Untersuchung von Wildtyp, COX 1 und COX 2 defizienten Mäuseherzen konnte eine deutlich geringere Erholung der Herzfunktion bei den veränderten Herzen nach einer Globalischämie gezeigt werden. Die Vorbehandlung des Wildtyps mit Indomethacin senkte die Erholung auf ein ähnliches Maß. Daraus leitet man [59, 116] einen Schutzfaktor ab, der über die Cyclooxygenase verstoffwechselt wird.

Während eines Ischämieereignisses steigen die Arachidonsäurelevel in den kardialen Membranen dramatisch an.

Die erhöhte lokale Produktion von Eicosanoiden scheint eine allgemeine Antwort auf Gewebsschäden darzustellen [130]. Die entstehenden Epoxyeicosaensäuren, hier vor allem 1,1-EET und 11,12 EET regulieren die Aktivität von Ionenkanälen, insbesondere des L-Typ Kalziumkanals im Sinne einer allgemeinen Downregulation [131]. Möglicherweise handelt es sich hier um einen wichtigen Schutzmechanismus, ähnlich dem IPC.

Möglicherweise besteht auch eine Verbindung zwischen der Aktivierung von Kaliumkanälen und der Aktivität der Cyclooxygenase [58, 115]. Der Schutzfaktor, der von diesem Enzym metabolisiert wird, ist weiterhin unbekannt. Es könnte sich dabei möglicherweise um Fettsäuren handeln, da während der Ischämie und Reperfusion unveresterte Arachidonsäure in den Zellen akkumuliert [61].

Li et al [64] schildert die induzierbare NO-Synthase als Mediator der Präkonditionierung und sieht dabei ebenfalls eine obligatorische Rolle der COX 2, deren Induktion als Stressantwort verstanden wird.

Man erkennt eine schnell ansteigende Expression des Enzyms infolge kurzer Zyklen von Ischämie und Reperfusion. Wird die Aktivität der COX 2 durch NS-398 oder Celecoxib geblockt, kann der Präkonditionierungseffekt gegen Stunning und Infarktereignisse aufgehoben werden. Nachgewiesen wurde dieses Verhalten in Kaninchen [117]. Studien an Mäusen und Ratten [59, 116] legen die Vermutung nahe, dass die Kardioprotektion des Enzyms nicht speziesspezifisch ist [116].

2. Aufgabenstellung

Das angestrebte Ziel der Promotionsarbeit ist es, den von Felix [21] beschriebenen kardiodepressiven Mediator, der vom postischämischen Myokard gebildet wird, funktionell zu charakterisieren.

Die bisher beschriebene negativ inotrope Wirkung der untersuchten Mediatoren erfolgt größtenteils durch die Reduktion des intrazellulären Kalziumgehaltes [27]. Die weitere Aufklärung der dabei intrazellulär ablaufenden Signaltransduktion ist Gegenstand dieser Arbeit. In den bisher durchgeführten Untersuchungen zeigte sich eine Parallelität in den Eigenschaften des postischämisch entstehenden Mediators und der Eicosatetraensäure 17,18. So untersuchen wir jeweils 17,18 EET und das ischämische Effluat sowie zum Teil die aufgereinigten Bestandteile des Effluates.

Dazu soll die Hemmbarkeit durch Cyclooxygenaseinhibition untersucht werden. Die pharmakologische Blockade von K_{ATP} -Kanälen soll einen weiteren Angriffsort aufzeigen.

Um weitere Eigenschaften des Mediators, bei dem es sich um 17,18 EET handeln könnte, zu charakterisieren, testeten wir die beiden Enantiomere 17r,18s und 17s,18r EET.

2.1 Isomere des 17,18 EET

Die Eicosatetraensäure 17,18 kann in verschiedenen Regioisomeren, nämlich als 17r,18s EET und 17s,18r EET vorliegen. Es soll untersucht werden, ob sich die Isomere in ihrer Wirkung auf die isolierten Kardiomyozyten unterscheiden.

2.2 Effekte von Inhibitoren der Cyclooxygenase

Man nimmt an, dass sowohl 17,18 EET, als auch der Mediator, der im postischämischen Effluat enthalten ist, über die Cyclooxygenase metabolisiert werden. Trifft diese Vermutung zu, so wäre in den Kardiomyozyten eine Aufhebung der kardiodepressiven Effekte zu detektieren.

Konnte der entsprechende Antagonismus belegt werden, so erfolgt eine genauere Charakterisierung mit selektiven COX 1 (SC-560) und COX 2 (NS-398)-Inhibitoren.

2.3 Nachweis der Aktivierung ATP-sensitiver Kaliumkanäle

Den myokardialen Kaliumkanälen wird eine erhebliche Bedeutung im Ablauf der ischämischen Ereignisse zugeschrieben. Es soll hier der Versuch unternommen werden, die Einbindung der ATP-abhängigen Kaliumkanäle in diesen Prozess zu beweisen. Dazu erfolgen Versuche mit dem unselektiven Inhibitor Glibenclamide und dem spezifischen Inhibitor mitochondrialer K_{ATP} -Kanäle, Sodium-5-hydroxydecanoate.

3. Material und Methoden

In dieser Arbeit wird der Effekt postischämischer Faktoren auf isolierte, feldstimulierte Rattenkardiomyozyten dargestellt.

Die experimentelle Durchführung, die verwendeten Materialien sowie ein Herstellernachweis ist im folgenden aufgeführt.

3.1 Material

Dieser Teil beinhaltet eine Auflistung und das Herstellerverzeichnis der verwendeten Geräte und Reagenzien.

3.1.1 Geräte

- Fluoreszenzlichtanlage, Myocam, Myopacer, Software „Aquire“ sowie „Analyze“; IonOptix, Hillside Street, Milton, MA, USA
- 4-well Objektträger mit Borosilikatboden; Nalgene Nunc International Corp., Naverville, IL, USA
- Leica Mikroskop DM-IRB, invers
- Zentrifuge, Rotina 46 R; Hettich, Tuttlingen, Germany

3.1.2 Substanzen

- BSA; Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Germany
- Fura-2-AM; Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Germany
- Laminin Mouse; Harbor Bio-Products, Norwood, MA, USA
- Thiopental (Trapanal®); Byk Gulden, Konstanz, Germany
- Collagenase, Typ 2; Worthington Biochemical Corporation, NJ, USA
- NaCl, KCl, MgCl₂, MgSO₂, CaCl₂, HEPES, NaHCO₃, NaH₂PO₄, DMSO, NaOH, HCl, Glucose; Merck, Darmstadt, Germany
- Indomethacin; Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Germany
- Immersionsöl Zeiss 518 N, Universitätsapotheke, Greifswald, Germany
- Pluronic; Sigma-Aldrich, Germany
- NS-398; Cayman Chemical, <http://www.caymanchem.com>
- 11,12 EET; Cayman Chemical, <http://www.caymanchem.com>
- SC-560; Cayman Chemical, <http://www.caymanchem.com>
- Ethanol; Universitätsapotheke, Greifswald, Germany
- Glibenclamide; Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Germany
- Sodium-5-hydroxydecanoate; Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Germany

3.1.3 Lösungen und Puffer

Die Experimente wurden mit den angegebenen Puffern und Lösungen durchgeführt. Dabei erfolgte die Herstellung zu den jeweiligen Experimenten.

Substanz	Stoffmenge
NaCl	110 mM
KCl	2,6 mM
MgSO ₄	1,2 mM
KH ₂ PO ₄	1,2 mM
HEPES	25,0 mM
Glucose	11,0 mM

Tab. 1: Perfusionspuffer zur Isolation der Rattenkardiomyozyten. Der pH-Wert wurde mit NaOH auf 7,4 eingestellt.

Substanz	Stoffmenge
Kollagenase	19, mg
BSA	17 mg
Perfusionspuffer	20 ml
100 mM CaCl ₂	22,5 µl

Tab. 2: Enzymlösung zur Isolation der Rattenkardiomyozyten

Substanz	Stoffmenge
NaCl	117 mM
KCl	2,8 mM
MgCl ₂	0,6 mM
KH ₂ PO ₄	1,2 mM
CaCl ₂	1,2 mM
HEPES	10,0 mM
Glucose	20,0 mM

Tab. 3: Versuchspuffer zur Durchführung der Experimente. Der pH-Wert wurde mit NaOH auf 7,3-7,4 eingestellt.

Substanz	Stoffmenge
Perfusionspuffer	10 ml
100 mM CaCl ₂	20 µl/50 µl

Tab. 4: Kalziumisolierpuffer

Substanz	Stoffmenge
DMSO	0,1%
Pluronic	0,025%
Fura-2 AM	5 µmol

Tab. 5: Färbelösung

Lösungen zur Durchführung der Experimente

- Indomethacin-Lösung: Indomethacin ist ein Essigsäurederivat mit vorwiegend antiphlogistischer und antirheumatischer Wirkung. Es erfolgt eine starke Hemmung beider Isoformen mit geringer Präferenz der COX 1. Die hohe Nebenwirkungsrate von >30% in Bezug auf den Magen-Darm-Trakt beschränkt den therapeutischen Einsatz beträchtlich. Für die Versuche wurde eine Stammlösung von 10 mmol Indomethacin in 70% Ethanol angesetzt und jeweils Aliquots für die einzelnen Messungen hergestellt.

- NS-398-Lösung: Mit der Entwicklung selektiver COX-2-Hemmstoffe hoffte man die Nebenwirkungen unselektiver Substanzen weitgehend zu unterbinden, da diese sich zum überwiegenden Teil aus der Hemmung der COX 1 ergeben. Besonders die Anzahl unerwünschter Wirkungen auf den Magen und Darm konnte somit deutlich reduziert werden. Für die Versuche wurde eine Stammlösung von 1 mmol NS-398 in DMSO angesetzt und jeweils Aliquots für die einzelnen Messungen hergestellt.

- SC-560-Lösung: SC-560 ist ein Inhibitor der Cyclooxygenase 1. Dabei handelt es sich um ein Mitglied der diarylheterozyklischen Klasse der COX-Inhibitoren. Es zeigt sich eine 700fache Selektivität für diese Isoform.

Für die Versuche wurde eine Stammlösung von 1 mmol SC-560 in DMSO angesetzt und jeweils Aliquots für die einzelnen Messungen hergestellt.

- Glibenclamide-Lösung: Diese Substanz gehört zur Gruppe der antidiabetischen Sulfonylureasen wie auch Natrium-5-Hydroxydecanoate. Die Wirkung besteht in einer Blockade ATP-sensitiver Kaliumkanäle.

Am Pankreas bewirkt die Inhibition der Kaliumkanäle eine Öffnung von Kalziumkanälen und damit eine Freisetzung von Insulin [132]. Außer den pankreatischen Kaliumkanälen werden auch myokardiale Zellen beeinflusst. Dabei handelt es sich bei Glibenclamide um einen unselektiven Hemmstoff von Kaliumkanälen. Für die Versuche wurde eine Stammlösung von 1 mmol Glibenclamide in 70% Ethanol angesetzt und jeweils Aliquots für die einzelnen Messungen hergestellt.

- Natrium-5-Hydroxydecanoate-Lösung (5-HD-Lösung): Während Glibenclamide gleichermaßen sarkolemmale und mitochondriale Kaliumkanäle blockiert, besitzt 5-HD eine Präferenz für die ATP abhängigen mitochondrialen Kaliumkanäle. Für die Versuche wurde eine Stammlösung von 1 mmol 5-HD in Versuchspuffer angesetzt und jeweils Aliquots für die einzelnen Messungen hergestellt.

3.1.4 Tiere zur Isolation der Herzmuskelzellen

Für die Isolation der adulten Kardiomyozyten, als auch zur Gewinnung der Effluats wurden ausschließlich weibliche Albino-Wistar-Ratten verwendet.

Zum Zeitpunkt der Herzentnahme hatten die Tiere ein Alter von 49-56 Tagen und ein Gewicht zwischen 180-200 g. Sie stammten sämtlich aus der Tierzucht „Schönwalde“ bei Berlin.

3.2 Methoden

3.2.1 Gewinnung der Effluats

Für die Experimente wurde aus isolierten Rattenherzen ischämisches und nichtischämisches Effluat gewonnen. Diesem liegt die Betrachtung zugrunde, dass mit der Unterbrechung der Perfusion des isolierten Herzens auch die Sauerstoff und Nährstoffzufuhr unterbrochen wird und das Herz infarziert. Dabei werden die Substanzen von den Herzmuskelzellen ausgeschüttet, die Gegenstand dieser Untersuchung sind. So gewinnt man die Effluats nach einer zehnminütigen Unterbrechung der Perfusion mittels Reperfusion des ischämischen Herzens. Diese erfolgt in den letzten 30 s der Ischämiephase.

Dazu wurde an einer modifizierten Langendorff-Anlage in einem offenen System ein isoliertes Herz mit einer Flussgeschwindigkeit von 10 ml/min mit dem beschriebenen Perfusionspuffer perfundiert. Hierbei beschränkt sich die Modifikation der Langendorff-Anlage auf die Verwendung einer geeichten Peristaltikpumpe, um die Flussgeschwindigkeit zu bestimmen.

Bevor das Herz mit der Anlage verbunden wird, begast der sich darin befindliche Puffer für 30 min mit Carbogengas (5% CO₂, 95% O₂).

In den letzten 30 s der folgenden 30-minütigen Perfusionsphase wird das Kontrolleffluat (nichtischämisches Effluat) gewonnen, indem ein Auffanggefäß unter dem perfundierten Herz befestigt wird.

Jetzt stoppt man den Pufferfluss komplett und versetzt damit das Herz in den Zustand einer Totalischämie.

3.2.2 Bearbeitung der Effluat

Vor der Messung der Effluat an isolierten Kardiomyozyten werden diese gepoolt mit Versuchspuffer im Verhältnis 1:4 gemischt.

3.2.3 Isolierung der Extrakte

Ausgehend von jeweils 10 ml postischämischen (IF) und 10 ml Kontrolleffluat (KF) erfolgte die weitere Bearbeitung.

In Zusammenarbeit mit der AG Wolf-Hagen Schunck, Max-Delbrück-Center, Berlin wurden die Proben mit Chloroform extrahiert, wobei je eine organische Phase (Extrakt) und eine wässrige Phase (Extraktionsrückstand) gewonnen wurde.

Für die organischen Phasen erfolgte die Einengung im Rotationsverdampfer und die Überführung in 100 µl Ethanol. Daraus resultiert eine 100fache Konzentrierung gegenüber den Effluaten. Während bei den bisherigen Messungen mit einem Verhältnis von 1:4 gearbeitet wurde, muss nun eine Messansatz von 1:400 gewählt werden um das gleiche Aliquot zu erhalten.

Die Extrakte sind mit FEX 12.1 (Faktorextrakt) und KEX 12.1 (Kontrollextrakt) bezeichnet.

Die Extraktionsrückstände FEX 12.1-R und KEX 12.1-R sind bezüglich der Konzentration der enthaltenen wasserlöslichen Komponenten gegenüber den primären Effluaten unverändert, d.h. sie werden weiterhin in einer Konzentration von 1:4 verwendet.

3.2.4 Isolierung und Bearbeitung der Subfraktionen

Die erhaltenen organischen und wässrigen Phasen sind ein weiteres Mal bearbeitet worden.

Hierbei handelt es sich um eine HPLC-Fraktionierung, bei der aus beiden Phasen jeweils 8 Subfraktionen aufgereinigt wurden.

Fraktion	Laufzeit (in min)
1	0-2,5
2	2,5-6
3	6-14
4	14-18
5	18-20,5
6	20,5-25
7	25-35
8	35-45

Tab. 6: HPLC- Fraktionierung

Jede Subfraktion wurde in 100 µl Ethanol aufgenommen. Um einen vergleichbaren Messansatz zu realisieren, muss eine Verdünnung von 1:400 gewählt werden.

Die Subfraktionen wurden von der AG Wolf-Hagen Schunck, Max-Delbrück-Center, Berlin zur Verfügung gestellt.

3.2.5 Isolierung der adulten Rattenkardiomyozyten

Langendorff-Anlage

Die ventrikulären Kardiomyozyten werden an einer modifizierten Langendorff-Perfusionsapparatur (s. Abb. 1), nach Powell [133] und Piper [134] isoliert. Dabei handelt es sich um ein offenes System mit einer konstanten Flussgeschwindigkeit von 10 ml/min.

Diese Anlage perfundiert das Herz retrograd über die Aorta und erlaubt so die Versorgung der Zellen mit Sauerstoff und Nährstoffen.

Zur Gewährleistung einer konstanten Umgebungstemperatur von 37°C besteht ein parallel geschaltetes Heizsystem des oberen Reservoirs, der Wendel und des Auffangbechers. Zusätzlich sind die Gefäße mit Parafilm verschlossen, um die Temperatur zu erhalten.

Im oberen Reservoir befindet sich eine Pufferlösung, der im Laufe der Isolation Enzyme zugesetzt werden. Hier wird sowohl während, als auch vor der Isolation mit Carbogengas (5% CO₂, 95% O₂) begast.

Das obere Reservoir steht über eine 90 cm hohe Wendel-Säule und die daran angebrachte Kanüle mit dem isolierten Rattenherzen in Verbindung. Zur Vorbeugung von Luftembolien während der Perfusion, ist die sogenannte Blasenfalle (integriert in die Wendel) der Kanüle vorgeschaltet.

Dieser Aufbau erzeugt einen Druck von circa 90 cm Wassersäule, der mit einer Flussregulierung gesteuert werden kann.

Unter dem Herz befindet sich ein Auffangbecher, dessen Ableitung mit Hilfe einer Peristaltikpumpe zur Rezirkulation der Enzymlösung eingesetzt wird.

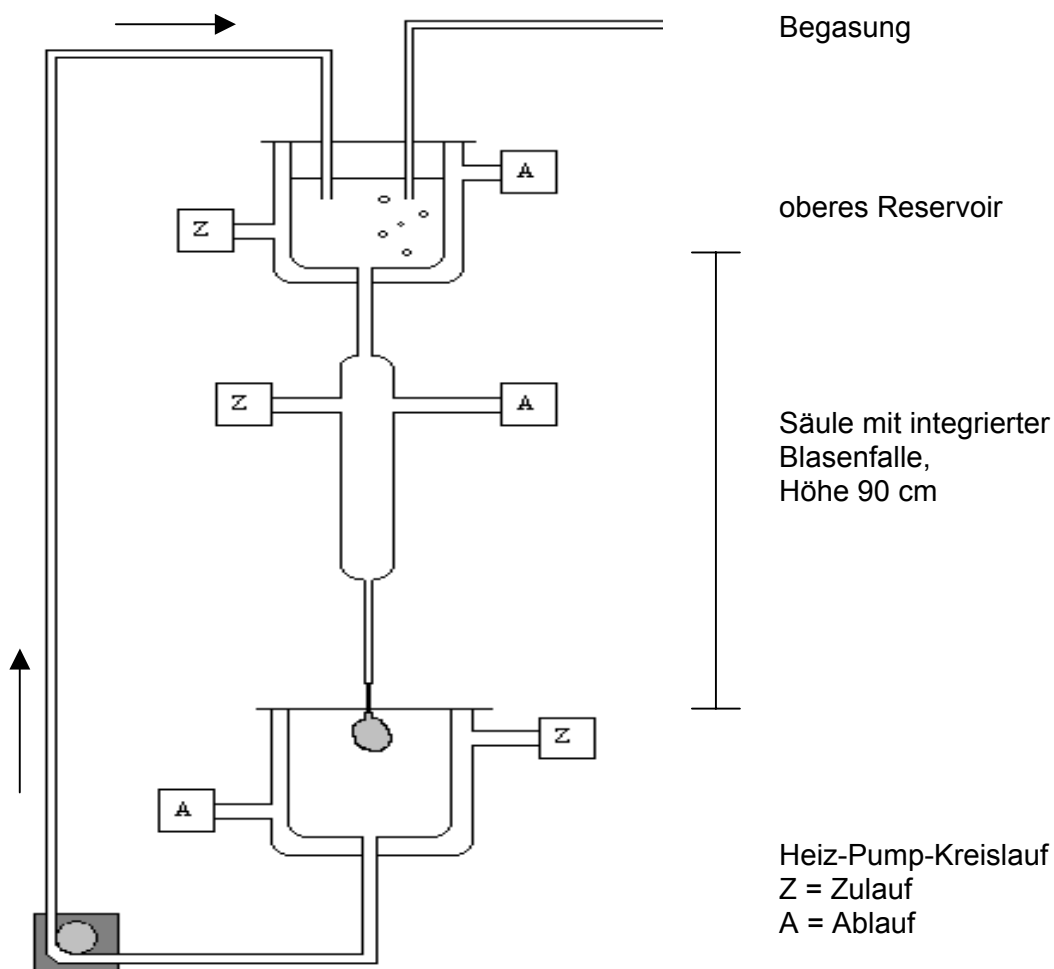


Abb.1: Modifizierte Langendorff-Anlage

Vorbereitung

Zur Vorbereitung der Langendorff-Anlage wird diese mit 2 l Aqua bidest sowie anschließend mit 50-70 ml Perfusionspuffer gewaschen. Nun erfolgt die Füllung mit 75 ml Perfusionspuffer, der wie oben beschrieben mit Carbogen begast und auf 37°C erwärmt wird.

Organentnahme und Präparation

Die Ratte wird mit 3-4 ml Thiopental (0,5 g in 20 ml Aquadest) betäubt. Die Injektion erfolgt intraperitoneal. Die Eröffnung des Brustkorbs erfolgt zügig entlang des Sternums mit einem medianen Schnitt. Das Herz wird mitsamt Mediastinalinhalt entnommen und in 4°C kalte physiologische NaCl-Lösung überführt, um die Stoffwechselaktivität und den Sauerstoffverbrauch des Herzens schnell auf ein Minimum zu senken.

Zuerst kontrahiert das Herz noch kräftig und treibt so das Blut aus den Ventrikeln und Koronarien. Diese Aktivität beschränkt jedoch sich auf wenige Sekunden. Es erfolgt die Entfernung eventuell noch vorhandener Reste von Luft- und Speiseröhre. Die Thymuslappen werden vorsichtig durch lateralen Zug mit zwei Pinzetten entfernt, da sich darunter der Gefäßstrang befindet. Die Präparation kann nun schnell und sicher nach proximal erfolgen, so dass der Aortenbogen und die von ihm abgehenden Gefäße sichtbar werden.

Bevor das Herz an die Anlage angeschlossen wird, muss die Apparatur mit einer Geschwindigkeit von einem Tropfen pro Minute präperfundiert werden, so dass die Kanülierung der Aorta unter Zufuhr von Nähr- und Sauerstoff erfolgt. Die vorgegebene Tropfgeschwindigkeit setzt auch die Gefahr einer Luftembolisation durch die Kanüle herab.

Das Herz wird an die Langendorff-Anlage angeschlossen, indem die Aorta über die Kanüle gezogen wird. Es ist von elementarer Bedeutung, dass die Kanüle zwischen dem Abgang der Koronarien und dem ersten Abgang der Aorta (A. anonymica) zu liegen kommt. Die Kanüle sollte die Gefäße des Aortenbogens verschließen, ohne die Koronarien zu verletzen oder die Aortenklappe zu penetrieren.

Die Lage der Kanüle wird mittels eines Fadens fixiert und das Herz nun für drei Minuten mit reinem Perfusionspuffer präperfundiert. Das dient der Entfernung noch vorhandener Blutbestandteile und der Senkung des extrazellulären Kalziumgehaltes.

Enzymatische Isolation

Nach drei Minuten Präperfusion wird die Enzymlösung in das obere Reservoir gegeben, um die einzelnen Kardiomyozyten aus dem Gewebeverband zu lösen. Nun wird die Langendorff-Anlage auf 75 ml Perfusionspuffer aufgefüllt und es folgt eine 27minütige Rezirkulation mit einer gleichbleibenden Geschwindigkeit von einem Tropfen pro Sekunde. Die homogene Färbung des Herzens zeigt eine gleichmäßige enzymatische Verdauung an.

Im Anschluss an die Rezirkulationsphase wird das Herz samt 10 ml der Perfusionslösung in eine Petrischale gegeben.

Mit einer feinen Schere werden die Vorhöfe an der Ventilebene entfernt und die Ventrikel mit zwei Skalpellenspitzen in ca. 1 mm³ großen Stücke zerkleinert.

Die entstandene Zellsuspension gibt man in den Auffangbecher, wo sie mit der restlichen Perfusionslösung für 15 min von unten mit Carbogen begast wird. Das ermöglicht eine weitere Sauerstoffversorgung, aber auch die enzymatische Isolation wird durch die Verwirbelung der Zellsuspension mechanisch unterstützt. Anschließend wird die Suspension durch ein 200 µm feines Nyloonsieb in zwei 50 ml Zentrifugen-Röhrchen filtriert.

In drei Schritten wird die Suspension bei jeweils 43 RCF für eine Minute zentrifugiert, um die Kardiomyozyten von anderen Zellen z.B. Fibroblasten zu trennen. Die Myozyten setzen sich während der Zentrifugation ab, so dass der Überstand verworfen werden kann.

Um die Zellen in das kalziumhaltige Milieu des Versuchspuffers zu überführen, wird Kalziumisolierpuffer mit steigendem Kalziumgehalt zugesetzt, zuerst mit 200 µmol Ca⁺⁺, dann in einem zweiten Schritt Puffer mit 500 µmol Kalzium.

Zellzählung

Um die Quantität einer Isolation zu beurteilen, wird die Anzahl der intakten Zellen unter einem Mikroskop mit Hilfe einer Fuchs-Rosenthal-Kammer, bei zehnfacher Vergrößerung bestimmt. Gleichzeitig kann die Qualität beurteilt werden.

Zellen gelten als intakt, wenn sie die für Kardiomyozyten typische Querstreifung aufweisen und eine glatte längliche Form besitzen.

Die Anzahl der intakten Zellen, sowie die Gesamtzellzahl und das Verhältnis beider zueinander werden ermittelt. Durchschnittlich lag die Gesamtzellzahl bei 2-3 Millionen und der Anteil der intakten Zellen bei 30%.

Anheftung der Zellen und Färbung

Da die Zellen auf ihre Kontraktilität und die Änderung des Kalziumtransienten untersucht werden sollen, müssen diese am Boden einer Versuchskammer fixiert und mit einem Kalziumfarbstoff beladen werden.

Als Versuchskammer wird ein 4-Well-Objektträger mit Borosilikatboden verwendet. Die Grundfläche des einzelnen Wells beträgt $1,8 \text{ cm}^2$, das Volumen $1,5 \text{ ml}$. Zuerst werden die Wells mit $8 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ Laminin beschichtet und inkubieren so für mindestens eine Stunde im Kühlschrank bei 4°C .

Die Versuchskammern werden mit ca. 5000 Zellen in $600 \mu\text{l}$ Versuchspuffer gefüllt und sedimentieren ebenfalls für eine Stunde bei 4°C im Kühlschrank. Nach dem Anheften können die Zellen mit $500 \mu\text{l}$ Färbelösung gefärbt werden.

Dabei handelt es sich um einen fluoreszierenden Kalziumindikator, der durch UV-Licht angeregt werden kann. Aufgrund seiner lipophilen Esterstruktur kann das Fura-2-AM die Zellmembran permeieren. Hier wird der Farbstoff durch intrazelluläre Esterasen in zwei polare Produkte gespalten, damit aktiv und am Wiederaustritt gehindert.

Die Zellen werden für 30 min im Dunkeln, bei Raumtemperatur und auf einem Schwenktisch (10/min) mit der Farbstofflösung inkubiert.

Abschließend wird die Färbelösung entfernt und die Reste in einem Waschschrift mit $500 \mu\text{l}$ Versuchspuffer pro Well entfernt. Danach werden die Kammern wieder mit $500 \mu\text{l}$ Versuchspuffer aufgefüllt.

3.2.6 Messung

Der Einfluss postischämischer Mediatoren auf die Rattenkardiomyozyten wurde anhand der Parameter Zellverkürzung und Kalziumtransient gemessen.

Das Fluoreszenz-Mikroskop

Die Versuche an den Kardiomyozyten wurden an einem inversen Leica-Mikroskop (DM-IRB) durchgeführt, welches mit einer Fluoreszenzlichtanlage und einer hochauflösenden Kamera (Myocam) der Firma IonOptix ausgestattet wurde. Die einheitliche und konstante Kontraktion der untersuchten Zellen garantierte ein Zellstimulator (Myopacer), ebenfalls von IonOptix. Dieser regelt Frequenz und Spannung der Anregung. Die Versuche wurden mit 1 Hz , einer Impulsdauer von 5 ms und einer Spannung von $10\text{-}12 \text{ mV}$ durchgeführt.

Dieses System ermöglicht parallel zur Analyse des Kontraktionsverhaltens auch die Aufzeichnung des Kalziumtransienten.

Die Änderung der cytosolischen Ca^{++} -Konzentration wurde mittels eines Kalziumindikatorstoffes beurteilt. Die kalziumabhängige Fluoreszenz wurde durch UV-Licht hervorgerufen. Fura-2 hat zwei typische Anregungswellenlängen, dabei reagiert die Ca^{++} -gebundene Form bei 360 nm und Ca^{++} -nichtgebundene Form bei 380 nm, während die emittierte Fluoreszenz bei Wellenlängen >515 nm liegt (dual excitation, single emission).

Durch die sequentielle Aufzeichnung der Fluoreszenz des kalziumgebundenen Farbstoffes sowie des freien Fura resultiert die Ermittlung der Änderung der cytosolischen Ca^{++} -Konzentration.

Zu Beginn und zum Ende der Messung erfolgt die Aufnahme des Wertes für Fura_{360} für jeweils 0,1 s. Aus diesen Punkten ergibt sich durch Interpolation ein konstanter Wert. Die Aufzeichnung des Fura_{380} geschieht kontinuierlich.

Die Emissionsintensität bei 510 nm wird mit einem Photomultiplier gemessen, der seine Informationen von der hochauflösenden Myocam erhält. Über eine Interfacebox (IonOptix) werden die Messwerte an den Computer gesendet und aus dem Verhältnis des kalziumgebundenen Farbstoffes zum Anteil des freien Farbstoffes die „ratio“ berechnet.

Unter Verwendung eines 40x Immersionsölobjektivs wurde eine Bildfrequenzrate von 60 Bildern pro Sekunde bei einer Frequenz von 240 Hz (640x120 Pixel) detektiert. Dies gestattet die Durchführung in Echtzeit.

Das Programm „Acquire“ nimmt die Kontraktionen der Zellen, sowie den Transienten auf. Die Funktion der „Soft Edge Detection“ ermöglicht die Markierung der Zellränder, um so die Amplitude der Kontraktion messbar zu machen.

Die Fokussierung einer Zellebene lässt es zu, nur die von dieser Ebene ausgehenden Fluoreszenzen zu detektieren.

Die IonOptix-Software gestattet die Einstellung spezifischer Wellenlängen durch einen Sperrfilter. Hierbei kann Licht unterhalb der Wellenlänge von 430 nm diese Lochblende passieren, während Emissionen oberhalb von 430 nm reflektiert und über einen dichromatischen Spiegel auf den Photomultiplier umgelenkt wird.

Die Messdaten wurden auf der IonOptix-Software „Acquire“ aufgenommen und in „Analyze“ gespeichert sowie abschließend mit Microsoft-Excel (Windows Office) ausgewertet und mittels Microsoft-Powerpoint (Windows Office) in graphischer Form dargestellt.

Versuchablauf

An die vorbereiteten Versuchskammern wird jeweils ein zu- und abführender Schlauch angeschlossen. Diese sind über ein Peristaltikpumpe so eingestellt, dass die Wells stets mit 500 µl Puffer gefüllt sind. Während des Versuches werden die Zellen mit 2 ml Perfusionspuffer pro min umspült. Diese Versuchsanordnung erlaubt auch, die zu untersuchenden Substanzen kontrolliert zu den Zellen zu geben.

An die Versuchskammern werden ebenfalls zwei Elektroden angeschlossen, die durch elektrische Stimulation konstante Kontraktionen der Zellen auslösen.

Pro Versuchskammer werden die Zellverkürzung und der Kalziumtransient an einer Zelle bestimmt. Die Wirkung der Effluat auf den Transienten wird als relative Änderung der Fura-2-Fluoreszenz (relative fluorescence units = rfu) gemessen.

Das Well wird im Strahlengang fixiert und die Zellen zunächst mit Lichtmikroskopie hinsichtlich ihrer Form und ihres Kontraktionsverhaltens beurteilt. Hierbei werden Zellen herausgesucht, welche gerade Ränder, eine rechteckige und längliche Form sowie gleichmäßige und gut erkennbare Zellverkürzungen (5-15% der Gesamtlänge) aufweisen. Der Kalziumtransient sollte über einen Zeitraum von 2 min stabile Werte zeigen.

Der herausgesucht Myozyt wird mittels des frei drehbaren Mikroskoptisches, sowie der schwenkbaren Myocam in horizontaler Position im Messfeld ausgerichtet.

Vor Beginn der Messung wird über die „Shutter control“ die Intensität des Fluoreszenzlichtes bestimmt, hier auf 1500 „live counts“.

Beim Starten der Messung schaltet sich das Fluoreszenzlicht automatisch zu, das ermöglicht es, den Kalziumtransienten direkt zu verfolgen. Die Messung erfolgt jeweils über 10 s.

Zuerst erfolgt die Aufnahme der Baseline, hier können anhand des Transienten instabile Zellen ausgeschlossen werden. Ist die Zelle stabil werden 2 ml der zu untersuchenden Substanz in das Wells gegeben. Nach 120 s erfolgt die Akutmessung. Nach weiteren 120 s (2 Minuten Wert), nach 170 s (5 Minuten Wert) und nach 290 s (10 Minuten Wert) werden jeweils für 10 s die Zellkontraktionen und der Transient aufgezeichnet. Abschließend wird die Fluoreszenz des Hintergrundes bestimmt.

Bei Versuchen, bei denen eine Interaktion zweier Stoffe untersucht wurde, ist den Zellen schon vor Beginn der Messung die entsprechende Konzentration zugesetzt worden. Die Inkubationszeit variierte je nach Substanz von 5 min bis zu 20 min. Dabei enthielt der Perfusionspuffer ebenfalls die gleiche Konzentration dieses Stoffes.

Auswertung

Die Auswertung der aufgezeichneten Messung erfolgte über das Programm „Analyze“, welches die Kontraktion und den Transienten tabellarisch und graphisch darstellt.

Das Programm kann verschiedene Parameter berechnen, wobei für die Auswertung die systolische und diastolische Zelllänge (in μm) und der Kalziumtransient (in rfu) relevant waren

Die Daten des „Analyze“-Programmes werden im txt-Format in das Microsoft-Excel-Programm transferiert.

Hier wird von allen Messwerten (Baseline, Akut-, 2min-, 5min-, 10min- Wert) der Mittelwert berechnet und die prozentuale Veränderung in Bezug auf die Baseline dargestellt. Abschließend werden die Daten im Microsoft-Powerpoint graphisch dargestellt.

3.2.7 Statistische Analyse

Die Ergebnisse werden sämtlich als arithmetischer Mittelwert und Standardfehler (SEM) dargestellt. Zur Datenauswertung fanden die Programme Microsoft „Excel“ und „Powerpoint“, „Word 2000“ sowie SPSS 10.0 Verwendung.

Als statistisches Verfahren zur Bestimmung der Signifikanz kam der nicht-parametrische Rangsummentest nach Mann-Whitney für unverbundene Stichproben zur Anwendung. Dabei wurde die Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% angenommen. Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) werden mit einem Stern (*), $p < 0,01$ mit zwei Sternen (**) sowie hohe Signifikanzen ($p < 0,001$) mit drei Sternen (***) gekennzeichnet.

4. Ergebnisse

4.1 Studienbedingungen

In die vorliegende Studie wurden ausschließlich weibliche Tiere involviert. Es handelt sich dabei um Albino-Wistar-Ratten, die am Tag der Herzentnahme zwischen 49 und 56 Tage alt waren. Das Gewicht der Tiere lag zwischen 180 und 200 g.

Bei der Isolation der Rattenkardiomyozyten wurde im Mittel eine Zellausbeute von zwei bis drei Millionen Zellen pro Herz erzielt. Dabei wurde eine so reine Herzmuskelfraktion gewonnen, die störende Effekte anderer Zellen in der Kammer ausschloss. Pro Messkammer wurden ca. 1000 Zellen aufgebracht, jedoch für die Messung am Fluoreszenz-Mikroskop jeweils nur eine Zelle pro Kammer herausgesucht und verwendet. Diese Zelle erfüllte bestimmte Qualitätskriterien. Dazu gehörten eine deutliche Querstreifung und eine durchschnittliche Länge von 70-120 μm . Des Weiteren durfte die Zelle keine Granulationen oder Blasen an der Zellmembran besitzen und keine spontanen Kontraktionen aufweisen. Durch Voruntersuchungen konnte gezeigt werden, dass unter diesen Bedingungen die Zelle über einen Zeitraum von zehn Minuten einen stabilen Kalziumtransienten aufweist. Mit Hilfe des beigefügten Isolationsprotokolls konnten genügend solcher Zellen für die Messungen bereitgestellt werden.

4.2 Vorbetrachtung

Zur Charakterisierung der Effluat wurde der Kalziumtransient als Differenz der systolischen und diastolischen Kalziumkonzentration und die Zellverkürzung isolierter Kardiomyozyten untersucht, wobei die Kardiomyozyten feldstimuliert und mit Versuchspuffer perfundiert wurden. Der intrazelluläre Kalziumtransient sowie die systolische Zellverkürzung sind, nach Beladung eines Ca^{++} -sensitiven Fluoreszenzfarbstoffes, am Fluoreszenz-Mikroskop gemessen worden. Der Kalziumtransient und die Zellverkürzung der zu messenden Zelle wurden initial, sowie nach Perfusion der Rattenkardiomyozyten mit dem zu untersuchenden Effluat registriert. Die Veränderungen der Messgrößen nach Perfusion der Rattenkardiomyozyten mit dem Effluat wurden prozentual zu den entsprechenden Basiswerten der Messung bestimmt.

Der Ausgangspunkt der Messungen sind die bereits beschriebenen Wirkungen postischämisch entstehender Substanzen [4, 21, 27].

Dabei fällt eine starke Parallelität in der Wirkweise auf den Kalziumtransienten und die Zellkontraktilität zwischen den postischämischen entstehenden Mediatoren und der ungesättigten Epoxyeicosatetraensäure 17,18 EET auf.

In den vorliegenden Messungen wird das postischämisch gewonnene Effluat direkt verwendet, aber auch in der aufgereinigten Form als Faktorextrakt (FEX), sowie als isolierte HPLC-Fraktion 5 des Faktorextrakts Faktorextrakt 5 (FEX 5). Diese Substanzen wurden für die Versuche mit einer 1%igen BSA-Lösung versetzt um einen schnelleren Wirkeintritt zu erreichen. Deren Wirksamkeit konnte in Voruntersuchungen bestimmt werden und ist als Kontrollmessungen in den jetzigen Versuchen noch einmal bestätigt worden.

Die durchgeführten Untersuchungen der einzelnen Effluate lassen auf eine gewisse Wirkungscharakteristik der kardiodepressiven Anteile schließen. Dabei ist eine Verringerung des Kalziumtransienten um ca. 15% und damit ein Rückgang der Zellkontraktion zu beobachten. Diese Effekte lassen sich sowohl beim ischämischen Effluat (IF), dem Faktorextrakt, der aufgereinigten Form Faktorextrakt 5 (FEX 5) als auch bei der Eicosatetraensäure 17,18 nachweisen. Auffällig gegenüber den anderen Effluaten ist das Wirkungsprofil des ischämischen Effluates. Die Verringerung der Zellkontraktion liegt in der ersten Messung (Akutmessung/AM) nach Perfusion der Kardiomyozyten mit dem Effluat, bei etwa 40% und stellt sich nach weiteren Messungen auf einen Wert von 25% ein. Diese Wirkungsweise ist jedoch nur bei der Zellkontraktion zu beobachten, der Rückgang des Kalziumtransienten verhält sich ähnlich gegenüber FEX, FEX 5 und 17,18 EET. Diese Diskrepanz der Eigenschaften könnte dadurch erklärt werden, dass es sich bei dem postischämisch gewonnenen Effluat (IF) um einen Pool verschiedener Mediatoren handelt, die auf die Zellkontraktilität wirken.

In Zusammenarbeit mit der Wolf-Hagen Schunck AG, Max-Delbrück-Center, Berlin konnte die Epoxyeicosatetraensäure 11,12 EET als potentieller Antagonist der negativ inotropen Substanzen isoliert werden.

In den Messungen zeigte sich, dass das 17,18 EET nicht kardiodepressiv wirkt, wenn die Zellen 11,12 EET vorinkubiert wurden. Im Gegensatz dazu zeigt sich bei den Experimenten mit ischämischem Effluat und den gereinigten Fraktionen in der Akutmessung weiterhin eine Abnahme der Zellkontraktilität.

4.3 Charakterisierung der negativ ionotropen Mediatoren

Im folgenden sind die einzelnen Untersuchungen aufgeführt, dabei wird zunächst das ischämische Effluat (IF) beleuchtet und im weiteren Verlauf auf die Epoxy-eicosatetraensäure 17,18 eingegangen.

4.3.1 Charakterisierung des ischämischen Effluates sowie der Derivate

4.3.1.1 Kinetik

Die vorliegende Dosis-Wirkungsbeziehung des ischämischen Effluates zeigt eine Konzentrationsabhängigkeit der Effekte bis zu einem Sättigungspunkt. In den vorliegenden Experimenten wurde die Substanz in einer Konzentration von 1:4 verwendet.

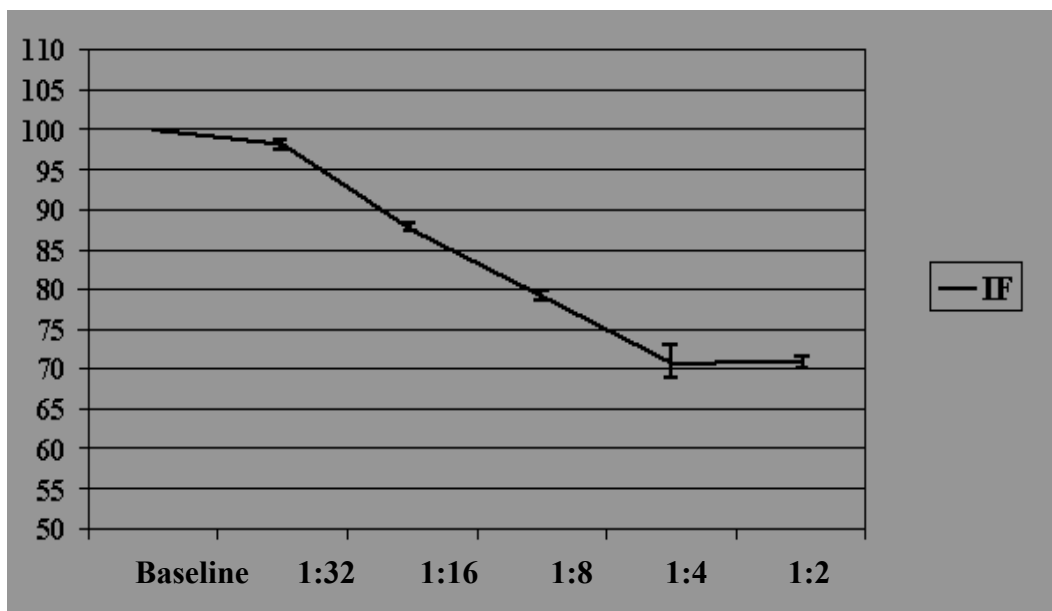


Abb. 3: Dosis-Wirkungsbeziehung des ischämischen Effluates (IF) in Bezug auf die Zellkontraktion

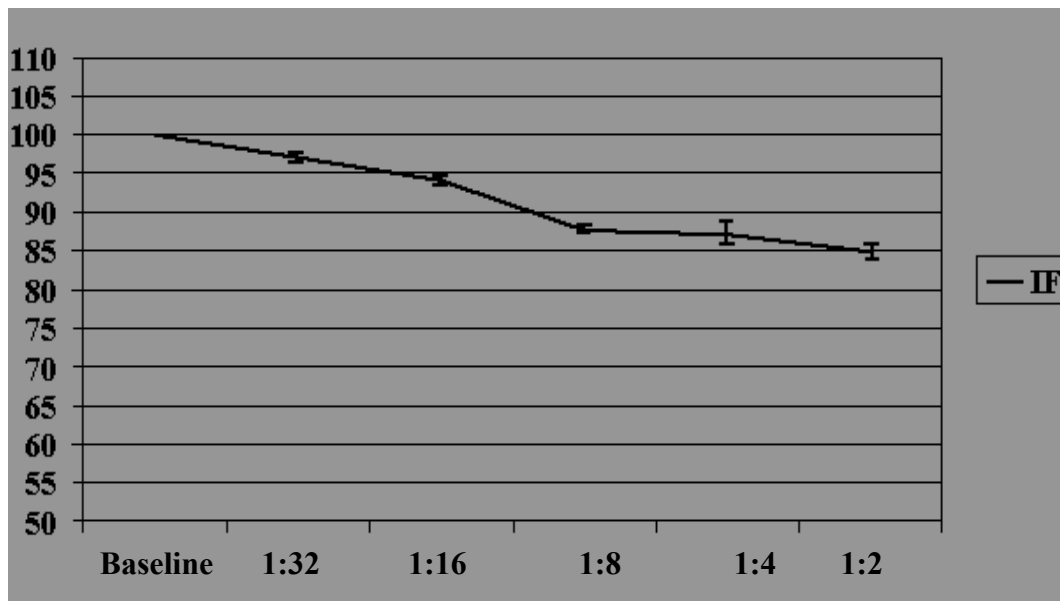


Abb. 4: Dosis-Wirkprofil des IF und dessen Effekte auf den Kalziumtransienten

4.3.1.2 Einfluss von Cyclooxygenaseinhibitoren

Es erscheint möglich, dass das ischämische Effluat erst in der Herzmuskelzelle in seine aktive Form umgewandelt wird. Diese Metabolisierung könnte über die Cyclooxygenase ablaufen, so dass dieser Stoffwechselweg hier untersucht wird.

Unselektive Cyclooxygenasehemmung

Indomethacin inhibiert beide Isoformen der Cyclooxygenase mit geringer Präferenz der COX 1. Im Vorfeld wurde mit 5 μmol Indomethacin eine Konzentration bestimmt, welche die Zellen nicht primär über den Zeitraum von 10 min schädigt.

Dann wurden die Zellen 5 min vor der Messung mit 5 μmol Indomethacin inkubiert, anschließend die Baseline aufgenommen und die Messkammern mit dem ischämischen Effluat (IF) bzw. der organischen Phase (FEX) und der isolierten HPLC-Fraktion 5 (FEX 5) perfundiert.

Dabei wurde IF in einer Verdünnung von 1:4 auf die Zellen gegeben, FEX und FEX 5 jeweils in einer Konzentration von 1:400 verwendet.

	Relative Änderung des Kalziumtransienten in % (SEM)			
	Akutmessung (AM)	2 min Wert	5 min Wert	10 min Wert
IF auf Indomethacin	-0,15 (+/-0,17)**	-0,02 (+/-0,11)**	0,20 (+/-0,22)**	-0,04 (+/-0,29)*
IF	-14,80 (+/-4,57)	-12,86 (+/-3,10)	-11,7 (+/-2,57)	-15,18 (+/-2,33)
	Relative Änderung der Kontraktibilität in % (SEM)			
	Akutmessung (AM)	2 min Wert	5 min Wert	10 min Wert
IF auf Indomethacin	-20,34 (+/-1,68)**	-11,10 (+/-2,60)*	-6,18 (+/-2,85)*	-4,36 (+/-1,73)*
IF	-39,00 (+/-5,98)	-29,30 (+/-4,28)	-26,59 (+/-5,63)	-23,79 (+/-4,40)

Tab. 7: Ergebnisse der Versuche mit IF und Indomethacin (ns-nicht signifikant, * entspricht $p < 0,05$, ** entspricht $p < 0,01$, *** entspricht $p < 0,001$)

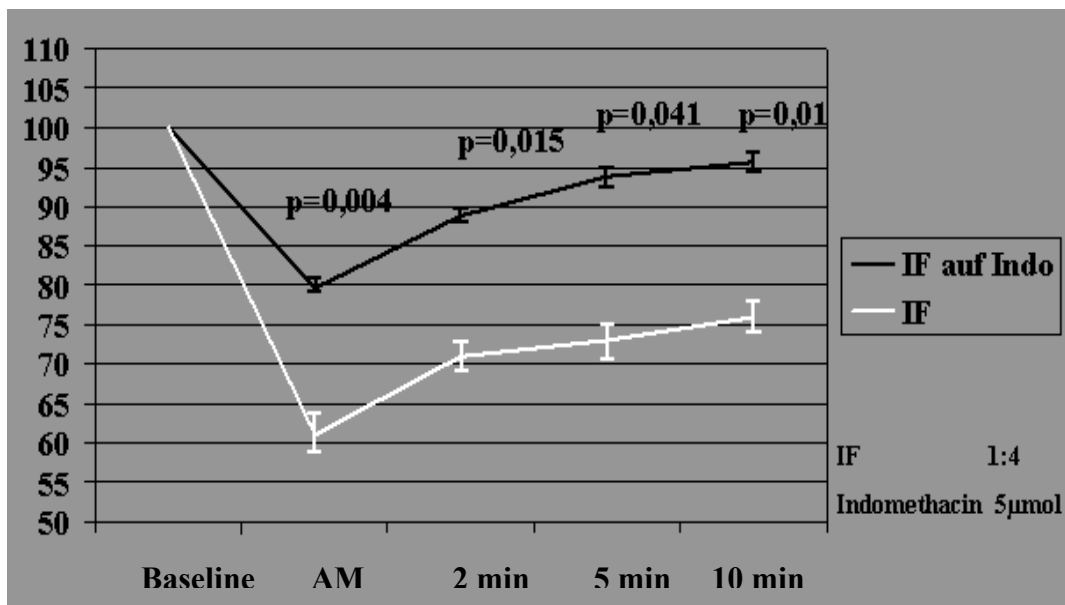


Abb. 5: Wirkung des IF auf die Zellkontraktibilität bei Inkubation der Zellen mit Indomethacin

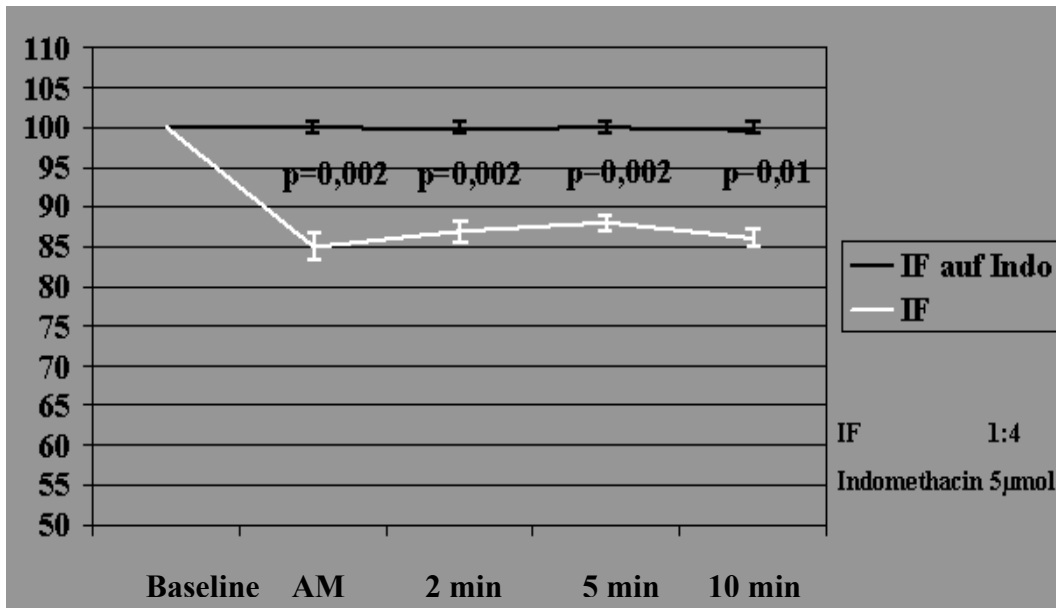


Abb. 6: Wirkung des IF auf den Kalziumtransienten bei Inkubation der Zellen mit Indomethacin

	Relative Änderung des Kalziumtransienten in % (SEM)			
	Akutmessung (AM)	2 min Wert	5 min Wert	10 min Wert
FEX auf Indomethacin	-0,63 (+/-0,23)**	-0,71 (+/-0,10)**	-1,04 (+/-0,23)*	-1,81 (+/-0,74)*
FEX	-12,87 (+/-3,08)	-16,09 (+/-1,79)	-16,16 (+/-0,68)	-15,49 (+/-1,74)
	Relative Änderung der Kontraktibilität in % (SEM)			
FEX auf Indomethacin	-14,44 (+/-3,30)*	-4,65 (+/-2,39)**	-4,47 (+/-1,09)**	-3,52 (+/-1,39)*
FEX	-18,00 (+/-1,5)	-24,00 (+/-2,63)	-25,00 (+/-3,56)	-24,78 (+/-3,65)

Tab. 8: Ergebnisse der Messungen mit FEX und Indomethacin (ns-nicht signifikant, * entspricht $p < 0,05$, ** entspricht $p < 0,01$, *** entspricht $p < 0,001$)

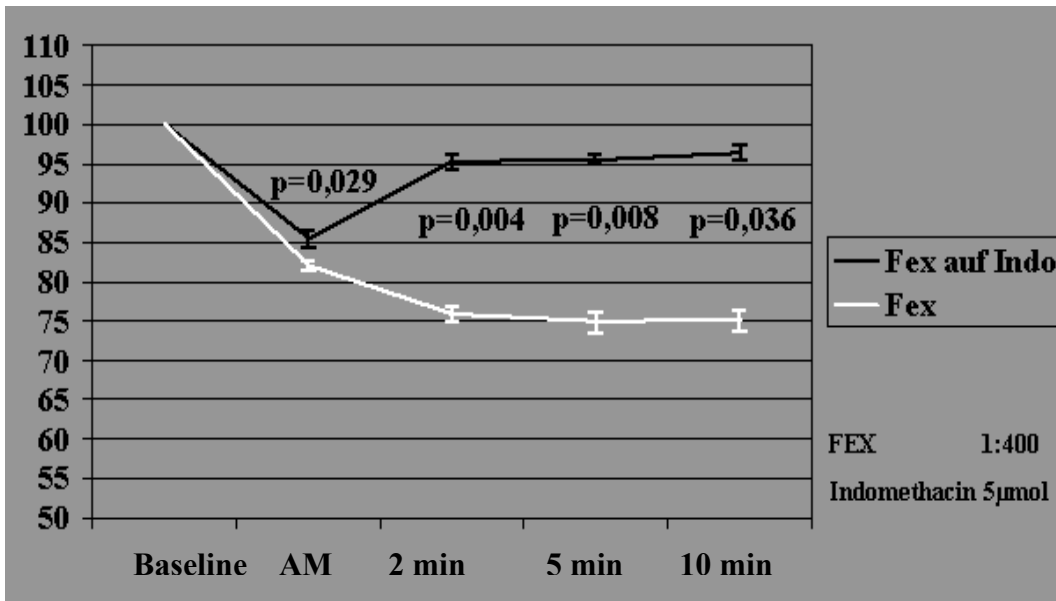


Abb.7: Effekt des Faktorextraktes FEX auf die Kontraktilität bei Inkubation der Zellen mit Indomethacin

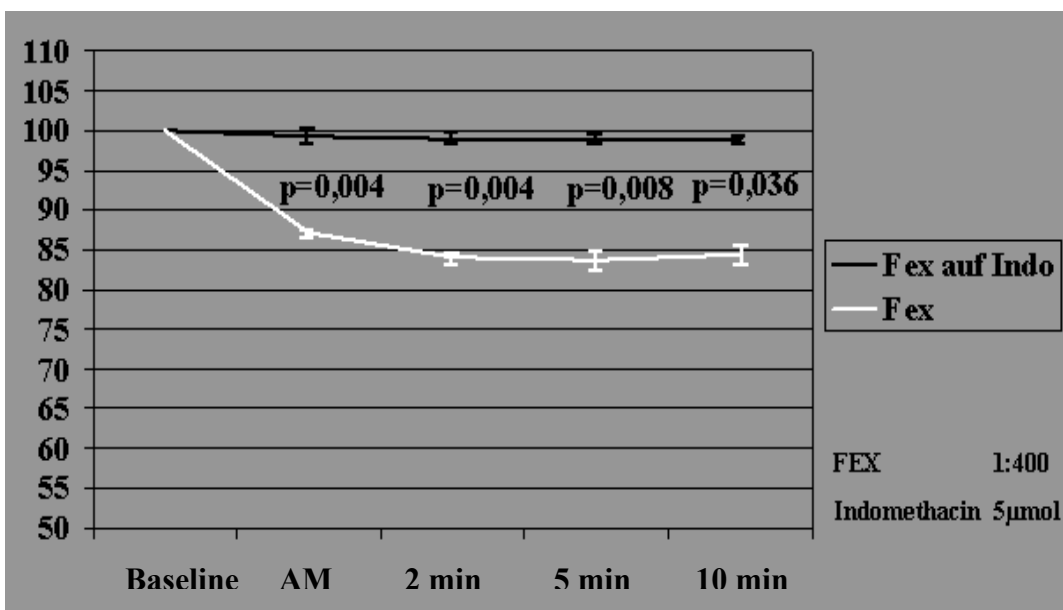


Abb. 8: Effekt des Faktorextraktes FEX auf den Kalziumtransienten bei Inkubation der Zellen mit Indomethacin

	Relative Änderung des Kalziumtransienten in % (SEM)			
	Akutmessung (AM)	2 min Wert	5 min Wert	10 min Wert
FEX 5 auf Indomethacin	0,23 (+/-0,31)*	0,43 (+/-0,28)*	-0,43 (+/-0,70)*	0,12 (+/-0,21)*
FEX 5	-18,34 (+/-3,30)	-17,57 (+/-1,28)	-16,23 (+/-2,25)	-16,19 (+/-2,63)
Relative Änderung der Kontraktiilität in % (SEM)				
FEX 5 auf Indomethacin	-10,78 (+/-1,79)*	-2,01 (+/-2,31)*	-0,88 (+/-1,66)*	-0,24 (+/-0,75)*
FEX 5	-11,00(+/-3,89)	-16,00 (+/-3,96)	-24,00 (+/-3,66)	-26,03 (+/-3,25)

Tab. 9: Messwerte der Experimente mit FEX 5 und Indomethacin (ns-nicht signifikant, * entspricht $p < 0,05$, ** entspricht $p < 0,01$, *** entspricht $p < 0,001$)

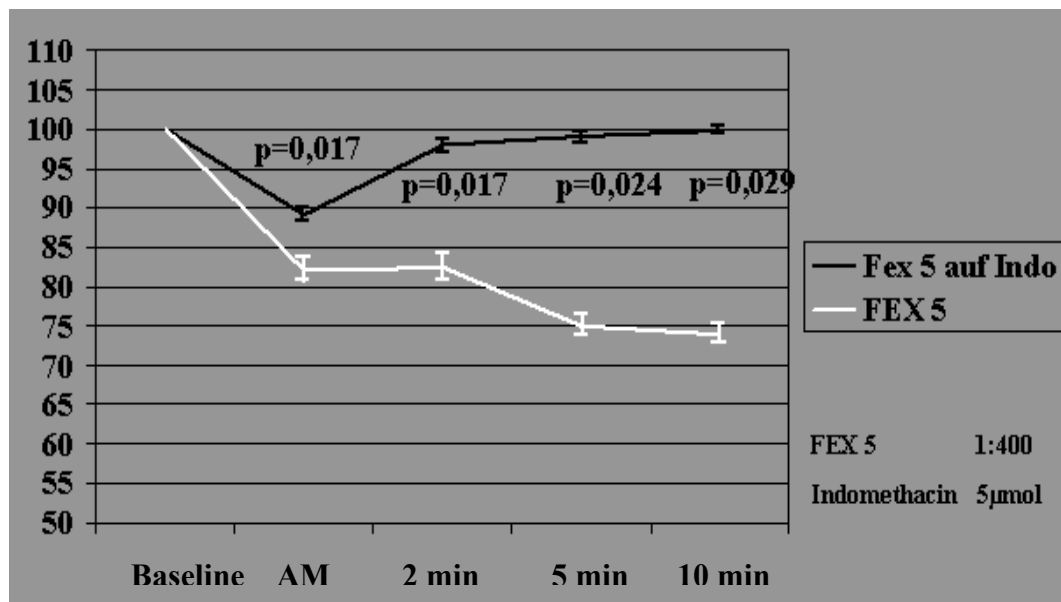


Abb. 9: Effekt von FEX 5 auf Indomethacin in Bezug auf die Zellkontraktion

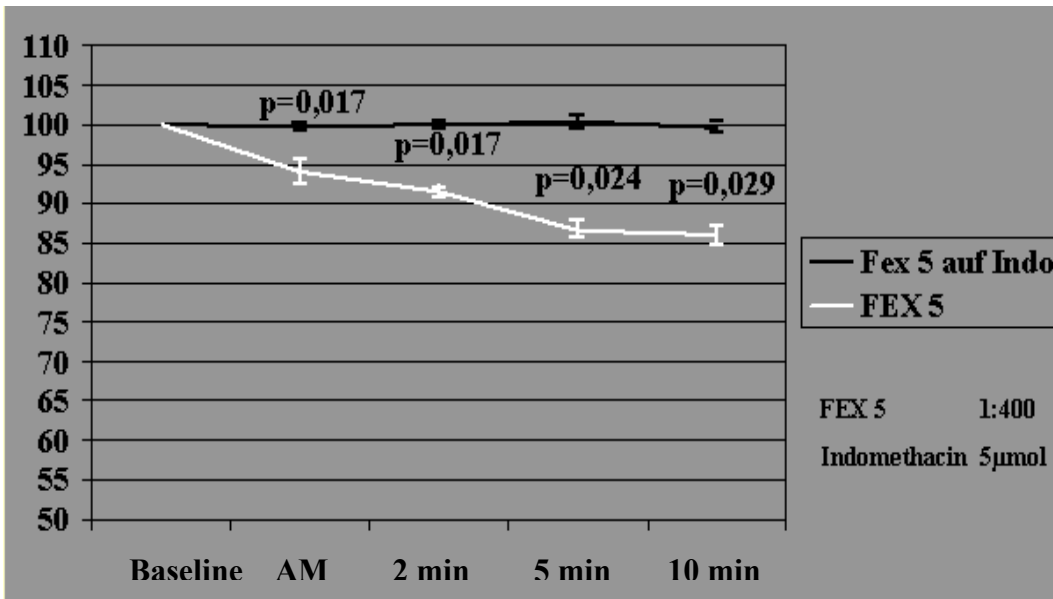


Abb. 10: Effekt von FEX 5 auf Indomethacin in Bezug auf den Kalziumtransienten

Bei den Messungen fällt auf, dass Indomethacin zwar als Langzeiteffekt die Zellen vor einer Abnahme der Zellkontraktion schützt, jedoch einen Abfall der Kontraktilität in der Akutmessung nicht verhindern kann, während der Kalziumtransient nahezu auf dem Ausgangsniveau der Messung verbleibt.

Selektive Cyclooxygenasehemmung

Die Versuchsreihe mit Indomethacin bestätigt die Annahme, dass die kardio-depressiven Mediatoren erst in den Herzmuskelzellen selbst in ihre wirksame Form umgewandelt werden und dass an diesem Aktivierungsschritt die Cyclooxygenase (COX) maßgeblich beteiligt ist.

Im weiteren richten sich die Experimente auf die einzelnen Isoformen der Cyclooxygenase. Es werden SC-560 als spezifischer Inhibitor der Cyclooxygenase 1 und NS-398 als Inhibitor der Isoform 2 der Cyclooxygenase verwendet.

In Vorversuchen wurde mit 0,25 µmol eine Konzentration bestimmt, welche die Zellen bei einer parallelen Applikation der selektiven COX-Inhibitoren nicht schädigt.

Auch hier erfolgten zunächst Versuche mit beiden Inhibitoren der Cyclooxygenase. Die Inkubation erfolgte jeweils für 5 min vor Aufnahme der Basiswerte.

	Relative Änderung des Kalziumtransienten in % (SEM)			
	Akutmessung (AM)	2 min Wert	5 min Wert	10 min Wert
IF auf COX-Inhibitoren	-0,74 (+/-1,19)**	0,20 (+/-2,14)*	0,99 (+/-1,01)**	0,46 (+/-1,20)*
IF	-14,80 (+/-4,57)	-12,86 (+/-3,10)	-11,7 (+/-2,57)	-15,18 (+/-2,33)
	Relative Änderung der Kontraktilität in % (SEM)			
IF auf COX-Inhibitoren	-15,38 (+/-4,10)*	-7,62 (+/-2,27)**	-8,37 (+/-2,41)**	-3,17 (+/-2,72)*
IF	-39,00 (+/-5,98)	-29,30 (+/-4,28)	-26,59 (+/-5,63)	-23,79 (+/-4,40)

Tab. 10: Ergebnisse der Versuchreihe mit IF und Inhibitoren der Cyclooxygenase (ns-nicht signifikant, * entspricht $p < 0,05$, ** entspricht $p < 0,01$, *** entspricht $p < 0,001$)

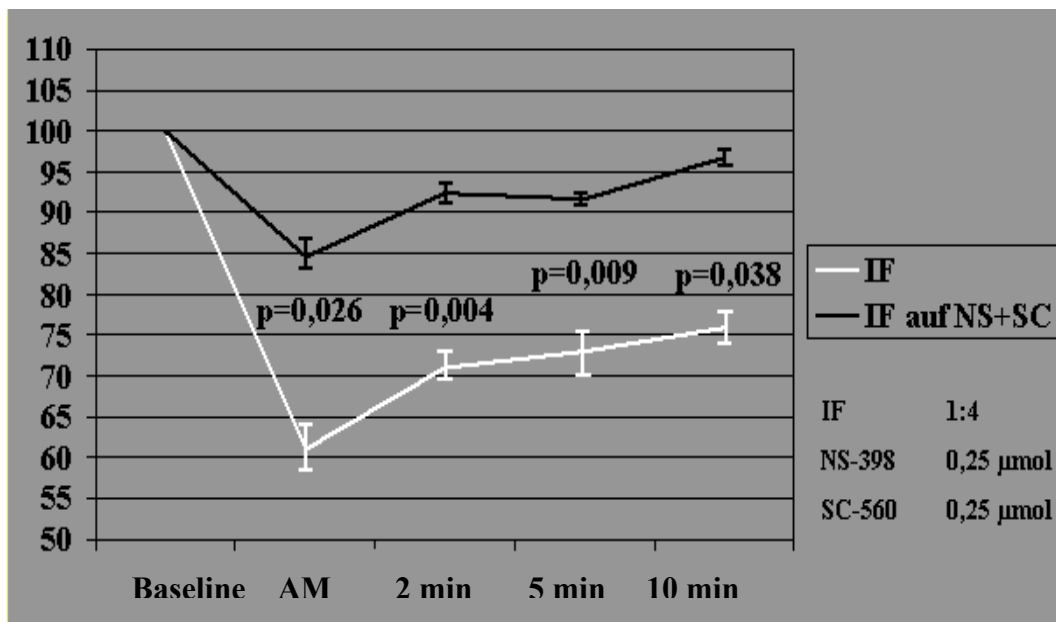


Abb. 11: Effekt des IF auf die Kontraktilität bei Inkubation mit COX-1- und COX-2-Inhibitor

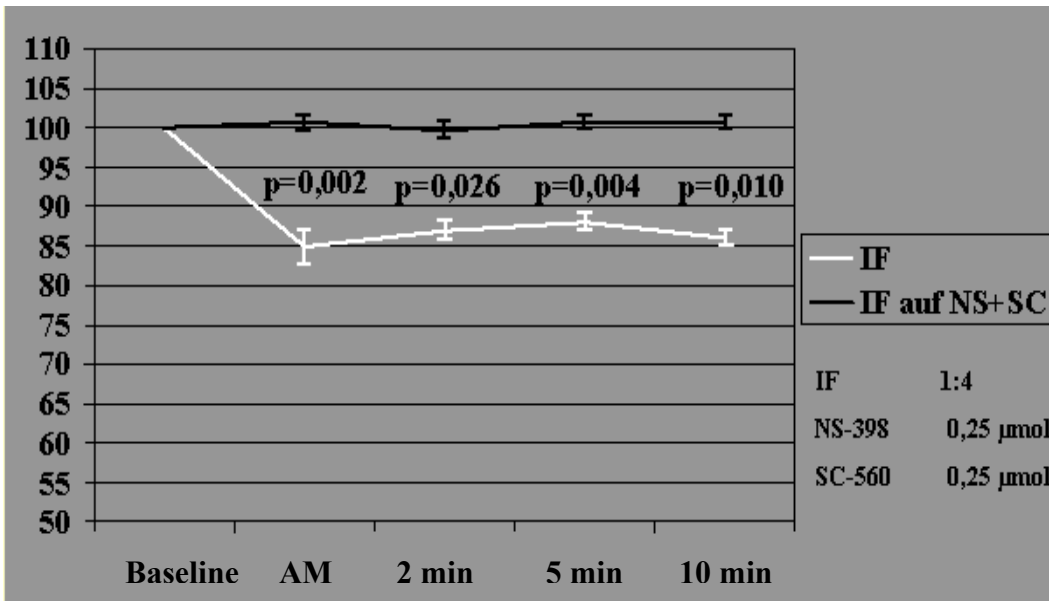


Abb. 12: Effekt des IF auf den Transienten bei Inkubation mit COX-1- und COX-2-Inhibitor

Hier ergab sich für das ischämische Effluat ein ähnliches Bild wie vorher in der Versuchsreihe mit Indomethacin, also ein Abfall der Zellkontraktilität in der Akutmessung und nachfolgender Erholung auf das Ausgangsniveau, während der Kalziumtransient über den gesamten Zeitraum der Messung stabil bleibt.

Wirkung von SC-560 auf IF

Nun soll im weiteren Versuchsablauf die genaue Bestimmung des aktivierenden Enzyms erfolgen. Dazu erfolgte die Inkubation der Zellen mit dem COX-1-respektive COX-2-Inhibitor.

SC-560 inkubierte für 5 min in einer Konzentration von 0,25 μ mol mit den isolierten Kardiomyozyten bevor die Baseline aufgenommen wurde. Anschließend wurden die Zellen mit ischämischem Effluat in einer Konzentration von 1:4 perfundiert.

Relative Änderung des Kalziumtransienten in % (SEM)				
	Aktmessung (AM)	2 min Wert	5 min Wert	10 min Wert
IF auf SC-560	-16,61 (+/-0,35) ns	-17,21 (+/-0,65) ns	-15,03 (+/-1,54) ns	-16,11 (+/-1,33) ns
IF	-14,80 (+/-4,57)	-12,86 (+/-3,10)	-11,7 (+/-2,57)	-15,18 (+/-2,33)
Relative Änderung der Kontraktilität in % (SEM)				
IF auf SC-560	-32,10 (+/-2,90)	-29,72 (+/-4,28)	-28,17 (+/-6,91)	-25,62 (+/-1,31)
IF	-39,00 (+/-5,98)	-29,30 (+/-4,28)	-26,59 (+/-5,63)	-23,79 (+/-4,40)

Tab. 11: Messwerte der Versuche mit IF und SC-560 (ns-nicht signifikant, * entspricht $p < 0,05$, ** entspricht $p < 0,01$, *** entspricht $p < 0,001$)

Es ergibt sich aus diesen Werten, dass der Mediator, welcher im ischämischen Effluat enthalten ist, nicht über die Cyclooxygenase-1 verstoffwechselt wird.

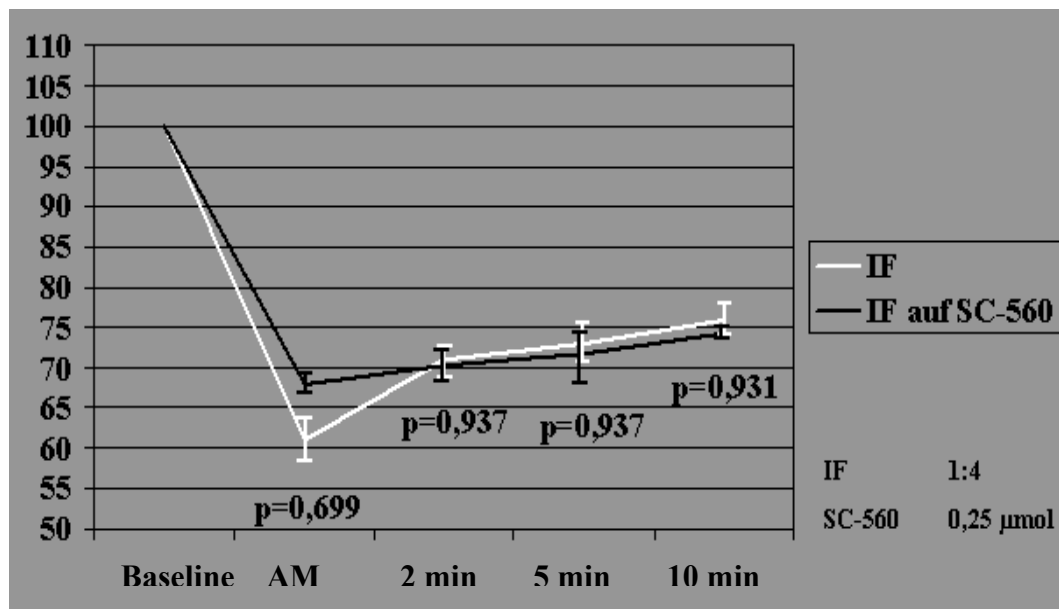


Abb. 13: Wirkung von IF auf die Zellkontraktilität nach Inkubation der Zellen mit SC-560

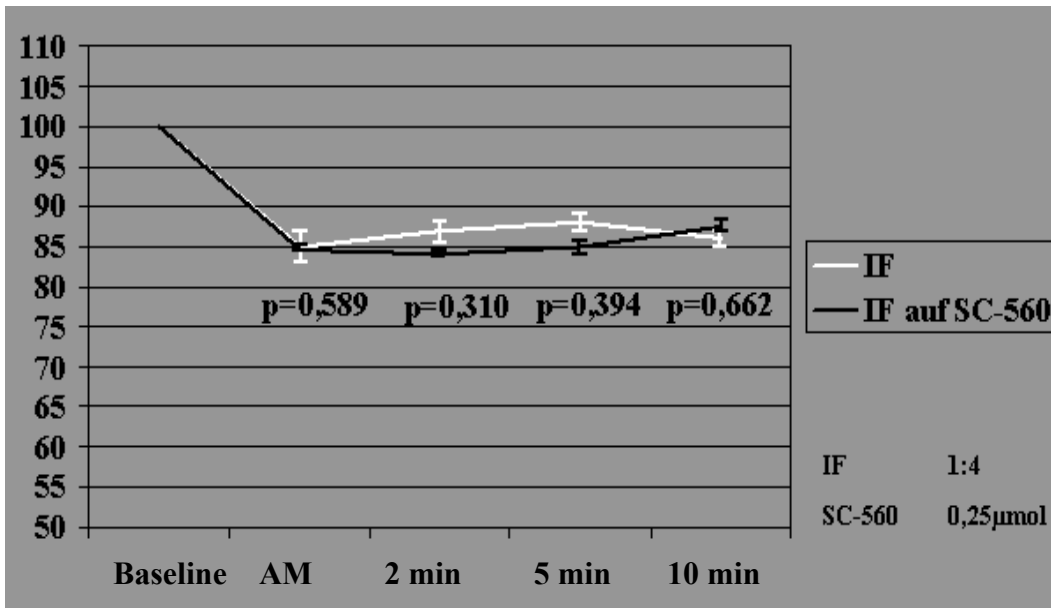


Abb. 14: Wirkung von IF auf den Kalziumtransienten nach Inkubation der Zellen mit SC-560

Wirkung von NS-398 auf das ischämische Effluat

NS-398 wurde in der vorgegebenen Konzentration von 0,25 µmol verwendet und nach einer Inkubationszeit von 5 min ischämisches Effluat in einer Verdünnung von 1:4 auf die Zellen gegeben.

Bei der Messung zeigte sich eine antagonistische Wirkung des COX-2-Inhibitors.

	Relative Änderung des Kalziumtransienten in % (SEM)			
	Akutmessung (AM)	2 min Wert	5 min Wert	10 min Wert
IF auf NS-398	-0,60 (+/-1,08)**	0,43 (+/-0,72)**	0,12 (+/-0,74)**	-1,01 (+/-0,62)**
IF	-14,80 (+/-4,57)	-12,86 (+/-3,10)	-11,7 (+/-2,57)	-15,18 (+/-2,33)
	Relative Änderung der Kontraktibilität in % (SEM)			
IF auf NS-398	-16,13 (+/-2,68)*	-9,53 (+/-1,93)**	-8,66 (+/-2,38)*	-8,70 (+/-2,57)*
IF	-39,00 (+/-5,98)	-29,30 (+/-4,28)	-26,59 (+/-5,63)	-23,79 (+/-4,40)

Tab. 12: Ergebnisse der Messungen mit IF und NS-398 (ns-nicht signifikant, * entspricht $p < 0,05$, ** entspricht $p < 0,01$, *** entspricht $p < 0,001$)

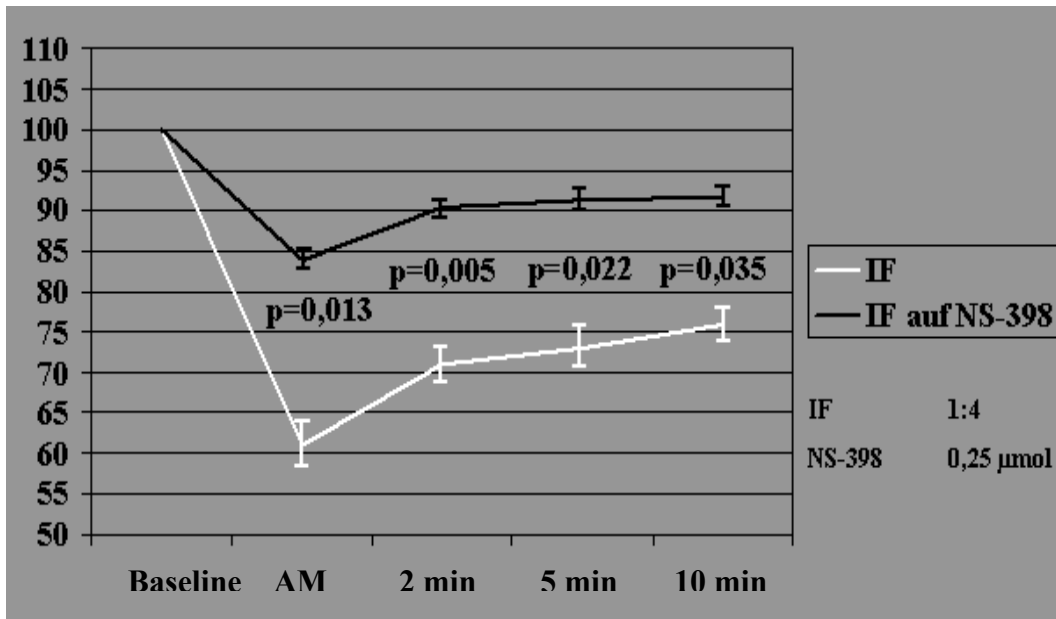


Abb. 15: Effekt von IF auf NS-398 in Bezug auf die Zellkontraktion

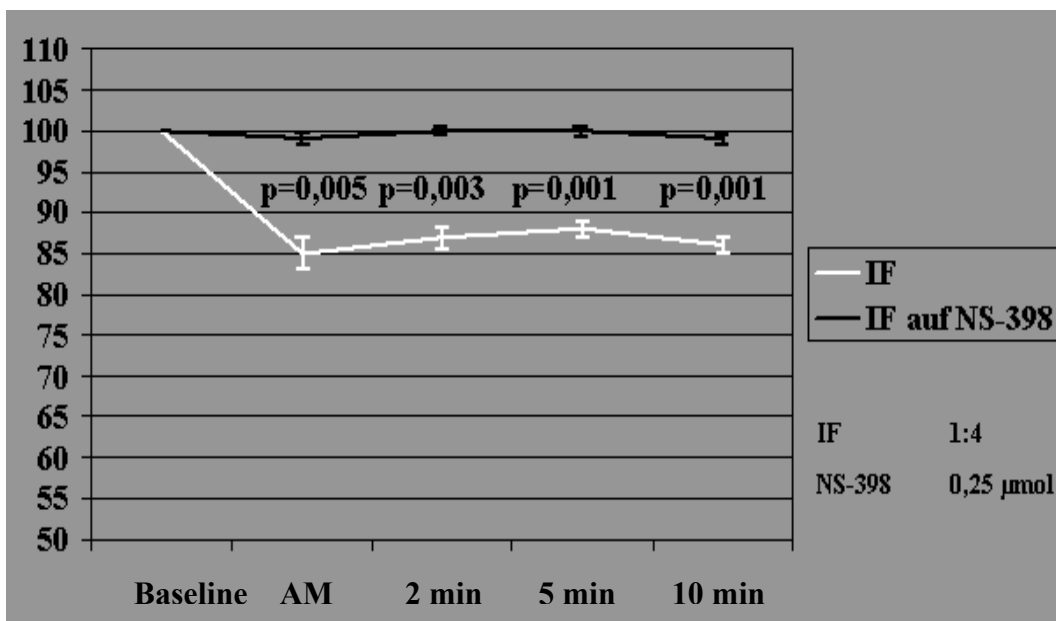


Abb. 16: Effekt von IF auf NS-398 in Bezug auf den Kalziumtransienten

4.3.1.3 Kaliumkanalblockade

Einen weiteren Ansatz zum Verständnis der Signaltransduktion liefern die Experimente mit Hemmstoffen von Kaliumkanälen. Die Unterbrechung der Kaskade durch Indomethacin bzw. NS-398 legt den Schluss nahe, dass der Mediator in der Zelle gar keine wirksame Form annehmen kann.

Im Gegensatz dazu könnte die Hemmung der Kaliumkanäle eine andere Stellung einnehmen, die hier näher beleuchtet werden soll.

Zur Darstellung der Hemmbarkeit ATP-abhängiger K⁺-Kanäle wurde zunächst die Wirkung von Glibenclamide untersucht, danach wurden Versuche mit Natrium-5-Hydroxydecanoate (5-HD) als speziellem Inhibitor der mitochondrialen Kaliumkanäle durchgeführt.

Mittels Vorversuchen wurde eine Konzentration von 1 µmol Glibenclamide und 5 µmol Natrium-5-Hydroxydecanoate zur Durchführung der Experimente festgelegt.

Unselektive Blockade von Kaliumkanälen

Bei Glibenclamide handelt es sich um einen unselektiven Inhibitor ATP-sensitiver Kaliumkanäle. Es werden also sowohl sarkolemmale, als auch mitochondriale Strukturen inhibiert.

	Relative Änderung des Kalziumtransienten in % (SEM)			
	Akutmessung (AM)	2 min Wert	5 min Wert	10 min Wert
IF auf Glibenclamide	1,1 (+/-0,87)**	1,27 (+/-0,80)**	-0,13 (+/-1,00)**	0,43 (+/-0,60)**
IF	-14,80 (+/-4,57)	-12,86 (+/-3,10)	-11,7 (+/-2,57)	-15,18 (+/-2,33)
	Relative Änderung der Kontraktilität in % (SEM)			
IF auf Glibenclamide	-23,47 (+/-1,63) ns	-4,78 (+/-2,98)**	-4,32 (+/-2,82)*	-4,36 (+/-1,52)*
IF	-39,00 (+/-5,98)	-29,30 (+/-4,28)	-26,59 (+/-5,63)	-23,79 (+/-4,40)

Tab.13: Resultate der Messungen mit IF und Glibenclamide (ns-nicht signifikant,

* entspricht p<0,05, ** entspricht p< 0,01, *** entspricht p< 0,001)

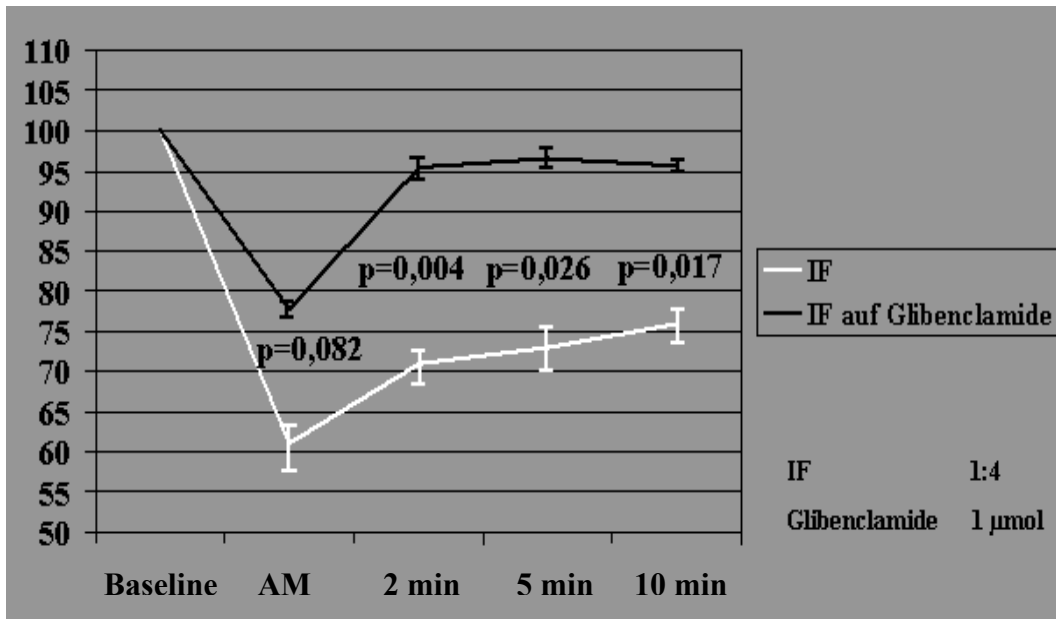


Abb. 17: Effekt von IF auf Glibenclamide in Bezug auf die Zellkontraktion

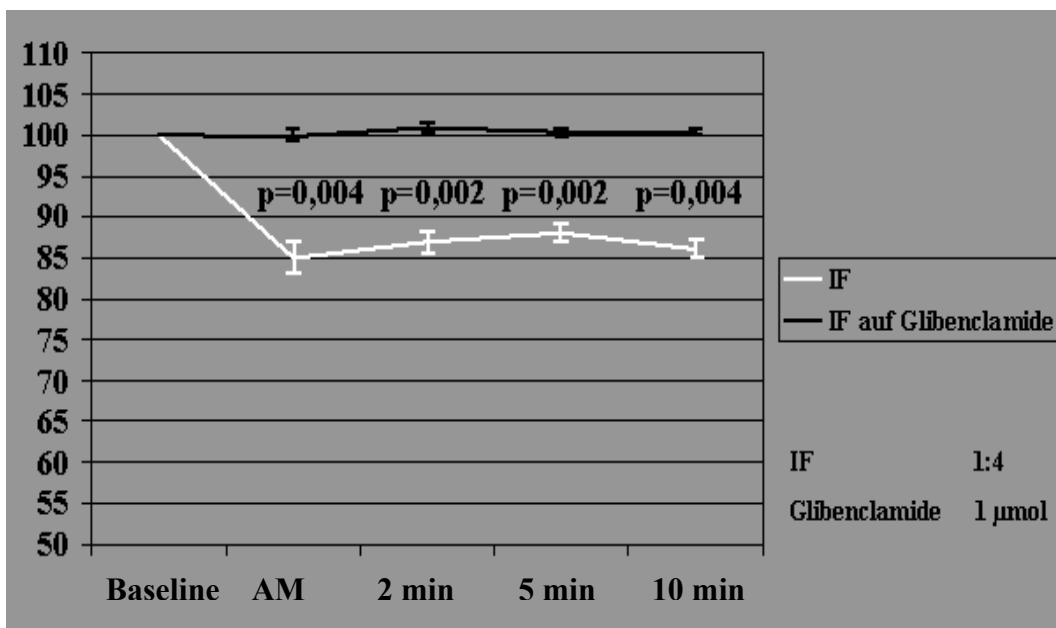


Abb. 18: Effekt von IF auf Glibenclamide in Bezug auf den Kalziumtransienten

Durch die Vorbehandlung der Rattenherzmuskelzellen mit Glibenclamide kann die Wirksamkeit des ischämischen Effluates deutlich abgeschwächt werden.

Wirkung von Natrium-5-hydroxydecanoate auf das ischämische Effluat (IF)

Im Ergebnis zeigte sich, dass die kardiodepressive Wirkung der postischämischen Faktoren auf Zellverkürzung und Kalziumtransient wahrscheinlich über die mitochondrialen Kaliumkanäle vermittelt wird.

Relative Änderung des Kalziumtransienten in % (SEM)				
	Akutmessung (AM)	2 min Wert	5 min Wert	10 min Wert
IF auf 5-HD	-2,47 (+/-1,44)*	-2,10 (+/-1,04)*	-1,95 (+/-1,18)*	-2,15 (+/-2,15)*
IF	-14,80 (+/-4,57)	-12,86 (+/-3,10)	-11,7 (+/-2,57)	-15,18 (+/-2,33)
Relative Änderung der Kontraktilität in % (SEM)				
IF auf 5-HD	-19,01 (+/-3,11)ns	-7,45 (+/-3,27)**	-3,52 (+/-2,49)*	-2,26 (+/-2,57)*
IF	-39,00 (+/-5,98)	-29,30 (+/-4,28)	-26,59 (+/-5,63)	-23,79 (+/-4,40)

Tab. 14: Messwerte der Versuche mit IF und 5-HD (ns-nicht signifikant, * entspricht $p < 0,05$, ** entspricht $p < 0,01$, *** entspricht $p < 0,001$)

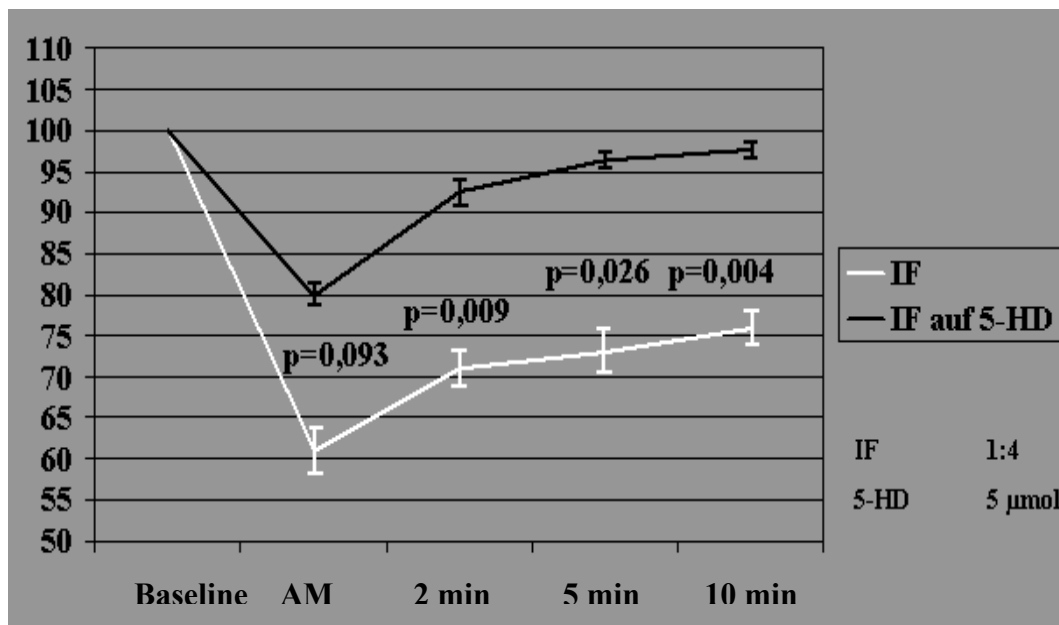


Abb. 19: Effekt von IF auf 5-HD in Bezug auf die Zellkontraktion

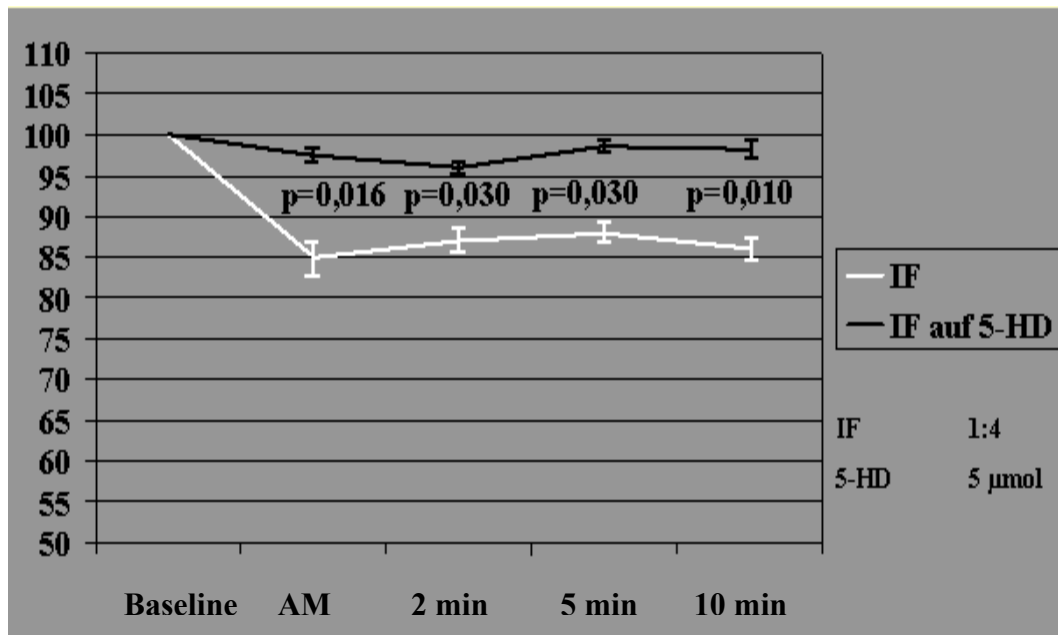


Abb. 20: Effekt von IF auf 5-HD in Bezug auf den Kalziumtransienten

4.3.2 Charakterisierung der Epoxyeicosatetraensäure 17,18

4.3.2.1 Kinetik

Die vorliegende Dosis-Wirkungsbeziehung des 17,18 EET zeigt bis zu einem Sättigungspunkt eine Konzentrationsabhängigkeit. In den vorliegenden Experimenten wurde die Eicosaensäure in einer Konzentration von 1:1000 entsprechend 60 nmol verwendet.

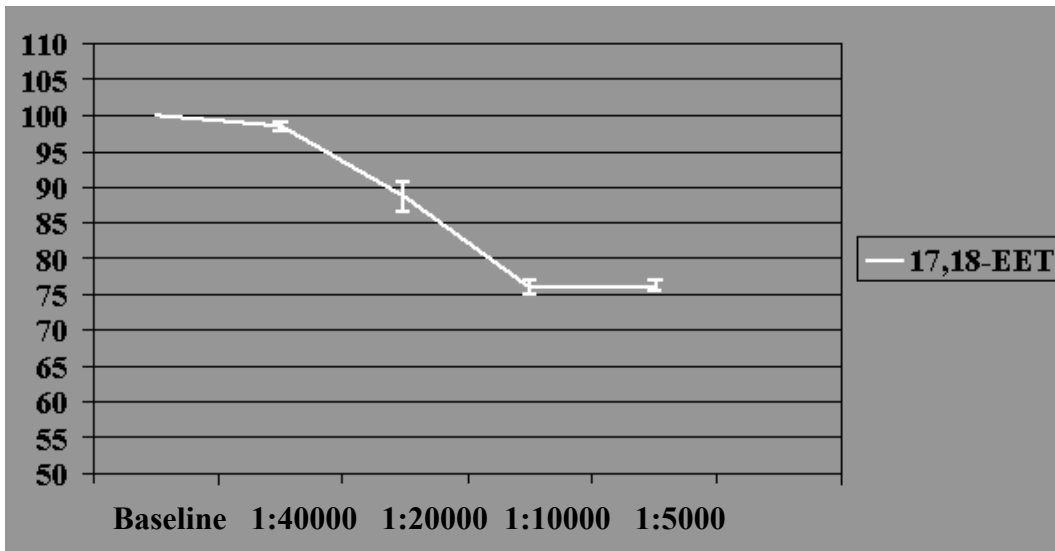


Abb. 21: Dosis-Wirkungsbeziehung von 17,18 EET in Bezug auf die Zellkontraktion

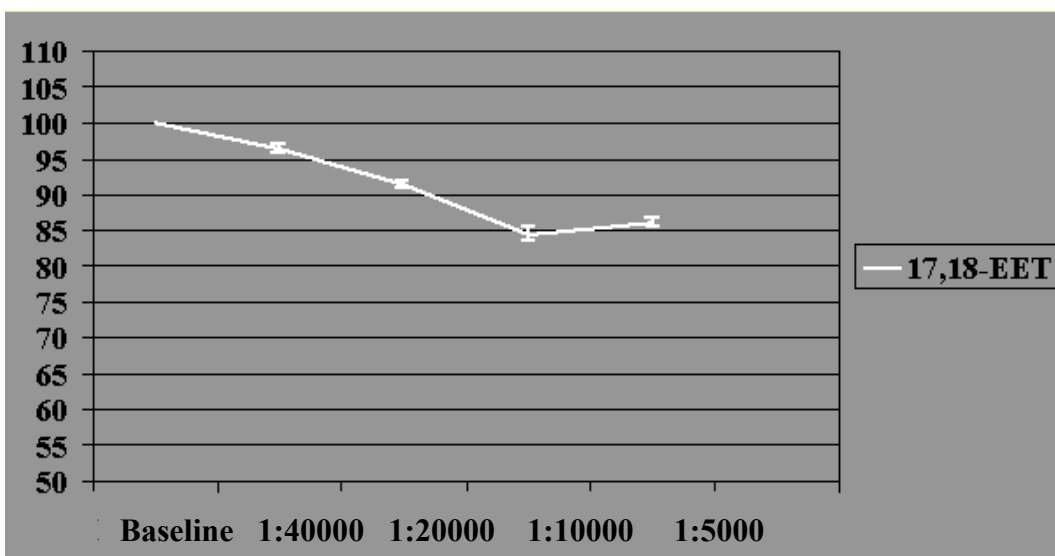


Abb. 22: Dosis-Wirkprofil des 17,18 EET und dessen Effekte auf den Kalziumtransienten

4.3.2.2 Enantiomere des 17,18 EET

In den bisher vorliegenden Messungen ist das 17,18 EET stets als Racemat in einer Konzentration von 60 nmol verwendet worden. Zur weiteren Aufklärung der Wirkweise wird untersucht, welches Isomer die Wirkform darstellt.

Dazu wurden in 2 Versuchsreihen 17r,18s EET respektive 17s,18r EET in ihrer Wirkung auf die Kardiomyozyten untersucht. Die Konzentration der Isomere entsprach dabei mit 60 nmol der Konzentration des Racemates.

Die Messungen ergaben, dass es sich bei 17r,18s EET um das wirksame Enantiomer handelt.

17r,18s EET

		Relative Änderung des Kalziumtransienten in % (SEM)			
		Akutmessung (AM)	2 min Wert	5 min Wert	10 min Wert
17r,18s-EET		-16,98 (+/-0,57) ns	-15,79 (+/-1,43) ns	-16,23 (+/-1,41) ns	-15,27 (+/-1,22) ns
17,18-EET		-15,04 (+/-1,85)	-15,60 (+/-1,92)	-13,97 (+/-3,07)	-14,27 (+/-3,37)
		Relative Änderung der Kontraktilität in % (SEM)			
17r,18s-EET		-23,62 (+/-1,95) ns	-22,09 (+/-2,58) ns	-18,87 (+/-2,89) ns	-20,74 (+/-2,89) ns
17,18-EET		-22,00 (+/-5,19)	-23,00 (+/-4,35)	-24,00 (+/-4,66)	-24,11 (+/-3,25)

Tab. 15: Vergleich der Messungen mit 17r,18s EET und 17,18 EET (ns-nicht signifikant, * entspricht $p < 0,05$, ** entspricht $p < 0,01$, *** entspricht $p < 0,001$)

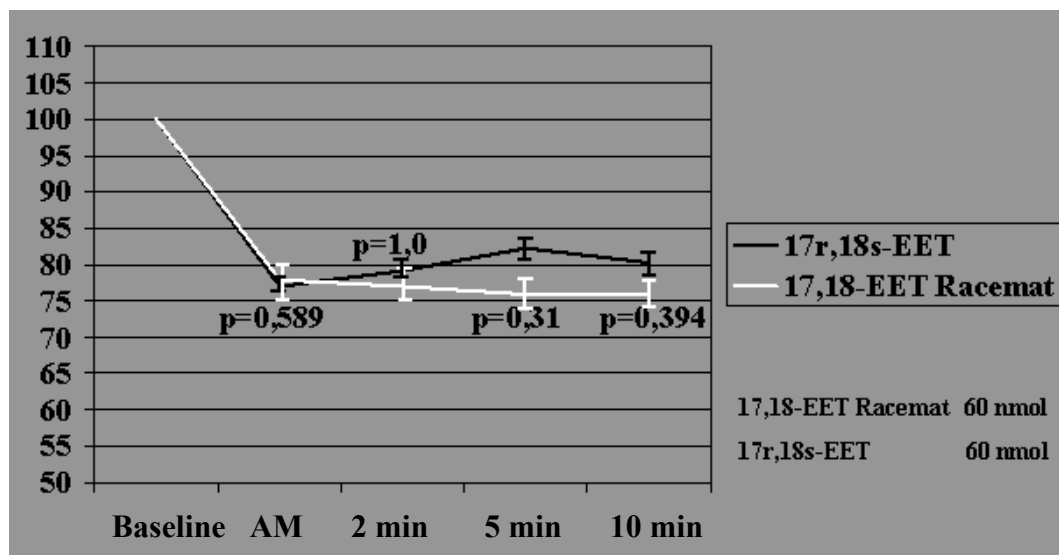


Abb. 23: Vergleich der Wirkung des 17,18 EET Racemates und der 17r,18s EET Isoform auf die Kontraktilität

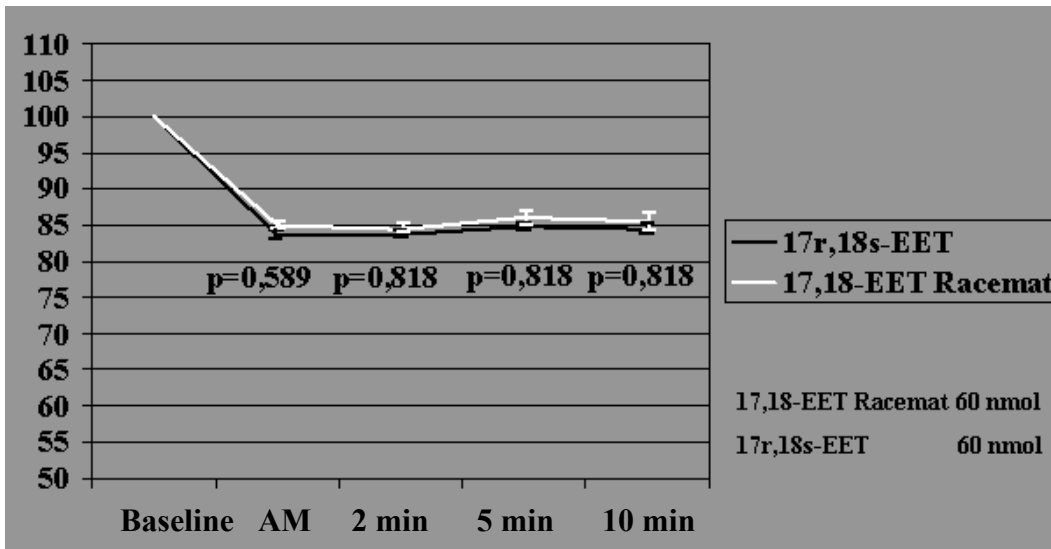


Abb. 24: Vergleich der Wirkung des 17,18 EET Racemates und der 17r,18s EET Isoform auf den Transienten

17s,18r EET

	Relative Änderung des Kalziumtransienten in % (SEM)			
	Akutmessung (AM)	2 min Wert	5 min Wert	10 min Wert
17s,18r-EET	-1,01 (+/-0,28)**	-0,91 (+/-0,56)**	-0,49 (+/-0,79)**	-1,54(+/-0,69)**
17,18-EET	-15,04 (+/-1,85)	-15,60 (+/-1,92)	-13,97 (+/-3,07)	-14,27 (+/-3,37)
	Relative Änderung der Kontraktilität in % (SEM)			
	Akutmessung (AM)	2 min Wert	5 min Wert	10 min Wert
17s,18r-EET	-3,78 (+/-1,59)**	-1,34 (+/-1,24)**	0,18 (+/-0,88)*	-0,14 /+/-0,72)*
17,18-EET	-22,00 (+/-5,19)	-23,00 (+/-4,35)	-24,00 (+/-4,66)	-24,11 (+/-3,25)

Tab.16: Vergleich der Wirkungen von 17s,18r EET und 17,18 EET (ns-nicht signifikant, * entspricht $p < 0,05$, ** entspricht $p < 0,01$, *** entspricht $p < 0,001$)

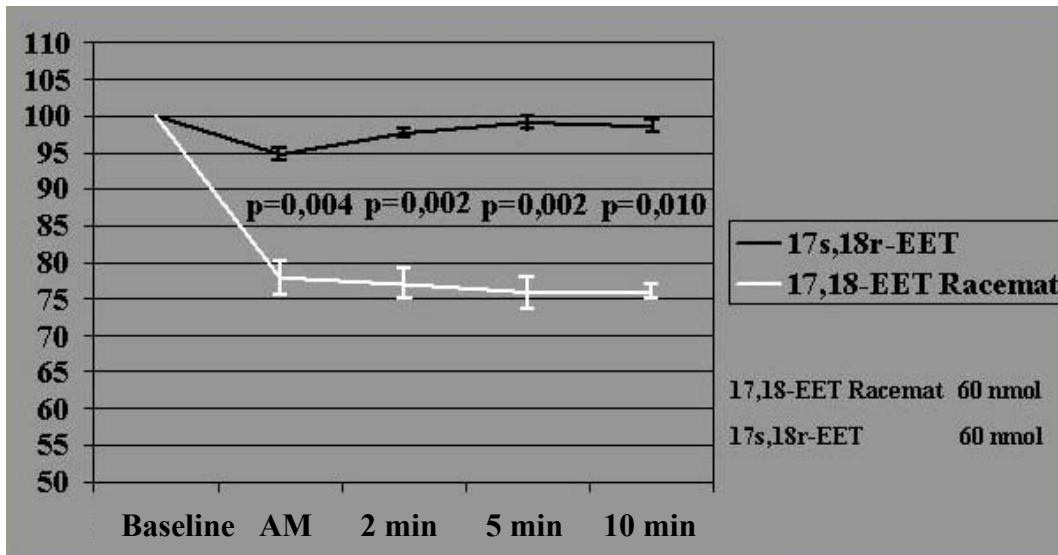


Abb. 25: Vergleich der Wirkung des 17,18 EET Racemates und der 17s,18r EET Isoform auf die Kontraktilität

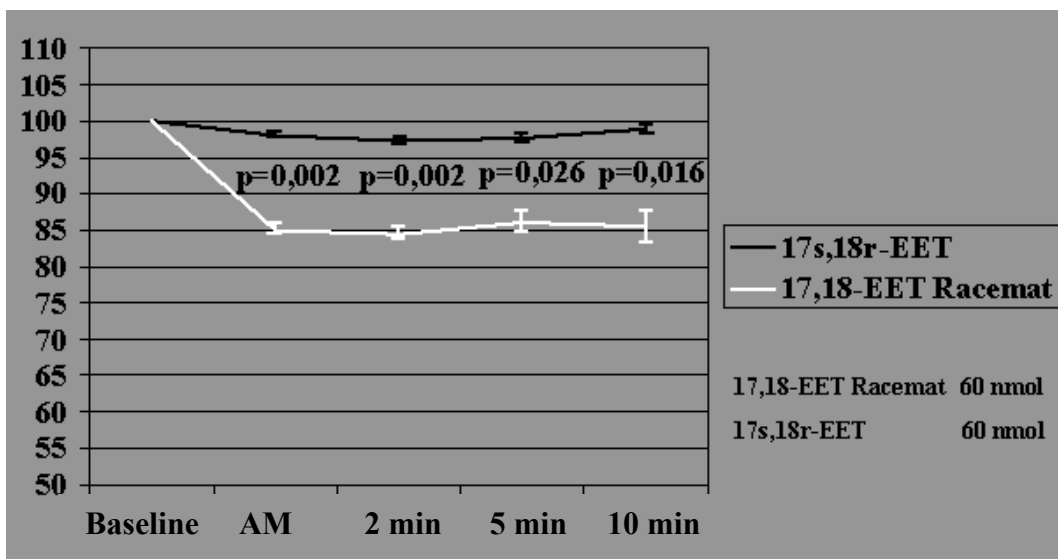


Abb. 26: Vergleich der Wirkung des 17,18 EET Racemates und der 17s,18r EET Isoform auf den Transienten

Wirkung von 11,12 EET auf 17r,18s EET

Zur Bestätigung der Messungen mit 17r,18s EET erfolgte der Nachweis, dass 11,12 EET hier, wie auch unter Verwendung des Racemates in der Lage ist, die negativ ionotrope Wirkung des Mediators zu unterbinden. Ähnlich dem EET 17,18 handelt es sich um eine ungesättigte Eicosaensäure. Dabei sind die Sauerstoffbindungsstellen am C-Atom 11 und 12 lokalisiert sind.

Dazu inkubierten die Zellen 20 min vor Beginn der Messung mit 11,12 EET, das in einer Konzentration von 30 nmol pipettiert wurde, danach erfolgte die Messung unter Perfusion der Zellen mit 17r,18s EET.

	Relative Änderung des Kalziumtransienten in % (SEM)			
	Akutmessung (AM)	2 min Wert	5 min Wert	10 min Wert
17r,18s EET auf 11,12 EET	-1,62 (+/-0,69)**	-2,74(+/-1,33)**	-2,74(+/-1,56)**	-0,92(+/-0,92)**
17r,18s EET	-16,98 (+/-0,57)	-15,79 (+/-1,43)	-16,23 (+/-1,41)	-15,27 (+/-1,22)
Relative Änderung der Kontraktibilität in % (SEM)				
17r,18s EET auf 11,12 EET	-2,95(+/-1,17)**	-3,19(+/-1,41)**	-1,66(+/-1,73)**	-2,44(+/-2,37)**
17r,18s EET	-23,62 (+/-1,95)	-22,09 (+/-2,58)	-18,87 (+/-2,89)	-20,74 (+/-2,89)

Tab. 17: Resultate der Inkubationsversuche von 17r,18s EET und 11,12 EET (ns nicht signifikant, * entspricht $p < 0,05$, ** entspricht $p < 0,01$, *** entspricht $p < 0,001$)

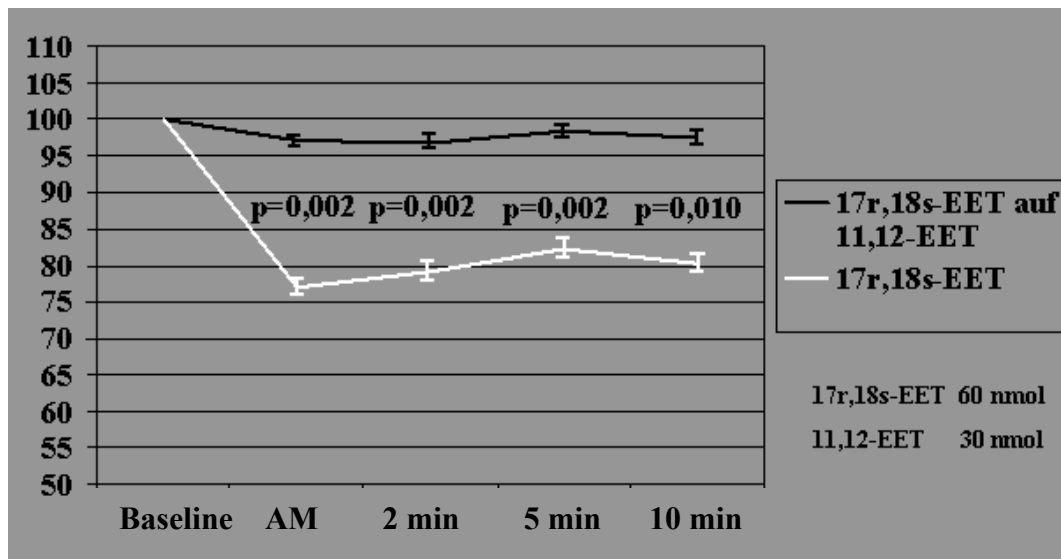


Abb. 27: Beeinflussung der Wirkung von 17r,18s EET auf die Zellkontraktibilität durch 11,12 EET

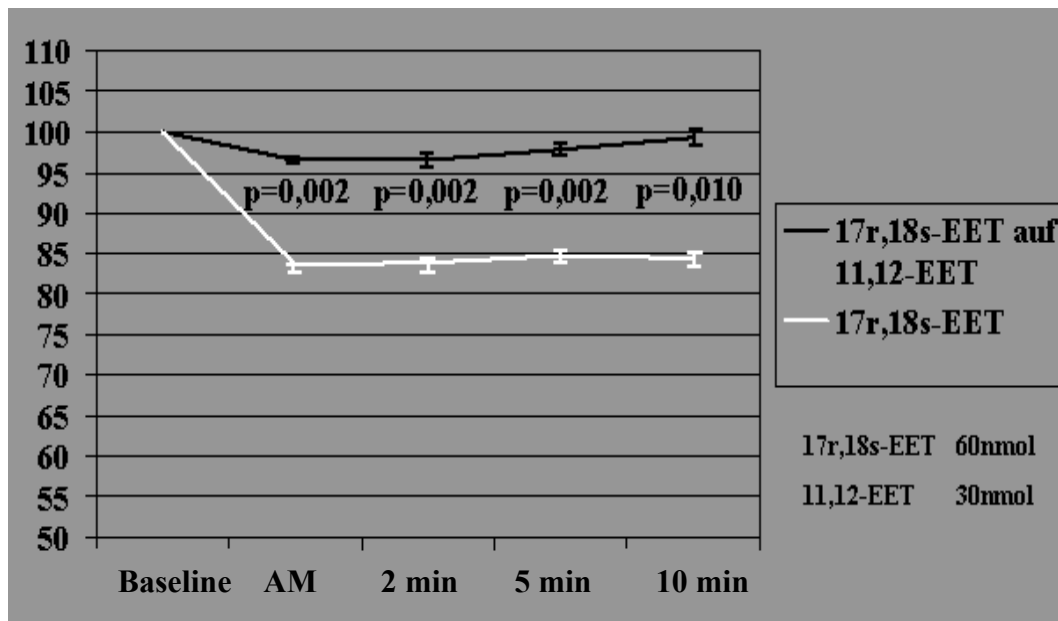


Abb. 28: Beeinflussung der Wirkung von 17r,18s EET auf den Kalziumtransienten durch 11,12 EET

4.3.1.3 Cyclooxygenase-Hemmbarkeit

Analog zu den oben beschriebenen Versuchen mit Inhibitoren des Cyclooxygenasestoffwechsels wurden für 17,18 EET sowie für das aktive Enantiomer 17r,18s EET Experimente durchgeführt. Da es sich um Epoxyeicosaensäuren handelt, liegt die Vermutung nahe, dass diese nicht direkt in ihrer wirksamen Form in die Zellen gelangen, sondern hier erst metabolisiert werden. Eine Möglichkeit der Aktivierung könnte die Verstoffwechslung durch die Cyclooxygenase (COX) sein. Aus diesem Grunde startete die Versuchsreihe mit Indomethacin.

Unselektive Cyclooxygenasehemmung

Indomethacin inhibiert beide Isoformen der Cyclooxygenase mit geringer Präferenz der COX-1. Im Vorfeld wurde mit 5 µmol Indomethacin eine Konzentration bestimmt, welche die Zellen nicht primär über den Zeitraum von 10 min schädigt.

Dazu wurden die Zellen 5 min vor der Messung mit 5 µmol Indomethacin inkubiert, danach die Baseline aufgenommen und die Messkammern mit 17,18 EET und 17r,18s EET perfundiert.

Beeinflussung von 17,18 EET und 17r,18s EET durch Indomethacin

Wie sich im Experiment bestätigte, wurde durch Gabe eines Cyclooxygenase-inhibitors der Kalziumtransient und die Zellkontraktion auf ein Niveau entsprechend der Baselinemessung gebracht.

		Relative Änderung des Kalziumtransienten in % (SEM)			
		Akutmessung (AM)	2 min Wert	5 min Wert	10 min Wert
17,18 EET auf Indomethacin		-0,46 (+/-0,56)**	-0,75(+/-0,53)**	-0,79(+/-0,58)**	-0,50 (+/-0,45)**
17,18 EET		-15,04 (+/-1,85)	-15,60 (+/-1,92)	-13,97 (+/-3,07)	-14,27 (+/-3,37)
		Relative Änderung der Kontraktibilität in % (SEM)			
17,18 EET auf Indomethacin		-2,62 (+/-0,80)**	0,92 (+/-0,97)**	0,08 (+/-1,00)**	-0,51 (+/-0,99)**
17,18 EET		-22,00 (+/-5,19)	-23,00 (+/-4,35)	-24,00 (+/-4,66)	-24,11 (+/-3,25)

Tab. 18: Ergebnisse der Versuchsreihe mit 17,28 EET und Indomethacin (ns= nicht signifikant, * entspricht $p < 0,05$, ** entspricht $p < 0,01$, *** entspricht $p < 0,001$)

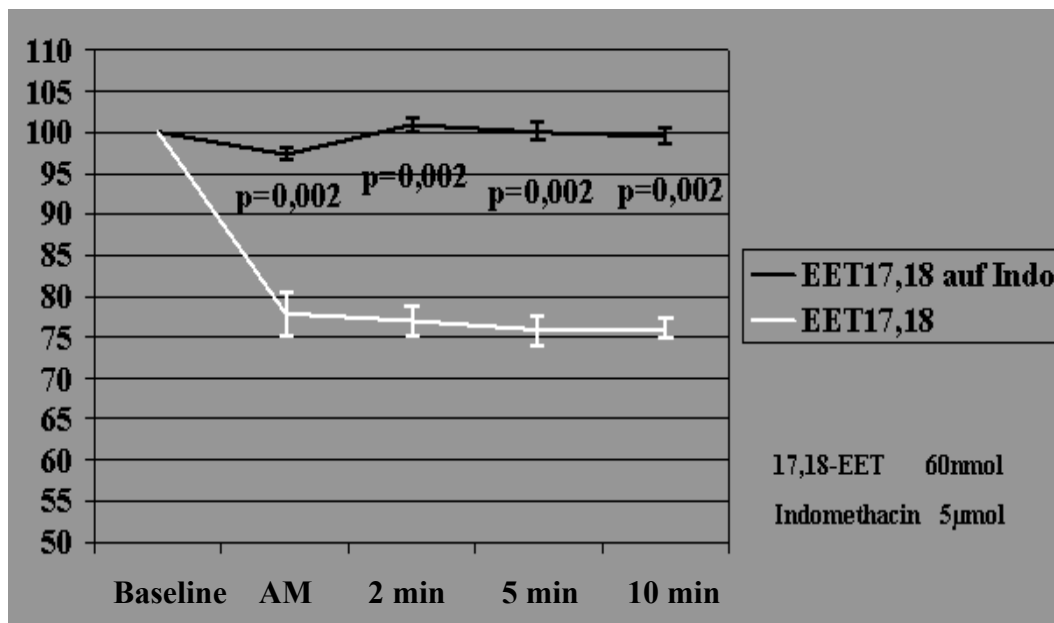


Abb. 29: Effekt von EET 17,18 auf Indomethacin in Bezug auf die Zellkontraktion

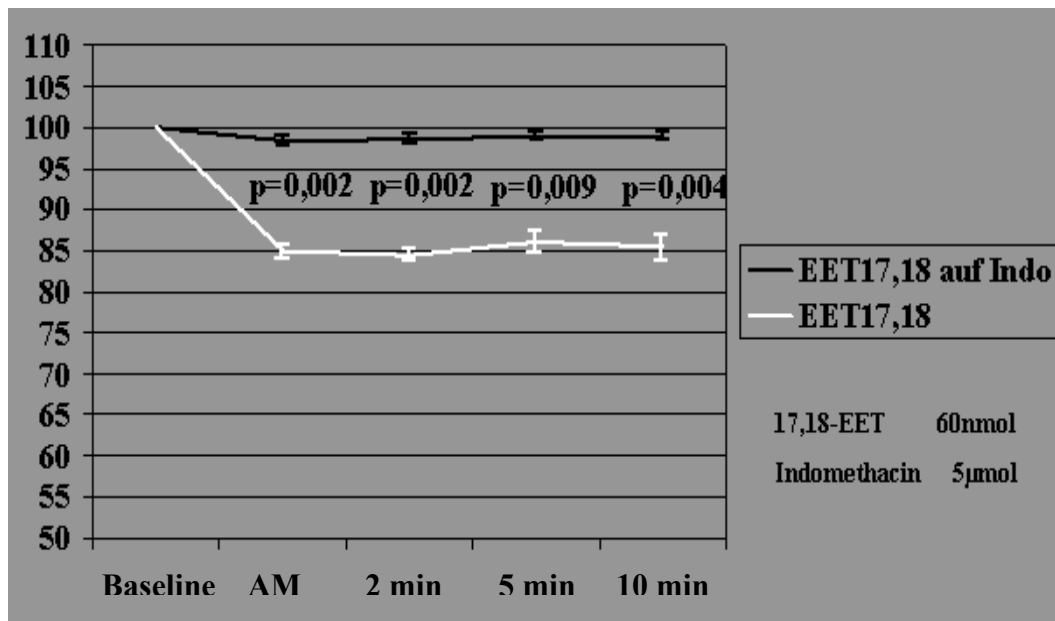


Abb. 30: Effekt von EET 17,18 auf Indomethacin in Bezug auf den Kalziumtransienten

Auch das neu bestimmte wirksame Enantiomer 17r,18s EET wurde auf die Beeinflussbarkeit durch Indomethacin untersucht. Dabei ergab sich ein ähnliches Bild der antagonistischen Wirkung wie für das Racemat.

	Relative Änderung des Kalziumtransienten in % (SEM)			
	Akutmessung (AM)	2 min Wert	5 min Wert	10 min Wert
17r,18s EET auf Indomethacin	-0,10 (+/-0,18)**	-0,06 (+/-0,14)**	-1,14 (+/-0,65)**	-0,73 (+/-0,88)*
17r,18s EET	-16,98 (+/-0,57)	-15,79 (+/-1,43)	-16,23 (+/-1,41)	-15,27 (+/-1,22)
	Relative Änderung der Kontraktilität in % (SEM)			
17r,18s EET auf Indomethacin	-1,32 (+/-0,54)**	-0,81 (+/-1,77)**	-1,05 (+/-2,66)**	-1,30 (+/-1,91)*
17r,18s EET	-23,62 (+/-1,95)	-22,09 (+/-2,58)	-18,87 (+/-2,89)	-20,74 (+/-2,89)

Tab. 19: Messwerte der Experimente mit 17r,18s EET und Indomethacin (ns= nicht signifikant, * entspricht $p < 0,05$, ** entspricht $p < 0,01$, *** entspricht $p < 0,001$)

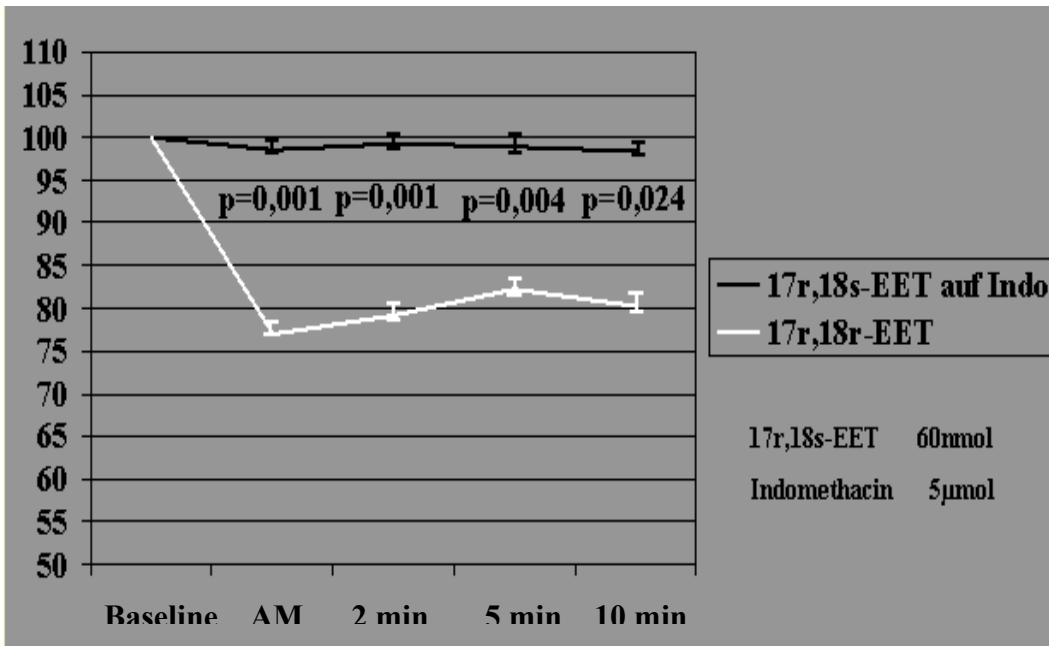


Abb. 31: Effekt von EET 17r,18s auf Indomethacin in Bezug auf die Zellkontraktion

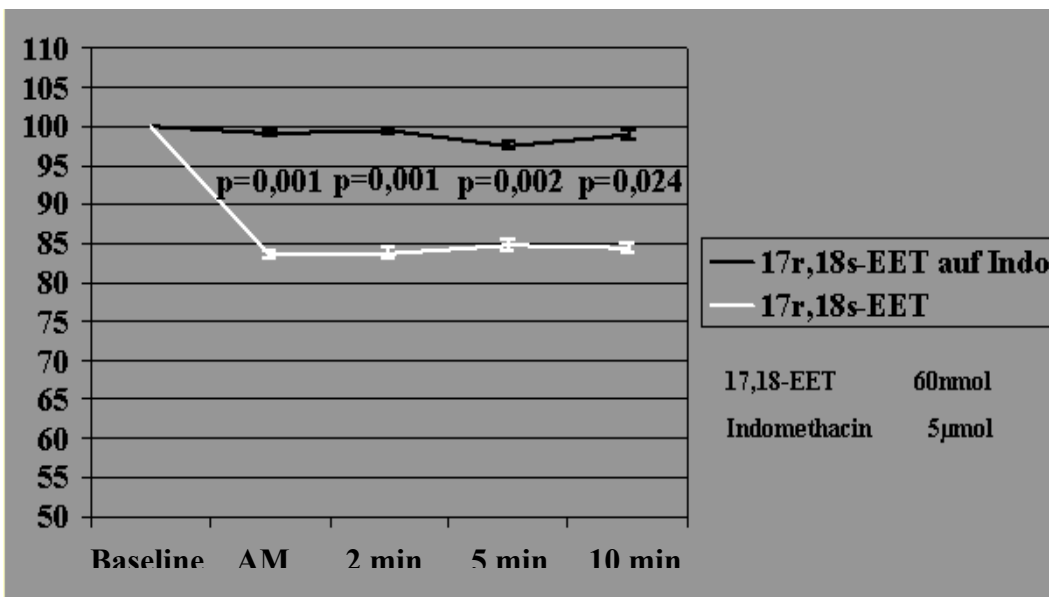


Abb. 32: Effekt von EET 17r,18s auf Indomethacin in Bezug auf den Kalziumtransienten

Selektive Cyclooxygenasehemmung

Selektive COX-Inhibitoren sind in der Lage selektiv nur eine Isoform der Cyclooxygenase auszuschalten. So wurde SC-560 als spezifischer Inhibitor der Cyclooxygenase 1 und NS-398 als Inhibitor der Isoform 2 der Cyclooxygenase verwendet.

In Vorversuchen wurde mit 0,25 μmol eine Konzentration bestimmt, welche die Zellen bei einer parallelen Applikation der selektiven COX-Inhibitoren nicht schädigt.

Zur Bestätigung der Versuchsreihe mit Indomethacin erfolgte die Inkubation zunächst mit beiden Cyclooxygenaseinhibitoren. Die Applikation der jeweiligen Substanz erfolgte 5 min vor Aufnahme der Basiswerte.

	Relative Änderung des Kalziumtransienten in % (SEM)			
	Akutmessung (AM)	2 min Wert	5 min Wert	10 min Wert
17,18 EET auf COX-Inhibitoren	-4,00 (+/-0,72)**	-3,70 (+/-1,95)**	-3,77 (+/-1,23)*	-4,02 (+/-1,58)**
17,18 EET	-15,04 (+/-1,85)	-15,60 (+/-1,92)	-13,97 (+/-3,07)	-14,27 (+/-3,37)
	Relative Änderung der Kontraktilität in % (SEM)			
17,18 EET auf COX-Inhibitoren	-5,82 (+/-1,62)*	-2,29 (+/-0,41)**	-3,05 (+/-1,41)*	-3,64 (+/-1,71)**
17,18 EET	-22,00 (+/-5,19)	-23,00 (+/-4,35)	-24,00 (+/-4,66)	-24,11 (+/-3,25)

Tab. 20: Ergebnisse der Messungen von 17,18 EET und COX-Inhibitoren (ns nicht signifikant, * entspricht $p < 0,05$, ** entspricht $p < 0,01$, *** entspricht $p < 0,001$)

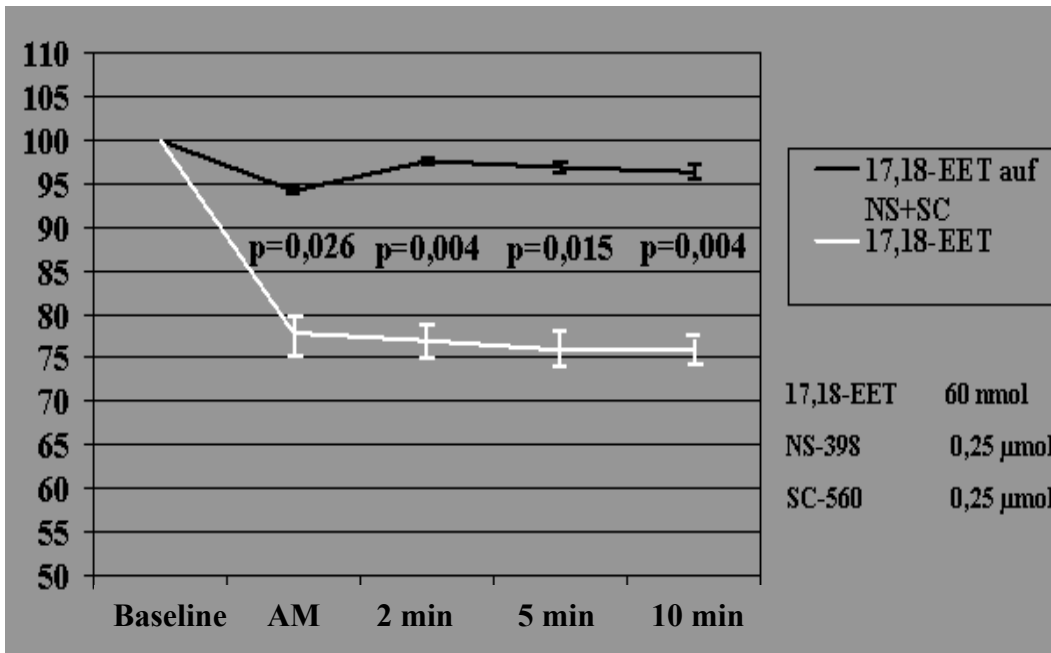


Abb. 33: Wirkung von 17,18 EET auf NS-398 und SC-560 auf die Zellkontraktion

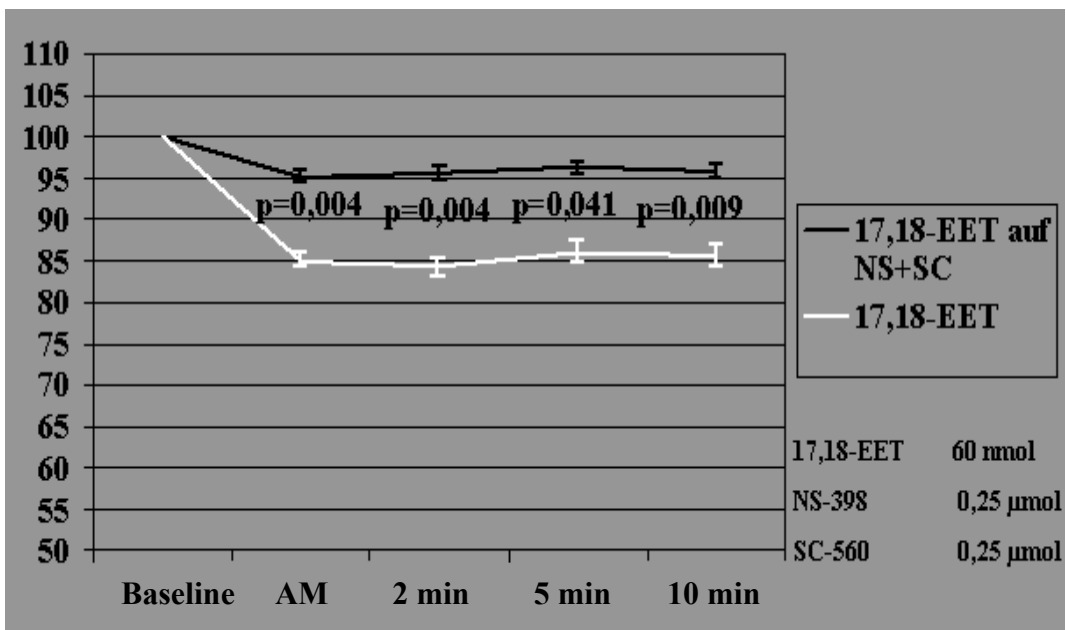


Abb. 34: Wirkung von 17,18 EET auf NS-398 und SC-560 auf den Kalziumtransienten

Wirkung von SC-560 auf 17,18 EET

Nun soll im weiteren Versuchsablauf die genaue Bestimmung des aktivierenden Enzyms erfolgen. Dazu erfolgte die Inkubation der Zellen mit dem COX-1-beziehungsweise dem COX-2- Inhibitor.

SC-560 inkubierte für 5 min in einer Konzentration von 0,25 μmol mit den isolierten Kardiomyozyten bevor die Baseline aufgenommen wurde.

Anschließend wurden die Zellen mit 17,18 EET in einer Konzentration von 60 nmol perfundiert.

Hier konnte festgestellt werden, dass eine Inhibition der Cyclooxygenase-1 nicht die Wirksamkeit des kardiodepressiven Mediators verändert.

Relative Änderung des Kalziumtransienten in % (SEM)				
	Akutmessung (AM)	2 min Wert	5 min Wert	10 min Wert
17,18 EET auf SC-560	-20,74 (+/-4,51) ns	-15,69 (+/-2,69) ns	-16,34 (+/-2,83) ns	-16,79 (+/-3,87) ns
17,18 EET	-15,04 (+/-1,85)	-15,60 (+/-1,92)	-13,97 (+/-3,07)	-14,27 (+/-3,37)
Relative Änderung der Kontraktilität in % (SEM)				
17,18 EET auf SC-560	-27,35 (+/-4,75) ns	-22,32 (+/-1,71) ns	-21,55 (+/-2,64) ns	-22,59 (+/-2,07) ns
17,18 EET	-22,00 (+/-5,19)	-23,00 (+/-4,35)	-24,00 (+/-4,66)	-24,11 (+/-3,25)

Tab. 21: Resultate der Versuche mit 17,18 EET und SC-560 (ns-nicht signifikant,

* entspricht $p < 0,05$, ** entspricht $p < 0,01$, *** entspricht $p < 0,001$)

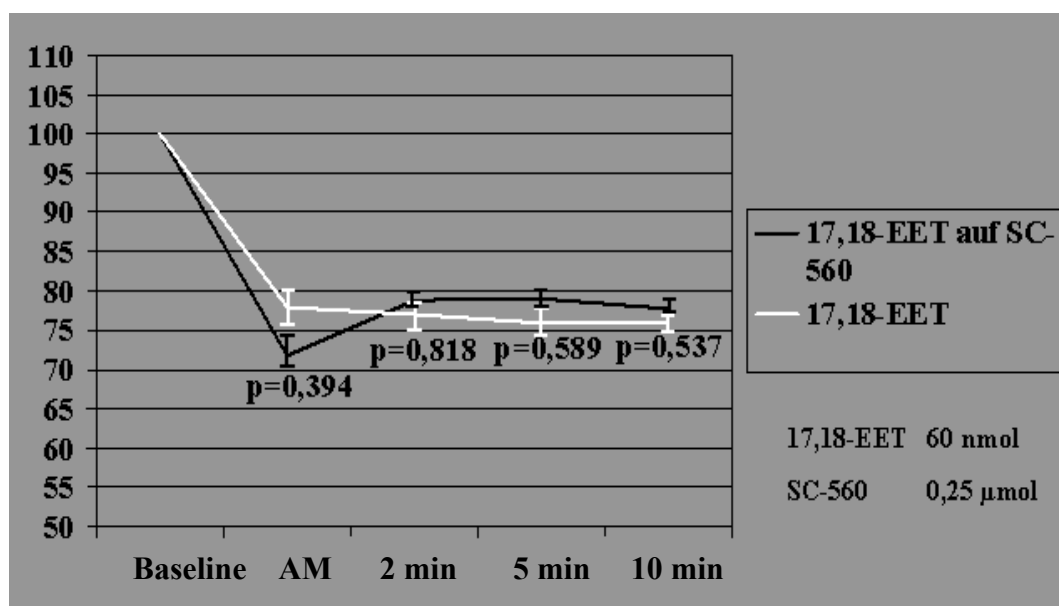


Abb. 35: Wirkung von 17,18 EET nach Inkubation der Zellen mit SC-560 auf die Zellkontraktion

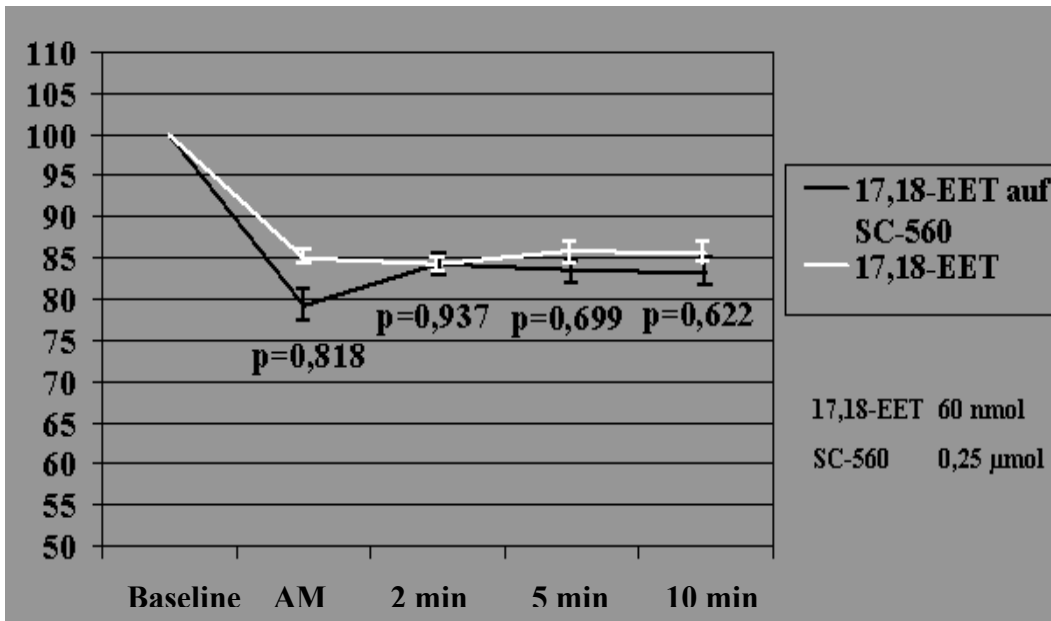


Abb. 36: Wirkung von 17,18 EET nach Inkubation der Zellen mit SC-560 auf den Kalziumtransienten

Wirkung von NS-398 auf 17,18 EET

NS-398 wurde in der Konzentration von 0,25 µmol verwendet und nach einer Inkubationszeit von 5 min 17,18 EET in einer Verdünnung von 60 nmol zu den Zellen gegeben.

Während bei der Inkubation der Zellen mit SC-560 der kardionegative Effekt des 17,18 EET erhalten bleibt, tritt nach Hemmung der COX 2 kein Effekt der Eicosaensäure ein.

	Relative Änderung des Kalziumtransienten in % (SEM)			
	Aktmessung (AM)	2 min Wert	5 min Wert	10 min Wert
17,18 EET auf NS-398	0,15 (+/-1,09)**	-2,27 (+/-2,43)**	-0,63 (+/-2,09)*	-1,39 (+/-1,91)*
17,18 EET	-15,04 (+/-1,85)	-15,60 (+/-1,92)	-13,97 (+/-3,07)	-14,27 (+/-3,37)
	Relative Änderung der Kontraktilität in % (SEM)			
17,18 EET auf NS-398	-2,78 (+/-3,24)**	-2,88 (+/-2,53)**	2,18 (+/-2,11)**	0,91 (+/-2,94)**
17,18 EET	-22,00 (+/-5,19)	-23,00 (+/-4,35)	-24,00 (+/-4,66)	-24,11 (+/-3,25)

Tab. 22: Messwerte der Experimente mit 17,18 EET und NS-398 (ns-nicht signifikant, * entspricht $p < 0,05$, ** entspricht $p < 0,01$, *** entspricht $p < 0,001$)

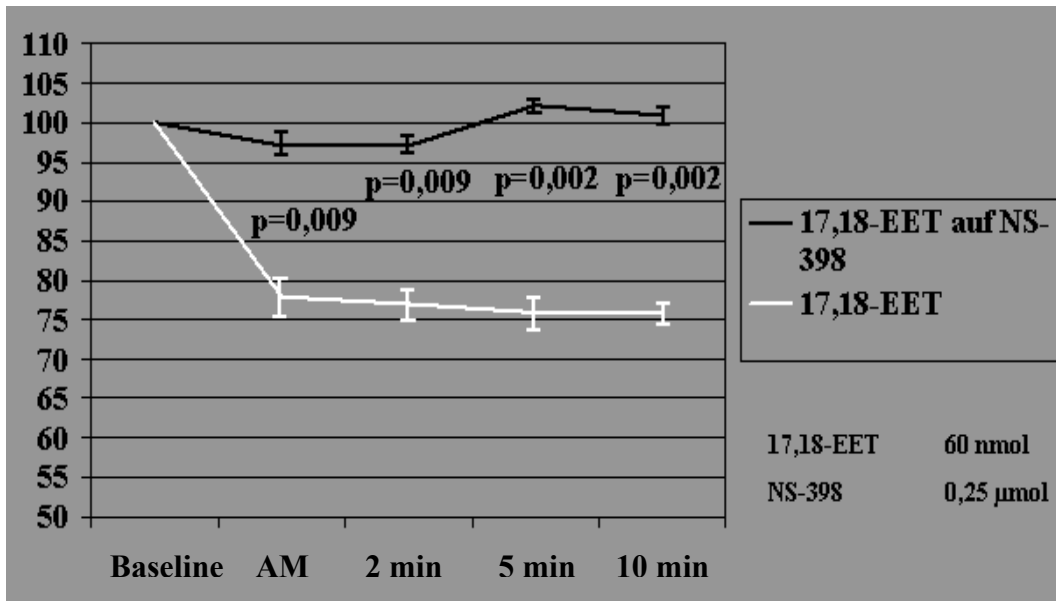


Abb. 37: Effekt von EET 17,18 auf NS-398 in Bezug auf die Zellkontraktion

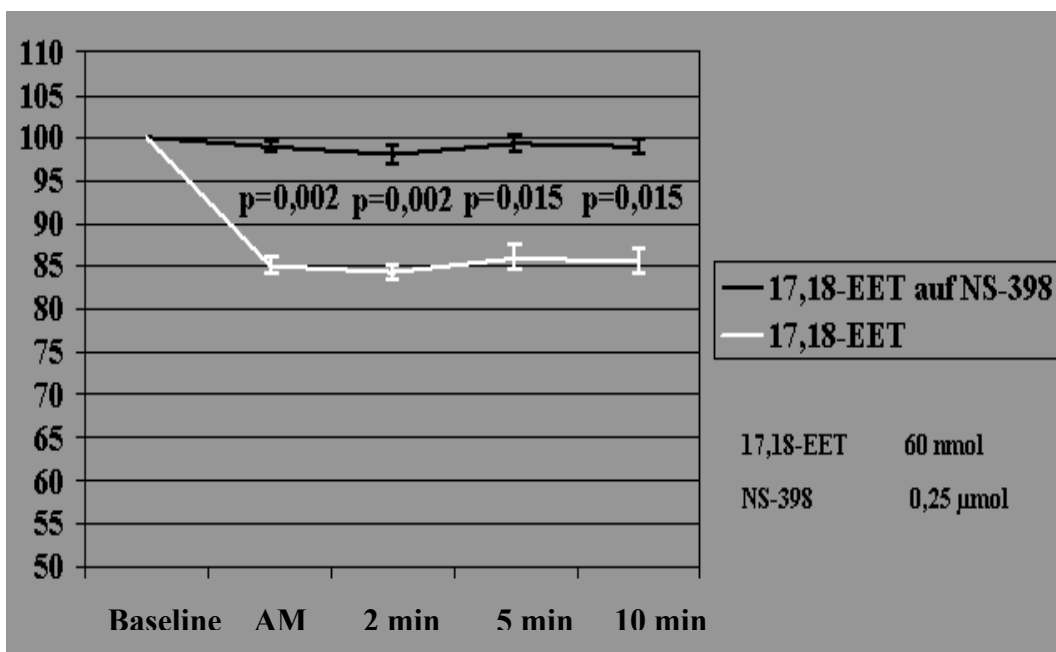


Abb. 38: Effekt von EET 17,18 auf NS-398 in Bezug auf den Kalziumtransienten

4.3.1.4 Kaliumkanalblockade

Zur Darstellung der Hemmbarkeit ATP-abhängiger K⁺-Kanäle wurde zunächst die Wirkung von Glibenclamide untersucht, danach wurden Versuche mit Natrium-5-Hydroxydecanoate als speziellem Inhibitor der mitochondrialen Kaliumkanäle durchgeführt.

Mittels Vorversuchen wurde eine Konzentration von 1 μmol Glibenclamide und 5 μmol Natrium-5-Hydroxydecanoate zur Durchführung der Experimente bestimmt.

Unselektive Blockade von Kaliumkanälen

Bei Glibenclamide handelt es sich um einen unselektiven Inhibitor ATP-abhängiger Kaliumkanäle. Es werden also sowohl sarkolemmale, als auch mitochondriale Strukturen inhibiert.

Das Ergebnis dieser Interaktionsversuche zeigt eine Hemmbarkeit der kardio-depressiven Wirkung von 17,18 EET, sowohl für die Zellverkürzung, als auch für den Transienten.

	Relative Änderung des Kalziumtransienten in % (SEM)			
	Akutmessung (AM)	2 min Wert	5 min Wert	10 min Wert
17,18 EET auf Glibenclamide	-0,91 (+/-1,78)*	-0,53 (+/-7,6)*	-1,01 (+/-5,69)*	-1,47 (+/-1,63)*
17,18 EET	-15,04 (+/-1,85)	-15,60 (+/-1,92)	-13,97 (+/-3,07)	-14,27 (+/-3,37)
Relative Änderung der Kontraktilität in % (SEM)				
17,18 EET auf Glibenclamide	-2,10 (+/-2,36)*	2,98 (+/-2,58)*	3,01 (+/-2,54)*	0,98 (+/-3,20)*
17,18 EET	-22,00 (+/-5,19)	-23,00 (+/-4,35)	-24,00 (+/-4,66)	-24,11 (+/-3,25)

Tab. 24: Ergebnisse der Versuche mit 17,18 EET und Glibenclamide (ns-nicht signifikant, * entspricht $p < 0,05$, ** entspricht $p < 0,01$, *** entspricht $p < 0,001$)

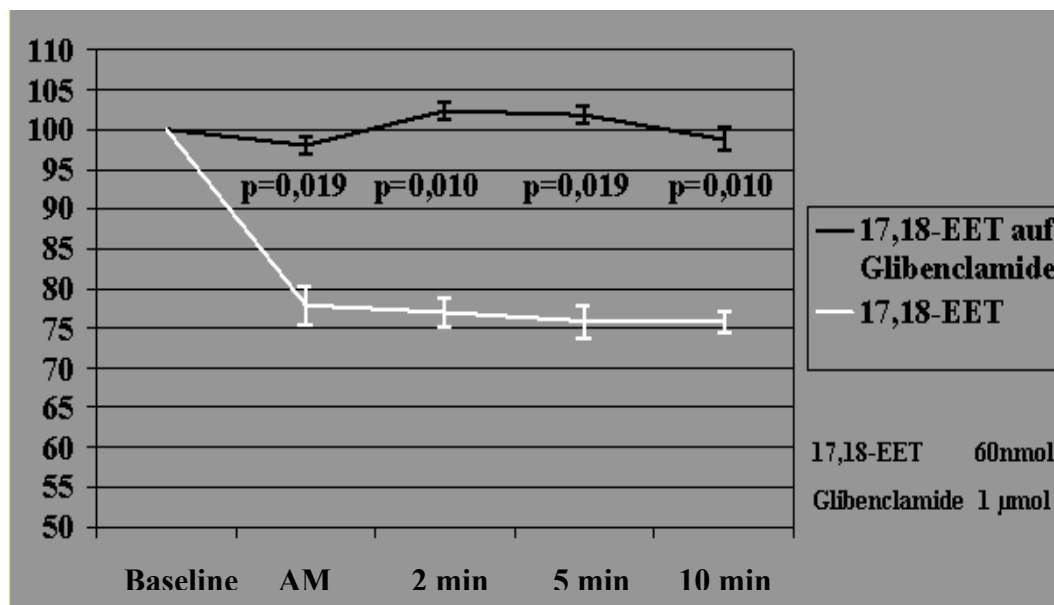


Abb. 39: Effekt von EET 17,18 auf Glibenclamide in Bezug auf die Zellkontraktion

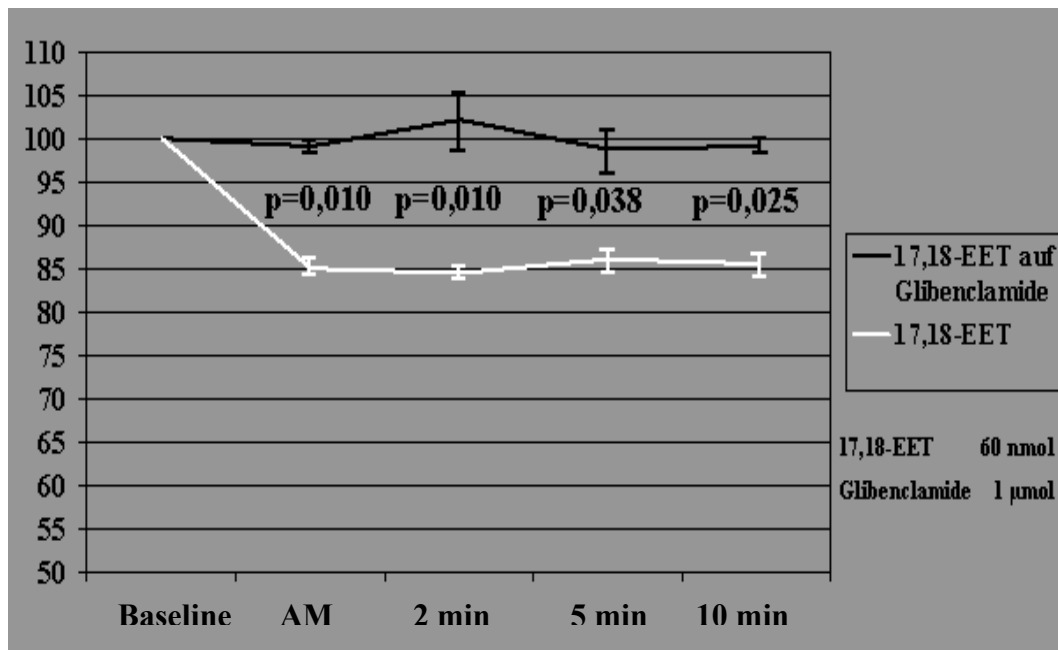


Abb. 40: Effekt von EET-17,18 auf Glibenclamide in Bezug auf den Kalziumtransienten

Selektive Blockade der mitochondrialen Kaliumkanäle

Zur eindeutigen Identifizierung der beteiligten Strukturen kam Natrium-5-hydroxydecanoate zur Anwendung. Für diesen Stoff ist eine Präferenz der mitochondrialen ATP-abhängigen Kaliumkanäle beschrieben.

Hier zeigt sich eine signifikante Minderung des messbaren Effektes der Epoxyeicosaensäure, wenn die Zellen vor der Messung für 5 min mit 5-HD inkubierten.

	Relative Änderung des Kalziumtransienten in % (SEM)			
	Akutmessung (AM)	2 min Wert	5 min Wert	10 min Wert
17,18 EET auf 5-HD	-1,63 (+/-1,14)**	-0,47 (+/-0,46)**	-1,54 (+/-1,26)**	0,33 (+/-1,43)*
17,18 EET	-15,04 (+/-1,85)	-15,60 (+/-1,92)	-13,97 (+/-3,07)	-14,27 (+/-3,37)
	Relative Änderung der Kontraktibilität in % (SEM)			
17,18 EET auf 5-HD	-1,53 (+/-2,32)**	0,67 (+/-2,31)**	2,32 (+/-2,22)**	1,71 (+/-3,95)*
17,18 EET	-22,00 (+/-5,19)	-23,00 (+/-4,35)	-24,00 (+/-4,66)	-24,11 (+/-3,25)

Tab. 25: Resultate der Versuchsreihe mit 17,19 EET und 5-HD (ns-nicht signifikant, * entspricht $p < 0,05$, ** entspricht $p < 0,01$, *** entspricht $p < 0,001$)

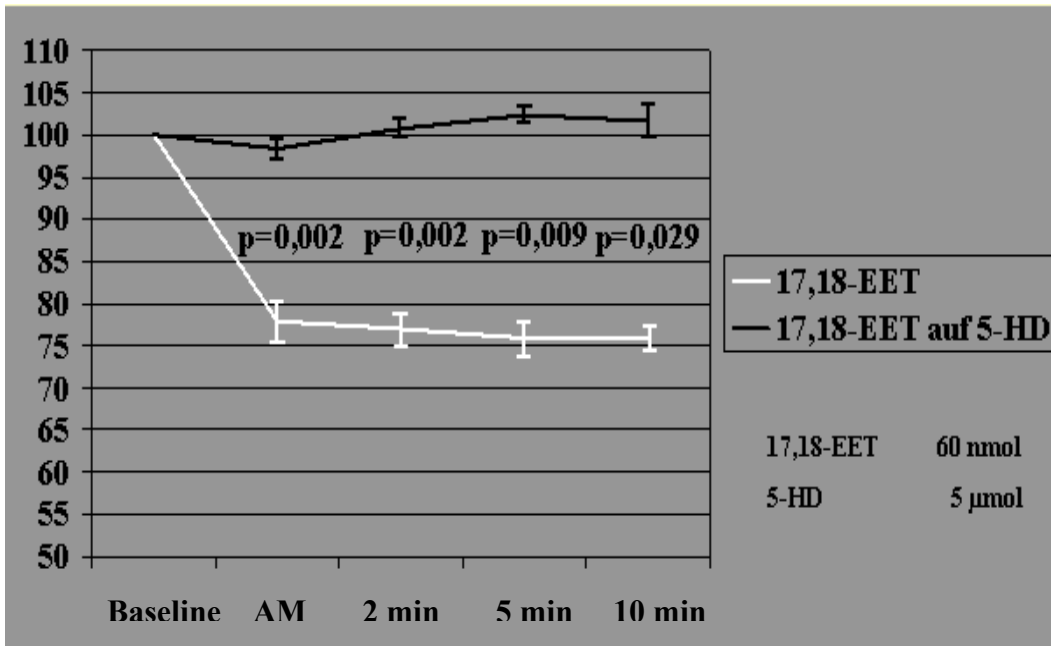


Abb. 41: Effekt von EET 17,18 auf 5-HD in Bezug auf die Zellkontraktion

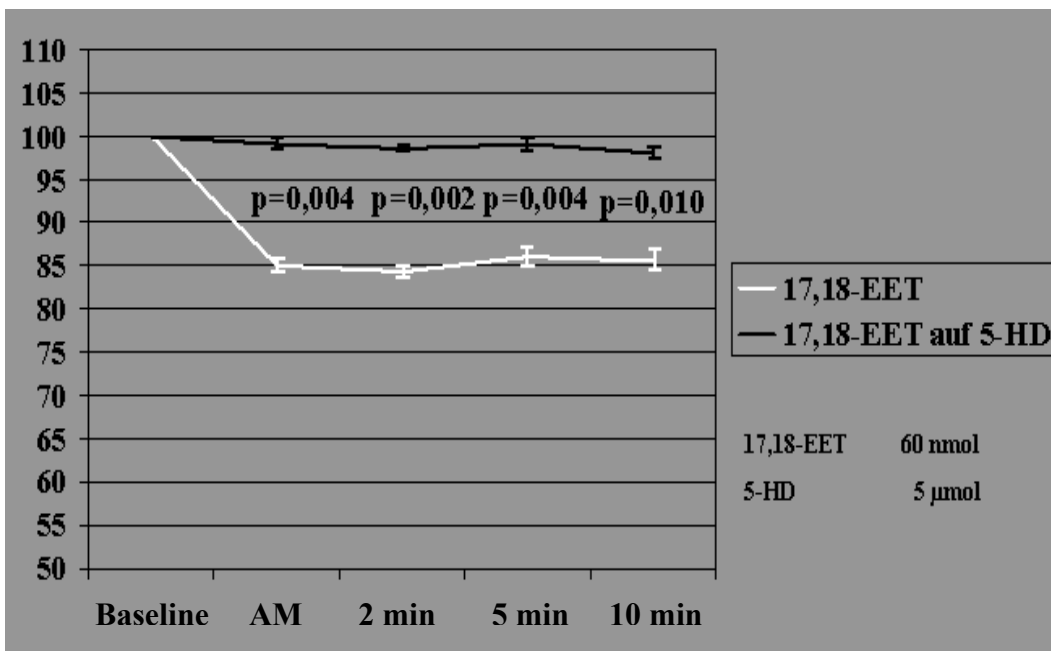


Abb. 42: Effekt von EET 17,18 auf 5-HD in Bezug auf den Kalziumtransienten

5. Diskussion

5.1 Kardiodepressive Faktoren im postischämischen Effluat

Die Ischämie des Herzens führt zu einer Veränderung der Gesamtfunktion des Organs nach Beendigung der Ischämiephase. Die zugrundeliegenden Mechanismen der Abweichungen wurden von Felix et al [21] auf die Produktion unbekannter negativ inotroper Substanzen (NIS) zurückgeführt. Mit der weiteren Forschung an diesem Themengebiet gelang die Charakterisierung der NIS insoweit, als dass sie die Effekte über die Hemmung des L-Typ Ca^{++} -Kanals bewirken [27]. Des Weiteren ergaben sich aus Voruntersuchungen starke Hinweise auf den Metabolismus der Epoxyeicosatetraensäure 17,18 als Ursache der Minderung der Kontraktilität. So war es das Ziel dieser Arbeit, mögliche Mechanismen der Signaltransduktion aufzudecken. Aus diesem Grunde wurde das Effluat, welches bei der Ischämie eines Rattenherzens gewonnen wurde, sowie verwandte kardiodepressive Substanzen, die Epoxyeicosaensäuren experimentellen Untersuchungen an isolierten Rattenkardiomyozyten unterzogen. Im Zentrum der Betrachtung stand hier der Einfluss des Effluates auf den intrazellulären Kalziumstoffwechsel und auf die Kontraktilität der Myozyten, sowie deren Interaktionen mit verschiedenen Medikamenten.

Zur Messung der intrazellulären Kalziumspiegel kam das System der Fluoreszenzmikroskopie zum Einsatz. In Kombination mit Fura-2-AM waren wir in der Lage, intrazelluläre Kalziumveränderungen der Kardiomyozyten zu detektieren. Fura-2-AM ist ein kalziumsensitiver Fluoreszenzfarbstoff, der zur kontinuierlichen Messung des intrazellulären Kalziums geeignet ist.

Die Auswertung der Messungen erfolgte unter Verwendung eines entsprechenden Computerprogramms (IonOptix), welches es erlaubte eine hohe zeitliche Auflösung der intrazellulären Kalziumschwankungen verbunden mit einer parallelen Aufzeichnung der Verkürzung einzelner Kardiomyozyten zu erzielen.

Die vorliegende Studie zeigt, dass die Wirkung des postischämischen Effluates, welches akut den cytosolischen Kalziumgehalt der Kardiomyozyten vermindert [27], durch Interaktionsversuche mit verschiedenen Medikamenten aufzuheben ist.

Anhand einer Verdünnungsreihe mit Versuchspuffer konnte ein Dosisabhängigkeit sowohl für das untersuchte postischämische Effluat, als auch für den potentiellen Mediator, das 17,18 EET nachgewiesen werden.

In Übereinstimmung mit den durchgeführten Messungen, welche 17r,18s EET als das aktive Enantiomer des 17,18-EET-Racemates kennzeichnen, beschrieb Lauterbach [108] das 17r,18s EET als wirksamen Bestandteil des Racemates. Die Regioselektivität bei der Darstellung der 17,18 Epoxyeicosatetraensäure ist für menschliche Cytochrom P 450 Enzyme beschrieben [123].

Dabei setzt der kardiodepressive Effekt akut nach Superperfusion der Kardiomyozyten ein.

Bei den vorliegenden Untersuchungsergebnissen stellt sich die Frage nach der chemischen Natur des Faktors, sowie nach der Signaltransduktionskaskade, die durch dessen Freisetzung abläuft.

Endogene negativ inotrop wirksame Substanzen wurden auch bei anderen experimentellen Ansätzen entdeckt. Dem Endokard und dem Endothel entstammende Mediatoren sind in der Lage die Kontraktilität heraufzusetzen bzw. herunterzuregulieren [5], dabei spielen vor allem die Derivate der Arachidonsäure in Form der Eicosatriensäuren eine Rolle [122]. Die Freisetzung der hier postulierten Substanz erfolgt direkt aus dem Myokardgewebe, denn eine Entfernung der Endothelzellen erbrachte keine Änderung der Wirksamkeit [4].

Bei den wirksamen Bestandteilen des Mediatorenpools des koronaren postischämischen Effluates handelt es sich wahrscheinlich nicht um Proteine, sondern um einen stabilen, hitzeresistenten Faktor, der kleiner als 0,5 Kd ist [27].

Felix et al [27] beschreibt die Blockade des L-Typ Kalziumkanals als initiales Ereignis, welches die Absenkung der intrazellulären Kalziumkonzentration und daraus folgend die Abnahme der Kontraktilität verursacht. Dabei ist dieser Effekt unabhängig vom Status des Ca^{++} -Kanals, also nicht durch cAMP abhängige Phosphorylierung oder Dihydropyridine vermittelt. Auch die Beeinflussung durch β -adrenerge Stimulation konnte durch die Messung der Aktivität der Protein-kinase C ausgeschlossen werden, so dass eine direkte Interaktion mit dem Kanal möglich scheint [27].

Die beobachtbare Reduktion des Ca^{++} -Einstromes, des Kalziumtransienten und daraus folgend der Zellverkürzung, welche sowohl durch den ischämischen Faktor IF, als auch durch dessen vermutete Reinsubstanz das 17,18 EET hervorgerufen wird, ist durch verschiedene Medikamente blockierbar.

5.2 Interaktion der Mediatoren mit Indomethacin, NS-398 und SC-560

In den ersten Versuchsreihen mit Indomethacin präsentierte sich eine nahezu vollständige Inhibition der Effekte, die sich im nachhinein mit dem selektiven COX-2-Inhibitor NS-398 als reproduzierbar erwiesen.

Der relativ starke Abfall der Zellverkürzung in der Akutmessung des ischämischen Effluates, im Gegensatz zur Reaktion des 17,18 EET, bei gleichzeitig erhaltenem Kalziumtransienten, könnte auf einen weiteren Faktor im post-ischämischen Pool hinweisen, der unabhängig vom Kalziumhaushalt der Zelle die Kontraktilität herabsetzt. Ein solcher desensitivierender Faktor wurde auch von anderen Autoren beschrieben [135].

Die Vermittlung der Wirkung über die Isoform 2 der Cyclooxygenase bestätigt die Vermutung, dass es sich bei dem freigesetzten Mediator um einen endogenen Schutzfaktor handelt, der während eines ischämischen Ereignisses im Myokard produziert wird. So könnte die während einer Ischämie anfallende Arachidonsäure unter anderem durch Cytochrom P 450 Enzyme zu einer Epoxyeicosatetraensäure umgewandelt werden. Strukturverwandte Substanzen weisen dabei unterschiedlichste Wirkungen auf [54]. Die Blockade der kardiodepressiven Effekte mittels Indomethacin und NS-398 weisen auf einen Aktivierungsschritt durch die Cyclooxygenase 2 hin. Verschiedenen Metaboliten dieses Enzyms werden protektive Eigenschaften zugeschrieben [58, 59].

Hierbei ist vor allem der Prozess der Präkonditionierung zu beachtenswert. Kurze Perioden ischämischer Ereignisse schützen das Herz während nachfolgender, längerer Ischämiephasen [30, 31]. Es ist eine deutlich geringere Infarktgröße nachweisbar. Der Energieumsatz der Zellen, wie zum Beispiel der Sauerstoffbedarf wird abgesenkt und ultrastrukturelle Veränderungen, welche mit dem Zelltod zu verbinden sind, treten erst verzögert auf. Dabei wird durch verschiedene Studien der COX 2 eine essentielle Rolle bestätigt [64, 136]. Die COX-2 spielt eine wesentliche Rolle bei der Entwicklung des IPC [116] als myokardiale Schutzfunktion.

Dabei handelt es sich bei der COX-2 nicht um ein konstitutives Enzym der Herzmuskelzellen, allerdings wird sie durch kardiale Schäden, wie sie im Rahmen einer Ischämie-Reperfusion auftreten, induziert [137]. Indes vermutet man durch die Induktion der Cyclooxygenase 2 auch schädigende Effekte auf das Myokard zum Beispiel im Sinne der Entwicklung einer Herzinsuffizienz [138].

Während Felix et al [27] von einer direkten Interaktion der negativ ionotropen Substanz mit dem L-Typ Ca^{++} -Kanal ausgeht, deuten die vorliegenden Daten auf einen komplexen Signaltransduktionsprozess hin, der durch den Faktor in der Zelle in Gang gesetzt wird. Shinmura et al [115] unterstützt die Vermutung, dass im Endeffekt die Öffnung von ATP regulierten Kaliumkanälen zur Präkonditionierung beiträgt, deren Öffnung aber durch die Cyclooxygenase 2 vermittelt wird. Einen gleichartigen Ablauf nehmen wir für den hier vorgestellten Mediator ebenfalls an. Ob der hier vorgestellte Mediator einen Einfluss auf die Entwicklung des IPC besitzt, kann aus den bisherigen Daten nicht mit Sicherheit geschlossen werden. Hierzu wären weitere Untersuchungen notwendig.

Es scheint gesichert, dass der ischämische Faktor sowie 17,18 EET nur einen Präkursor der tatsächlich wirksamen Substanz darstellen, welcher innerhalb der Kardiomyozyten mittels COX 2 metabolisiert wird, obwohl andere Studien vorliegen, die eine Beteiligung der Cyclooxygenase am IPC ausschließen [139], oder aber einen Schutzfaktor postulieren, der über die COX metabolisiert wird, ohne Präferenz einer Isoform [59].

Die Verknüpfung von Eicosaensäuren mit der Aktivierung der Cyclooxygenase ist durch andere experimentelle Ansätze bestätigt worden.

Die Studie Carroll et al [140] zeigt am Beispiel der vaskulären Modulation der Niere am Kaninchen, dass aus Arachidonsäure freigesetzte Fettsäuren über die Cyclooxygenase metabolisiert werden und der Effekt mit einer Inhibition durch Indomethacin aufgehoben wird.

Bereits seit längerer Zeit wird die präzise Rolle von Eicosanoiden in der Entwicklung myokardialer Schädigungen während der Ischämie und Reperfusion debattiert [130]. Es scheint gesichert, dass eine erhöhte Produktion eine allgemeine Antwort des Gewebes auf Verletzungen darstellt. Die Produktion von Eicosanoiden erfordert eine vorherige Freisetzung von Arachidonsäure aus Phospholipiden. Sowohl die Ischämie, als auch die Reperfusion sind eng assoziiert mit einem Anstieg der Arachidonsäurelevel in den Membranen [131].

Die Phospholipidzusammensetzung kardialer Zellmembranen ist zum Teil von der Ernährung abhängig [141]. Sie erfährt während einer ischämischen Phase eine starke Veränderung. Diäten, die eine hohe Menge an mehrfach ungesättigten Fettsäuren enthalten, z.B. aus Seefisch beeinflussen direkt das Herz. Sie bewirken außerdem eine verbesserte Sauerstoffutilisation, verbunden mit einer Optimierung der postischämischen Erholung der kontraktilen Funktion.

Mehrfach ungesättigte Fettsäuren der omega-3 Klasse besitzen wie Epoxyeicosaensäuren einen starken antiarrhythmischen Effekt [142]. Es stellt sich die Frage inwieweit, die dabei erbrachten Erkenntnisse auf dem von uns bestimmten Mediator beruhen. Es ist denkbar, dass die Quantität der Freisetzung auch von ernährungsphysiologischen Gesichtspunkten abhängt.

Chen et al [131] beschreibt ebenfalls die Inhibition des kardialen L-Typ Ca^{++} -Kanals durch Epoxyeicosaensäuren als endogenen Schutzmechanismus. Die dadurch vermittelten IPC ähnlichen Wirkungen sind mit der Reaktion der Kardiomyozyten auf die Applikation des 17,18 EET und ischämischen Effluates vergleichbar.

Die Untersuchungen an Mäusen [59, 116], Ratten [115] und Kaninchen [117], sowie die vorliegenden Ergebnisse an isolierten Rattenkardiomyozyten legen die Vermutung nahe, dass die Kardioprotektion der COX 2 nicht speziesspezifisch ist [115].

Die sich an diesen Metabolisierungsweg anschließenden Kaskaden sind noch nicht genau erforscht. Adenosin [18], sowie auch die Proteinkinase C [43], NO [143] und Sauerstoffradikale [45] scheinen zu der Entwicklung eines präkonditionierten Herzens beizutragen [30, 31].

5.3 Einfluss von Inhibitoren kardialer ATP-sensitiver Kaliumkanäle auf die kardiodepressiven Faktoren

Als Endpunkt zeigten die Messungen mit verschiedenen Kaliumkanalblockern, dass eine Wechselwirkung der Rattenkardiomyozyten mit den beschriebenen Mediatoren in einer Öffnung der ATP abhängigen Kaliumkanäle resultiert, denn der depressive Effekt auf die Kontraktilität und den Kalziumtransienten lässt sich durch Glibenclamide und ebenfalls durch Sodium-5-hydroxydecanoate antagonisieren.

Diese Ergebnisse gehen konform mit der Annahme, dass auch diese Kanäle im preconditioning eine bedeutsame Rolle spielen [52].

Glibenclamide und 5-HD sind potente Inhibitoren des ATP-abhängigen kardialen Kaliumkanals [144].

ATP regulierte K^{+} -Kanäle sind bedeutsam für die Regulation des Energiehaushaltes der Zellen, durch ihre Kontrolle der Membranerregbarkeit [101].

Bereits unter Hypoxiebedingungen erfolgt ein Ausstrom von Kaliumionen. Erleiden Myozyten eine Ischämie so werden ATP sensitive K^{+} -Kanäle geöffnet.

Hierbei können die mitochondrialen K_{ATP} -Kanäle aktiviert sein und die normale Permeabilität der äußeren Zellmembran gewährleisten [145].

Durch die Öffnung von K^+ -Kanälen kommt es zu einer Abnahme der Dauer der Aktionspotentials bereits durch einen geringen Abfall des in der Zelle befindlichen ATP. Daher wird die Öffnung von Kaliumkanälen auch für die Entstehung von Arrhythmien und den plötzlichen Herztod verantwortlich gemacht [146, 147].

Die Kanäle sind charakterisiert durch eine starke Inhibition durch ATP allerdings schließen sie auch durch andere Mechanismen wie eine Abnahme des intrazellulären ATP, ein leicht ins saure Milieu verschobener pH-Wert, G-Protein vermittelte Prozesse und die Beeinflussung der Kanalaktivität durch subsarkomere Aktinfilamentnetzwerke sind beschrieben [102]. Die Kaliumkanäle der inneren Mitochondrienmembran sind an der Regulation des Kalziumhaushaltes der Herzmuskelzelle beteiligt [148].

Aimond et al [149] beschreibt eine Untergruppe der ATP regulierten K^+ -Kanäle des Herzens bei Mäusen und Ratten, den I_{TREK} . Dessen Regulation erfolgt neben der Wirkung des ATP durch intrazelluläre Azidose, sowie freie Fettsäuren und Arachidonsäure, wäre also eine mögliche Zielstruktur von Derivaten des Cyclooxygenasestoffwechsels. Die Signaltransduktion involviert ebenfalls die p38 MAPK, die in der Bildung des myokardialen Schutzes eine Rolle spielt [150].

Andere Studien belegen die Öffnung von ATP abhängigen Kaliumkanälen durch Epoxyeicosaensäuren [110, 122]. In einigen Veröffentlichungen [108] wurde 11,12 EET als Antagonist von 17,18 EET beschrieben. Jedoch zeigt auch 11,12 EET eine Modulation von Kaliumkanälen. Vielmehr könnte hier ein partieller Antagonismus vorliegen, der zustande kommt, indem die Kanäle bereits in der Inkubationsphase mit 11,12 EET gesättigt werden.

Die Öffnung der Kaliumkanäle während einer Ischämie kann protektive Wirkung annehmen und ist ebenfalls im Bereich des IPC anzusiedeln [52]. Die Bewertung der in der vorliegenden Arbeit nachgewiesenen Öffnung ATP regulierter Kaliumkanäle in protektive oder schädigende Mechanismen kann noch nicht abschließend vorgenommen werden.

Zwar kann ein Kaliumausstrom aus der Herzmuskelzelle die Entwicklung von Arrhythmien induzieren bzw. bestehende Störungen verschärfen [146, 147] im allgemeinen ist er aber mit einem Schutz vor Zellschäden, einer Beschränkung der Infarktgröße und einer verbesserten kardialen Funktion während der Reperfusion assoziiert [151].

Diese Mechanismen entsprechen dem Preconditioning und werden durch anti-diabetische Sulfonylharnstoffe wie Glibenclamide, Natrium-5-Hydroxydecanoat inhibiert [152]. In diesen Versuchen konnte die Reduktion der Infarktgröße präkonditionierter Hunde durch die Hemmung der K_{ATP} -Kanäle komplett aufgehoben werden.

In einem anderen experimentellen Ansatz wird die Kaliumkanal-Abhängigkeit der Spätphase der Präkonditionierung an Kaninchen beschrieben [153].

Im Besonderen wird die Bedeutung der Aktivierung von Kaliumkanälen von Shigematsu et al [154] hervorgehoben. Wie bereits erwähnt verkürzt die Öffnung der Kaliumkanäle während der Ischämie die Dauer der Aktionspotentials verbunden mit einer Abnahme des Ruhemembranpotentials, sowie der Amplitude des AP. In der Reperfusionphase wird die Aktionspotentialdauer wiederhergestellt, sie bleibt allerdings über einen Zeitraum von 30 min verkürzt.

In unseren Experimenten erreichten wir eine dauerhafte Abnahme der Kontraktilität isolierter Rattenkardiomyozyten für den Zeitraum der Messung, sowie des Kalziumtransienten durch die Applikation von IF bzw. 17,18 EET, während Felix et al [27] einen auswaschbaren Effekt beschreibt. Allerdings sind die Versuchsprotokolle auch unterschiedlich gewählt, denn nach dem hier dargestellten Ansatz erfolgten die Messungen mit Perfusion der Kammern, ohne die Substanz im nachhinein wieder aus der Messkammer zu entfernen. Man kann davon ausgehen, dass die Reaktionen ebenfalls reversibel sind. Unter Verabreichung der Kaliumkanalblocker waren keine kardiodepressiven Effekte mehr nachweisbar.

Im Ansatz von Shigematsu et al [154] mit Glibenclamide ist während der Ischämiephase eine geringere Verkürzung der APD zu verzeichnen, ferner dessen Wiederherstellung in der Reperfusion deutlich erleichtert. Erfolgte die Applikation des Medikamentes erst zu Beginn der Reperfusion, so zeigte sich eine beschleunigte Erholung der Aktionspotentialdauer.

Daraus kann eine Aktivierung kardialer ATP-abhängiger Kaliumkanäle während der Ischämie, als auch in der ersten Phase der Reperfusion geschlossen werden. Dieser Mechanismus beugt der Entwicklung des Stunning vor, beziehungsweise ist in der Lage einen Zustand myokardialer Dysfunktion zu mindern [53]. Stunning wird durch die Verfügbarkeit des Kalziums und durch die Schwere der Ischämie begrenzt.

So reduziert eine Superfusion des Herzens mit einer Lösung geringen Kalziumgehaltes das Phänomen [79], als auch die Hemmung der Ca^{++} -ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums (SERCA) kann den Schweregrad des Stunning herabsetzen [80].

Kaliumkanalöffner wie Aprikalim, Nicorandil, Diazoxide und Cromakalim verbessern die Erholung der kontraktile Funktion des "stunned myocardium" [155] und sind durch einen Antagonisten wie Glibenclamide blockierbar. Dabei wird nicht vorrangig die hämodynamische Situation optimiert oder die Kollateralversorgung rekrutiert, vielmehr handelt es sich um direkte Effekte, die auch in unseren Experimenten an Einzelzellen nachvollziehbar sind.

Minoxidilsulfat (MNXS) benutzte Hayashi et al [156] für ihre Untersuchung zur Verkürzung der Aktionspotentialdauer. Als Kaliumkanalöffner produziert die Substanz eine Drosselung der APD, ohne Beeinflussung des Ruhemembranpotentials. Diese Reaktion ist, wie in der vorgelegten Studie nachvollziehbar dosisabhängig und zum Teil durch Glibenclamide antagonisierbar. Interessanterweise blockiert MNXS ebenso den L-Typ Kalziumkanal, wobei Glibenclamide diesen Effekt nicht verhindert.

Die Beobachtung der Abnahme der Aktionspotentialdauer wird also durch eine Kombination aus Aktivierung des kardialen ATP sensitiven Kaliumkanals und die Blockade des kardialen L-Typ Ca^{++} -Kanals verursacht.

Einen ähnlichen Mechanismus lassen die bisherigen Ergebnisse für den ischämischen Mediator und das 17,18-EET vermuten, denn zumindest für den postischämisch freigesetzten negativ ionotropen Faktor ist eine Hemmung des L-Typ Kalziumkanals bestätigt [27].

In den abgeschlossenen Versuchsreihen steht die komplette Hemmbarkeit der depressiven Wirkungen mittels Inhibition der ATP sensitiven Kaliumkanäle der partiellen antagonistischen Wirkung von Glibenclamide auf Minoxidilsulfat gegenüber.

Möglicherweise liegt diesem Befund ein anderer experimenteller Ansatz zugrunde, denn während die beschriebenen Versuche an isolierten feldstimulierten Rattenkardiomyozyten abliefen, verwendete Hayashi et al [156] die Patch-Clamp-Technik an ventrikulären Meerschweinchenmyozyten. Unter Umständen interagiert Glibenclamide in der verabreichten Dosis auch mit anderen Zellstrukturen.

Im Allgemeinen wäre auch eine partiell erhaltene Wirksamkeit der Mediatoren zu erwarten, da verschiedene Zielstrukturen vorliegen, die durch Kaliumkanalblocker nicht homogen beeinflusst werden. Im Gegensatz zur Inhibition der kardio-depressiven Wirkung des ischämischen Effluates und 17,18-EET durch die Ausschaltung der Cyclooxygenase, welche die Bildung des aktiven Metaboliten verhindert, können hier durchaus Mediatoren an die Zielstrukturen binden und Effekte verursachen.

Eine Verbindung zwischen der Cyclooxygenase und K_{ATP} -Kanälen zeigt eine Studie von Grover et al [157]. Dabei erbrachte die Applikation von Cromakalim mit der bewirkten Öffnung ATP abhängiger Kaliumkanäle einen Präkonditionierungseffekt, der durch den COX-Inhibitor Meclofenamate verhindert werden konnte. Allerdings geht man hier von einer Blockade unabhängig von der Cyclooxygenasehemmung aus. Vielmehr erfolgt eine Inhibition der ATP regulierten Kaliumkanäle. In dieser Wirkung ähnelt die Substanz den verwendeten Kaliumkanalöffnern Glibenclamide und Natrium-5-hydroxydecanoate, die in der Lage sind, der von IF/17,18-EET produzierten Verminderung der Kontraktilität und der negativen Beeinflussung des Kalziumtransienten entgegenzuwirken.

5.4 Limitationen und Ausblick

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Bestimmung der Signaltransduktionskaskade, welche durch die Applikation postischämisch freigesetzter Mediatoren an Kardiomyozyten abläuft. Es erscheint möglich, dass 17,18 EET dem wirksamen Bestandteil des postischämischen Effluates entsprechen könnte.

Die Untersuchungen weisen darauf hin, dass der Mediator erst im Kardiomyozyten durch die Cyclooxygenase 2 in das wirksame Derivat umgewandelt wird, es sich also bei 17,18 EET/IF um einen Präkursor dieser Substanz handelt.

Der sicht- und messbare Effekt des Faktors in Form einer Verminderung der Kontraktilität und einer Abnahme des Kalziumtransienten wird durch die Beeinflussung verschiedener Zielstrukturen gewährleistet.

Die verwendeten Medikamente für die Interaktionsversuche greifen daher an verschiedenen Punkten an. So bedeutet eine Unterbrechung der Kaskade durch Indomethacin bzw. NS-398, dass der Mediator in der Zelle gar keine wirksame Form annehmen kann.

Im Gegensatz dazu steht die Hemmung der Kaliumkanäle ganz am Ende, so dass andere Zielstrukturen, die durch Glibenclamide oder Natrium-5-hydroxydecanoate nicht inhibiert werden, durchaus beeinflusst werden könnten. So wäre eine Darstellung der Blockierung des L-Typ Ca^{++} -Kanals durchaus denkbar und bietet über diese Arbeit hinaus Forschungsbedarf.

Eine genaue Charakterisierung mit selektiven Kaliumkanalblockern kann zur weiteren Aufklärung des Wirkungsmechanismus beitragen. Hierzu wäre zum Beispiel die Beurteilung der Aktivität sarkolemmaler und mitochondrialer Kaliumkanäle interessant.

Zahlreiche Untersuchungen bestätigen zwar die Beteiligung der K_{ATP} -Kanäle [158], allerdings herrscht kein Konsens über den Anteil mitochondrialer und oberflächlicher Strukturen [54, 56, 159]. Der hier verwendete Antagonist mitochondrialer K_{ATP} -Kanäle Natrium-5-hydroxydecanoate wurde in einigen Veröffentlichungen [54] nicht als selektiv angesehen.

Der direkt klinische Bezug zum Patienten ist erst durch Studien zu belegen, hier sollte zunächst bestätigt werden, dass die beobachtbaren Veränderungen infolge ischämischer Ereignisse in analoger Weise ablaufen. Hierfür gibt es bereits einige Hinweise [39].

Gerade der Einsatz von Kaliumkanalöffnern wird in der Literatur vielfältig diskutiert. Die Verfügbarkeit entsprechender Medikamente wie Nicorandil ist ein wesentlicher Faktor.

Die Therapie mit Kaliumkanalöffnern könnte zu dem Zustand eine permanenten chemischen Präkonditionierung führen und damit die Widerstandsfähigkeit des Herzens gegenüber Sauerstoffmangel erhöhen [160] und in einem geringeren Gewebeschaden während akuter myokardialer Ereignisse resultieren. Beschränkend wirken hier auch die unterschiedlichen Aussagen zu der Induktion von Arrhythmien. Zum einen erhöht die extrazelluläre Akkumulation von Kaliumionen durch den Ausstrom aus den Herzmuskelzellen die Gefahr einer Arrhythmie [146, 147], zum anderen wirken Kaliumionen antiarrhythmisch, sobald diese durch Störungen der Repolarisation verursacht sind [106].

Lange Zeit wurde die Cyclooxygenase 2 nur in Verbindung mit „schädlichen“ Reaktionen gebracht und die pharmakologische Forschung war bemüht selektive COX 2 blockierende Medikamente herzustellen. Inzwischen muss diese Meinung, nicht nur aufgrund der vorliegenden Arbeit revidiert werden.

Die Rekrutierung dieses Enzyms während der Spätphase des IPC und dem damit hervorgerufenen Schutz gegen Stunning und Infarkt verdeutlicht die Bedeutsamkeit der COX 2 für die Adaptation des Herzens an Stress [136]. Verschiedene Mechanismen tragen dazu bei. So ist eine Verstärkung myokardialer Dysfunktion durch die Inhibition der Cyclooxygenase beschrieben und die Protektion wird über den Weg des Prostacyclin vermutet, während Li et al [64] die initiale Induktion der NO-Synthase schildert und die COX 2 später in die Signaltransduktion eingeschaltet wird.

Ob es sich bei den dargestellte Mediatoren um Effektoren des IPC handelt, kann aufgrund der unterschiedlichen Versuchsanordnungen nicht gesagt werden. Dazu wäre eine Sequenz von Ischämiephasen und die Untersuchung der dabei jeweils entstehenden Substanzen notwendig.

Während der Ischämie und Reperfusion des Herzens entstehen eine Vielzahl von Mediatoren mit unterschiedlichen Zielstrukturen und Wirkmechanismen. Die vorgelegte Arbeit kann zum Verständnis der ablaufenden Prozessen beitragen, sowie wichtige Impulse zur möglichst kausalen Therapie liefern.

6. Zusammenfassung

Diese Arbeit charakterisiert endogen entstehende kardiodepressiven Mediatoren, die in der Reperfusionsphase des ischämischen Myokard freigesetzt werden sowie die Epoxyeicosatetraensäure 17,18 hinsichtlich ihrer Funktion. Dabei liegt besonderes Augenmerk auf der intrazellulären Signaltransduktionskaskade.

Die Gewinnung des ischämischen Effluates erfolgte durch Reperfusion eines isolierten Rattenherzens für 30 s, nach einer 10minütigen Ischämiephase.

Wir prüften den Effekt des Effluates und seiner Derivate sowie in einer zweiten Versuchsreihe der Epoxyeicosatetraensäure 17,18 auf Zellkontraktion und Kalziumtransient isolierter Rattenherzmuskelzellen in Interaktionsversuchen mit Inhibitoren der Cyclooxygenase unter Verwendung von Indomethacin, SC-560 und NS-398 sowie Hemmstoffen ATP-abhängiger Kaliumkanäle mit Glibenclamide und Natrium-5-hydroxydecanoate unter Nutzung eines Fluoreszenzmikroskops. Für die Interaktionsversuche inkubierten die Zellen jeweils zuerst mit dem Medikament bevor die zu testende Substanz dazugegeben wurde.

Außerdem wurde 17,18 EET auf die Wirksamkeit der Regioisomere 17r,18s EET und 17s,18r EET untersucht.

Das ischämische Effluat sowie dessen aufgereinigte Derivate bewirken eine konzentrationsabhängige Abnahme der Zellverkürzung und des Kalziumtransienten feldstimulierter isolierter Kardiomyozyten. Der Effekt ist durch Applikation eines unselektiven COX-Inhibitors, hier Indomethacin signifikant abzuschwächen, ebenfalls durch den selektiven COX-2-Inhibitor NS-398, nicht aber durch die selektive Blockade der COX 1 mit SC-560. Einen ähnlichen Effekt erreicht man durch Inkubation der Zellen mit Glibenclamide und dem Inhibitor der mitochondrialen K_{ATP} -Kanäle Natrium-5-hydroxydecanoate, deren Applikation die Reduktion der Zellkontraktion und der Kalziumtransienten signifikant vermindert.

17,18 EET verursacht analog eine dosisabhängige Verminderung der Kontraktibilität und des Kalziumtransienten der Herzmuskelzellen. 17r,18s EET erwies sich als wirksamer Bestandteil des Racemates. Die kardiodepressive Wirkung von 17,18 EET konnte durch Inkubation der Zellen mit Indomethacin und NS-398 aufgehoben werden, wohingegen SC-560 keinen Einfluss zeigte. Nach Inkubation der Myozyten mit Inhibitoren der ATP regulierten Kaliumkanäle, ließen sich keine kardiodepressiven Effekte mehr nachweisen.

Negativ inotrope Substanzen, die vom postischämischen Myokard freigesetzt werden reduzieren den Kalziumtransienten und die Zellverkürzung isolierter Rattenherzmuskelzellen über einen Cyclooxygenase-2-abhängigen Metabolismus sowie durch die Öffnung ATP regulierter Kaliumkanäle. Es erscheint möglich, dass 17,18 EET dem wirksamen Bestandteil des postischämischen Effluates entsprechen könnte.

Ob die hier vorgestellten Mechanismen in analoger Weise bei Myokardischämien des Menschen ablaufen ist erst durch klinische Studien zu belegen.

7. Literaturnachweis

1. World Health Report,
<http://www.who.int/dietphysicalactivity/publications/facts/cvd/en/> 2003:
16.08.2005
2. Moens AL, Claeys MJ, Timmermans JP, Vrints CJ. Myocardial ischemia/reperfusion-injury, a clinical view on a complex pathophysiological process. *Int J Cardiol* 2005. 100(2):179-90
3. Riede UN, Ihling C and Schaefer HE. *Arterien* 4 ed. Pathologie. ed. Schaefer HE, Riede UN 1999; Stuttgart; Thieme Verlag:437-60
4. Felix SB, Stangl V, Meyer R, Berndt T, Kastner R, Wernecke KD, Baumann G. Cardiodepressive mediators are released after ischemia from an isolated heart: Role of coronary endothelial cells. *JACC* 1997. 29 No. 6:1390-6
5. Ramaciotti C, McClellan G, Sharkey A, Rose, Weisberg, Winegard S. Cardiac endothelial cells modulate contractility of rat heart in response to oxygen tension and coronary flow. *Circ Res* 1993. 72:1044-64
6. Solaro RJ, Van Eyk JE, Powers F, Law W, Larue C, Hodges RS. Breakdown and release of myofilament proteins during ischemia and ischemia/reperfusion in rat hearts: identification of degradation products and effects on the pCa- force relation. *Circ Res* 1998. 82(2):261-71
7. Bolli R. Mechanism of myocardial "stunning". *Circ* 1990. 82:723-38
8. Opie LH. Role of calcium and other ions in reperfusion injury. *Cardiovasc Drugs Ther*, 1991. 5(Suppl 2):237-47
9. Koss KL and Kranias EG. Phospholamban : a prominent regulator of myocardial contractility. *Circ Res* 1996. 79(6):1059-63
10. Node K, Kitakaze M, Kosaka H, Komamura K, Minamino T, Inoue M, Tada M, Hori M, Kamada T. Increased release of NO during ischemia reduces myocardial contractility and improves metabolic dysfunction. *Circ* 1996. 93:356-64
11. Mubagwa K and Flameng W. Adenosine, adenosine receptors and myocardial protection: an updated overview. *Cardiovasc Res* 2001. 52:25-39
12. Maddock HL, Mocanu MM and Yellon DM. Adenosine A(3) receptor activation protects the myocardium from reperfusion/reoxygenation injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002. 283:H1307-13

13. De Windt LJ, Willems J, Roemen TH, Coumans WA, Reneman RS, Van Der Vusse GJ. Ischemic-reperfused isolated working mouse hearts: membrane damage and type IIA phospholipase A2. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001. 280:H2572-80
14. Ambrosio G, Flaherty JT, Duilio C, Tritto I, Santoro G, Elia PP, Condorelli M, Chiariello M. Oxygen radicals generated at reflow induce peroxidation of membrane lipids in reperfused hearts. *J Clin Invest* 1991. 87:2056-66
15. Gowda RM, Khan IA, Vasavada BC, Sacchi TJ. Reversible myocardial dysfunction: basics and evaluation. *Int J Cardiol* 2004. 97(3):349-53
16. Bolli R. Oxygen derived free radicals and myocardial reperfusion injury: an overview. *Cardiovasc Drug Ther*, 1991. 5: p. 249-68
17. Paulus WJ, Vantrimpont PJ and Shah AM. Acute effects of nitric oxide on left ventricular relaxation and diastolic distensibility in humans. *Circ Res* 1994. 89:2070-8
18. Kitakaze M, Hori M and Kamada T. Role of adenosine and its interaction with alpha adrenoceptor activity in ischemic and reperfusion injury of the myocardium. *Cardiovasc Res* 1993. 7:18-27
19. Paulus WJ. Endothelial control of vascular and myocardial function in heart failure. *Cardiovasc Drug Ther* 1994. 8:437-46
20. Evans HG, Lewis MJ and Shah AJ. Modulation of myocardial relaxation by basal release of endothelin from endocardial endothelium. *Cardiovasc Res* 1994. 28:1694-99
21. Felix SB, Stangl V, Frank TM, Harms C, Berndt T, Kastner R, Baumann G. Release of a stable cardiodepressant mediator after myocardial ischemia during reperfusion. *Cardiovasc Res* 1997. 35:68-79
22. Hearse DJ and Bolli R. Reperfusion induced injury: manifestations, mechanisms and clinical relevance. *Cardiovasc Res* 1992. 26(2):101-8
23. Solaro RJ and Rarick HM. Troponin and tropomyosin: proteins that switch on and in the activity of cardiac myofilaments. *Circ Res* 1998. 83(5):471-80
24. Halestrap AP, Clarke SJ and Javadov SA. Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion-a target for cardioprotection. *Cardiovasc Res* 2004. 61:372-85
25. Hausenloy D, Wynne A, Duchon M, Yellon D. Transient mitochondrial permeability transition pore opening mediates preconditioning induced protection. *Circ* 2004. 109:1714-7

26. Zucchi R, Ronca-Testoni S, Yu G, Galbani P, Ronca G, Mariani M. Postischemic changes in cardiac sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ channels: A possible mechanism of ischemic preconditioning. *Circ Res* 1995. 76(6):1049-56
27. Felix SB, Stangl V, Baumann G, Stangl K. Soluble substances released from postischemic perfused rat hearts reduce Calcium transients and contractility by blocking the L-type Calcium channel. *JACC* 2001. 37 No.2:735-1097
28. Hove-Madsen L, Mery PF, Jurevicius J, Skeberdis AV, Fischmeister R. Regulation of myocardial calcium channels by cyclic AMP metabolism. *Basic Cardiol Res* 1996. 91(Suppl 2):1-8
29. Mery PF, Lohmann SM, Walter U, Fischmeister R. Ca²⁺ current is regulated by cyclic GMP-dependent protein kinase in mammalian cardiac myocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991. 88:1197-201
30. Kloner RA and Jennings RB. Consequences of brief ischemia: Stunning, Preconditioning and their clinical implications: Part 1. *Circ* 2001. 104(24):2981-9
31. Kloner RA, Jennings RB and Rasmussen MM. Consequences of brief ischemia: stunning, preconditioning, and their clinical implications: Part 2. *Circ* 2001. 104(25):3158-67
32. Yellon DM and Downey JM. Preconditioning the myocardium: from cellular physiology to clinical cardiology. *Physiol Rev* 2003. 83(4):1113-51
33. Selivanov VA, Alekseev AE, Hodgson DM, Dzeja PP, Terzic A. Nucleotide-gated KATP channels integrated with creatine and adenylatekinases: amplification, tuning and sensing of energetic signals in the compartmentalized cellular environment. *Mol Cell Biochem* 2004. 256-257(1-2):243-56
34. Dzeja PP, Holmuhamedov EL, Ozcan C, Pucar D, Jahangir A, Terzic A. Mitochondria: gateway for cytoprotection. *Circ Res* 2001. 89:744-6
35. Pang CY, Neligan P, Xu H, He W, Zhong A, Hopper R. Role of ATP-sensitive K⁺ channels in ischemic preconditioning of skeletal muscle against infarction. *Am J Physiol* 1997. 273:H44-51

36. Liu D, Lu C, Wan R, Auyeung WW, Mattson MP. Activation of mitochondrial ATP-dependent potassium channels protects neurons against ischemia-induced death by a mechanism involving suppression of Bax translocation and cytochrome c release. *J Cereb Blood Flow Metab* 2002. 22(4):431-43
37. Cochrane J, Williams BT, Banerjee A, Harken AH, Burke TJ, Cairns CB. Ischemic preconditioning attenuates functional, metabolic, and morphologic injury from ischemic acute renal failure in the rat. *Ren Fail* 1999. 21:135-45
38. Jaeschke H. Molecular mechanisms of hepatic ischemia-reperfusion injury and preconditioning. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003. 284:G15-26
39. Tomai F, Crea F, Chiariello L, Gioffre PA. Ischemic preconditioning in humans: models, mediators, and clinical relevance. *Circ* 1999. 100(5):559-63
40. Bolli R. The late phase of preconditioning. *Circ Res* 2000. 87(11):972-83
41. Kirsch GE, Codina J, Birnbaumer L, Brown AM. Coupling of ATP-sensitive K channels to A1- receptors by G-proteins in rat ventricular myocytes. *Am J Physiol.*, 1990. 259(3 Pt 2):H820-6
42. Banda S, Asanuma H, Tsukamoto O, Minamino T, Node K, Takashima S. Protein kinase A as another mediator of ischemic preconditioning independent of protein kinase C. *Circ* 2004. 110:51-7
43. Mitchell MB, Meng X, Ao L, Brown JM, Harken AH, Banerjee A. Preconditioning of isolated rat heart is mediated by protein kinase C. *Circ Res* 1995. 76:73-81
44. Ballard-Croft C, Kristo G, Yoshimura Y, Reid E, Keith BJ, Mentzer Jr. RM. Acute adenosine preconditioning is mediated by p38 MAPK activation in discrete subcellular compartments. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005. 288:H1359-66
45. Becker LB. New concepts in reactive oxygen species and cardiovascular reperfusion physiology. *Cardiovasc Res* 2004. 61:461-70
46. Vanden Hoek TL, Becker LB, Shao Z, Li C, Schumacker PT. Reactive oxygen species released from mitochondria during brief hypoxia induce preconditioning in cardiomyocytes. *J Biol Chem* 1998. 273:18092-8
47. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*, 2002. 82(1):47-95

48. Brustovetsky N, Tropschug M, Heimpel S, Heidkamper D, Klingenberg M. A large Ca²⁺-dependent channel formed by recombinant ADP/ATP carrier from *Neurospora crassa* resembles the mitochondrial permeability transition pore. *Biochemistry* 2002. 41:11804-11
49. Tonkovic-Capin M, Gross GJ, Bosnjak ZJ, Tweddell JS, Fitzpatrick CM, Baker JE. Delayed cardioprotection by isoflurane: role of K_{ATP} channels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002. 283(1):H61-8
50. Forbes RA, Steenbergen C and Murphy E. Diazoxide-induced cardioprotection requires signaling through a redox-sensitive mechanism. *Circ Res* 2001. 88(8):802-9
51. Cohen MV, Yang XM, Liu GS, Heusch G, Downey JM. Acetylcholine, bradykinin, opioids, and phenylephrine, but not adenosine, trigger preconditioning by generating free radicals and opening mitochondrial K(ATP) channels. *Circ Res* 2001. 89:273-8
52. Auchampach JA, Maruyama M and Gross GJ. Cardioprotective actions of potassium channel openers. *Eur Heart J* 1994. 15 Suppl C:88-94
53. Tang W, Weil MH, Sun S, Pernat A, Mason F. K_{ATP} channel activation reduces the severity of post resuscitation myocardial dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000. 279(4):H1609-15
54. Hanley PJ and Daut J. K(ATP) channels and preconditioning: a re-examination of the role of mitochondrial K(ATP) channels and an overview of alternative mechanisms. *J Mol Cell Cardiol* 2005. 39(1):17-50
55. Baczko I, Giles WR and Light PE. Pharmacological activation of plasmamembrane K_{ATP} channels reduces reoxygenation-induced Ca²⁺ overload in cardiac myocytes via modulation of the diastolic membrane potential. *Br J Pharmacol* 2004. 141(6):1059-67
56. Budas GR, Jovanovic S, Crawford RM, Jovanovic A. Hypoxia induced preconditioning in adult stimulated cardiomyocytes is mediated by the opening and trafficking of sarcolemmal K_{ATP} channels. *FASEB J* 2004. 18(9):1046-8
57. Oldenburg O, Yang XM, Krieg T, Garlid KD, Cohen MV, Grover GJ, Downey JM. P1075 opens mitochondrial K(ATP) channels and generates reactive oxygen species resulting in cardioprotection. *J Mol Cell Cardiol* 2003. 35(9):1035-42

58. Shinmura K, Xuan YT, Tang XL, Kodani E, Han H, Zhu Y. Inducible nitric oxide synthase modulates cyclooxygenase-2 activity in the heart of conscious rabbits during the late phase of ischemic preconditioning. *Circ Res* 2002. 90:602-8
59. Camitta MG, Gabel SA, Chulada P, Bradbury JA, Langenbach R, Zeldin DC. Cyclooxygenase-1 and -2 knockout mice demonstrate increased cardiac ischemia/reperfusion injury but are protected by acute preconditioning. *Circ* 2001. 104:2453-8
60. Saito T, Rodger IW, Hu F, Robinson R, Huynh T, Giaid A. Inhibition of COX pathway in experimental myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol* 2004. 37(1):71-7
61. Gross GJ, Falck JR, Gross ER, Isbell M, Moore J, Nithipatikom K. Cytochrome P450 and arachidonic acid metabolites: Role in myocardial ischemia/reperfusion injury revisited. *Cardiovasc Res* 2005. 68(1):18-25
62. Vegh A, Szekeres L and Parratt JR. Protective effects of preconditioning of the ischaemic myocardium involve cyclooxygenase products. *Cardiovasc Res* 1990. 24(12):1020-3
63. Dawn B, Xuan YT, Guo Y, Rezazadeh A, Stein AB, Hunt G, Wu WJ, Tan W, Bolli R. IL-6 plays an obligatory role in late preconditioning via JAK-STAT signaling and upregulation of iNOS and COX-2. *Cardiovasc Res* 2004. 64(1):61-71
64. Li Q, Guo Y, Xuan YT, Lowenstein CJ, Stevenson SC, Prabhu SD, Wu WJ, Zhu Y, Bolli R. Gene therapy with inducible nitric oxide synthase protects against myocardial infarction via a cyclooxygenase-2-dependent mechanism. *Circ Res* 2003. 92(7):741-8
65. Ross J Jr. Myocardial perfusion-contraction matching: Implication for coronary heart disease and hibernation. *Circ* 1991. 83(3):1076-83
66. Bito V, Heinzel FR, Weidemann F, Dommke C, van der Velden J, Verbeke E, Claus P, Bijnens B, De Scheerder I, Stienen GJ, Sutherland GR, Sipido KR. Cellular mechanisms of contractile dysfunction in hibernating myocardium. *Circ Res* 2004. 94(6):794-801
67. Luss H, Meissner A and Rolf N. Biochemical mechanism(s) of stunning in conscious dogs. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000. 279(1):H176-84.
68. Schulz R, Rose J, Martin C, Brodde OE, Heusch G. Development of short term myocardial hibernation: its limitation by the severity of ischemia and ionotropic stimulation. *Circ* 1993. 99(2):684-95

69. Depre C, Kim SJ, John AS, Huang Y, Rimoldi OE, Pepper JR, Dreyfus GD, Gaussin V, Pennell DJ, Vatner DE, Camici PG, Vatner SF. Program of cell survival underlying human and experimental hibernating myocardium. *Circ Res* 2004. 95(4):433-40
70. Rahimtoola SH. Concept and evaluation of hibernating myocardium. *Annu Rev Med* 1999. 50:75-86
71. Heusch G, Schulz R and Rahimtoola SH. Myocardial hibernation: a delicate balance. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005. 288(3):H984-99
72. Rahimtoola SH. The hibernating myocardium. *Am Heart J*, 1989. 117(1):211-21
73. Camici PG, Wijns W, Borgers M, De Silva R, Ferrari R, Knuuti J, Lammertsma AA, Liedtke AJ, Paternostro G, Vatner SF. Pathophysiological mechanisms of chronic reversible left ventricular dysfunction due to coronary artery disease (hibernating myocardium). *Circ* 1997. 96(9):3205-14
74. Eberli FR. Stunned myocardium-an unfinished puzzle. *Cardiovasc Res* 2004. 63(2):189-91
75. Bolli R and Marban E. Molecular and cellular mechanisms of myocardial stunning. *Physiol Rev* 1999. 79(2):609-34
76. Camici PG and Rimoldi OE. The contribution of hibernation to heart failure. *Ann Med* 2004. 36(6):440-7
77. Shattock MJ. Myocardial stunning: do we know the mechanism? *Basic Res Cardiol* 1997(Suppl 2):18-22
78. Kim SJ, Depre C and Vatner SF. Novel mechanisms mediating stunned myocardium. *Heart Fail Rev* 2003. 8(2):143-53
79. Opie LH. Myocardial stunning- we do not know the mechanisms nor is there "overwhelming evidence" for a major role of free radicals. *Basic Res Cardiol* 1998. 93(3):152-5
80. Opie LH and du Toit EF. Inhibitors of Ca²⁺-ATPase pump of sarcoplasmic reticulum attenuate reperfusion stunning in isolated rat hearts. *J Cardiovasc Pharm* 1994. 24(4):678-84
81. Van Eyk JE and Murphy AM. The role of troponin abnormalities as a cause for stunned myocardium. *Coron Artery Dis* 2001. 12(5):343-7

82. McDonald KS, Moss RL and Miller WP. Incorporation of the troponin regulatory complex of post-ischemic stunned porcine myocardium reduces myofilament calcium sensitivity in rabbit psoas skeletal muscle fibers. *J Mol Cell Cardiol* 1998. 30(2):285-96
83. Krause SM, Jacobus WE and Becker LC. Alterations in cardiac sarcoplasmic reticulum calcium transport in the postischemic "stunned" myocardium. *Circ Res* 1989. 65(2):526-30
84. Opie LH and Sack MN. Metabolic plasticity and the promotion of cardiac protection in ischemia and ischemic preconditioning. *J Mol Cell Cardiol* 2002. 34(9):1077-89
85. Feng J, Schaus BJ, Fallavollita JA, Lee TC , Canty JM Jr. Preload induces troponin I degradation independently of myocardial ischemia. *Circ* 2001. 103(16):2035-7
86. Foster DB, Noguchi T, Van Buren P, Murphy AM, Van Eyk JE. Cterminal truncation of cardiac troponin I causes divergent effects on ATPase and force: implications for the pathophysiology of myocardial stunning. *Circ Res* 2003. 93(10):917-24
87. Colantonio DA, Van Eyk JE and Przyklenk K. Stunned peri-infarct canine myocardium is characterized by degradation of T Troponin, not Troponin I. *Cardiovasc Res* 2004. 63:217-25
88. Riede UN, Drexler H. Herzleistungsstörungen. 4 ed. Allgemeine und spezielle Pathologie, ed. Schaefer HE, Riede UN. 1999, Stuttgart: Thieme Verlag. 480-95
89. Zannad F, Briancon S, Juilliere Y, Mertes PM, Villemot JP, Alla F, Virion JM. Incidence, clinical and etiologic features, and outcomes of advanced chronic heart failure: the EPICAL Study. *Epidemiologie de l'Insuffisance Cardiaque Avancee en Lorraine. J Am Coll Cardiol*, 1999. 33(3):734-42
90. Zhang Q, Shen W, Zhang R, Zhang J, Hu J, Zhang X. Primary intracoronary stenting in comparison with intravenous rt-PA thrombolysis plus rescue intracoronary intervention in patients with acute myocardial infarction. *Chin Med J* 2002. 115(2):163-5
91. Stammen F, De Scheerder I, Glazier JJ, Van Lierde J, Vrolix M, Willems JL, De Geest H, Piessens J. Immediate and follow-up results of the conservative coronary angioplasty strategy for unstable angina pectoris. *Am J Cardiol* 1992. 69(19):1533-7

92. Peiper U, Muskulatur. 2 ed. Lehrbuch der Physiologie, ed. Klinker R and Silbernagel S. 1996, Stuttgart: Thieme Verlag. 79-104
93. Reuter H. Voltage dependent mechanisms for raising intracellular free calcium concentration: Calcium channels. Ciba Found Symp 1986. 122:5-22
94. Carafoli E. The intracellular homeostasis of Calcium: an overview. Ann N Y Acad Sci 1988. 551:147-57
95. Negretti N, O'Neill SC and Eisner DA. The relative contributions of different intracellular and sarcolemmal systems to relaxation in rat ventricular myocytes. Cardiovasc Res 1993. 27(10):1826-30
96. Vornanen M, Shepherd N and Isenberg G. Tension-voltage relations of single myocytes reflect CA release triggered by Na/Ca exchange at 35° C but not 23° C. Am J Physiol 1994. 267(2 Pt 1):C623-32
97. Tada M and Katz AM. Phosphorylation of the sarcoplasmic reticulum and sarcolemmal. Annu Rev Physiol 1982. 44:401-23
98. Levi RC, Alloatti G and Fischmeister R. Cyclic GMP regulates Ca-Channel current in Guinea pig ventricular myocytes. Pflug Arch 1989. 413(6):685-7
99. Zhang R, Zhao J and Potter JD. Phosphorylation of both serine residues in cardiac troponin I is required to decrease the Ca²⁺ affinity of cardiac troponin C. J Biol Chem 1995. 270(51):30773-80
100. Edwards G and Weston AH. Recent advances in potassium channel modulation. Prog Drug Res 1997. 49:93-121
101. Noma A. ATP-regulated K⁺ channels in cardiac muscle. Nature 1983. 305(5939):147-8
102. Terzic A and Kurachi Y. Actin myofilament disrupters enhance K(ATP) channel opening in patches from Guinea-pig cardiomyocytes. J Physiol 1996. 492(Pt 2):395-404
103. Longman SD and Hamilton TC. Potassium channel activator drugs: mechanisms of action, pharmacological properties and therapeutical potential. Med Res Rev 1992. 12(2):73-148
104. Holmuhamedov EL, Wang L and Terzic A. ATP-sensitive K⁺ channel openers prevent Ca²⁺ overload in rat cardiac mitochondria. J Physiol (London) 1999. 1(519 Pt 2):347-60
105. Okada K, Yanigasawa T and Taira N. (Iemikalim)-induced hyperpolarisation reduces the sensitivity to Ca of contractile elements in

- canine coronary artery. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1993. 347:438-44
106. Tosaki A, Szerdahelyi P, Engelman RM, Das DK. Potassium channel openers and blockers-do they possess proarrhythmic or antiarrhythmic activity in ischemic and reperfused rat hearts. *J Pharmacol Exp Ther* 1993. 267:1355-62
 107. D'Alonzo AJ and Grover GJ. Potassium channel openers are unlikely to be proarrhythmic in the diseased human heart. *Cardiovasc Res* 1994. 28(6):924-5
 108. Lauterbach B, Honeck H and Schunck WH. Cytochrome P450 dependent eicosapentanoic acid metabolites are novel BK channel activators. *Hypertension* 2002. 39(2 Pt 2):609-13
 109. Li PL, Zhang DX, Ge ZD, Campbell WB. Role of ADP-ribose in 11,12-EET-induced activation of K(Ca) channels in coronary arterial smooth muscle cells (CASMC). *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002. 282(4):H1229-36
 110. Lu T, Hoshi T, Weintraub NL, Spector AA, Lee HC. Activation of ATP-sensitive K⁺ channels by epoxyeicosatrienoic acids in rat cardiac ventricular myocytes. *J Physiol* 2001. 537(Pt):811-27
 111. Moffat MP, Ward CA, Bend JR, Mock T, Farhangkhoei P, Karmazyn M. Effects of epoxyeicosatrienoic acids on isolated hearts and ventricular myocytes. *Am J Physiol* 1993. 264(4 pt 2):H1154-60
 112. Auchampach JA and Gross GJ. Anti-ischemic action of potassium channel openers in experimental myocardial Ischemia/reperfusion injury in dogs. *Eur Heart J* 1993. 14 Suppl B:10-5
 113. Karmazyn M. Synthesis and relevance of cardiac eicosanoids with particular emphasis on ischemia and reperfusion. *Can J Physiol Pharmacol* 1989. 67(8):912-21
 114. Martin M, Meyer-Kirchrath J, Kaber G, Jacoby C, Flogel U, Schrader J, Ruther U, Schror K, Hohlfeld T. Cardiospecific overexpression of the prostaglandin EP3 receptor attenuates ischemia-induced myocardial injury. *Circ* 2005. 112(3):400-6
 115. Shinmura K, Nagai M, Tamaki K, Tani M, Bolli R. COX-2-derived prostacyclin mediates opioid-induced late phase of preconditioning in isolated rat hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002. 283(6):H2534-43

116. Shinmura K, Guo Y, Tang XL, Wu WJ, Bao W, Bolli R. Evidence for an essential role of cyclooxygenase-2 as a mediator of the late phase of ischemic preconditioning in mice. *Basic Res Cardiol* 2000. 95(6):479-84
117. Shinmura K, Tang X L, Wang Y, Xuan Y T, Liu S Q, Takano H. Cyclooxygenase-2 mediates the cardioprotective effects of the late phase of ischemic preconditioning in conscious rabbits. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000. 97(18):10197-202
118. Akar F, Udydes-Dogan BS, Buharalioglu CK, Abban G, Heinemann A, Holzer P, van de Voorde J. Protective effect of cromokalim and diazoxide at the proulcerogenic effect of glibenclamide on Indomethacin induced gastric injury. *Eur J Pharmacol* 1991. 374(3):461-70
119. Hippisley-Cox J and Coupland C. Risk of myocardial infarction in patients taking cyclo-oxygenase-2 inhibitors or conventional non-steroidal anti-inflammatory drugs: population based nested case-control analysis. *BMJ* 2005. 330(7504):1366
120. Howes LG and Krum H. Selective cyclo-oxygenase-2 inhibitors and myocardial infarction: how strong is the link? *Drug Saf* 2002. 25(12):829-35
121. Gross ER, Nithipatikom K, Hsu AK, Peart JN, Falck JR, Campbell WB. Cytochrome P450 N-hydroxylase inhibition reduces infarct size during reperfusion via the sarcolemmal KATP channel. *J Mol Cell Cardiol* 2004. 37:1245-9
122. Lu T, Vanrollins M and Lee HC. Stereospecific activation of cardiac ATPsensitive K⁺ channels by epoxyeicosatrienoic acids: a structural determinant study. *Mol Pharmacol* 2002. 62:1076-83
123. Schwarz D, Kisselev P, Ericksen SS, Szklarz GD, Chernogolov A, Honeck H, Schunck WH, Roots I. Arachidonic and eicosapentaenoic acid metabolism by human CYP1A1: highly stereoselective formation of 17(R),18(S)-epoxyeicosatetraenoic acid. *Biochem Pharmacol* 2004. 67(8):1445-57
124. Seubert J, Yang B, Bradbury JA, Graves J, Degraff LM, Gabel S. Enhanced postischemic functional recovery in CYP2J2 transgenic hearts involves mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channels and p42/p44 MAPK pathway. *Circ Res* 2004. 95:506-14

125. Ma YH, Gebremedhin D, Schwartzman ML, Falck JR, Clark JE, Masters BS. 20-hydroxyeicosatetraenoic acid is an endogenous vasoconstrictor of canine renal arcuate arteries. *Circ Res* 1993. 72:126-36
126. Spector AA, Fang X, Snyder GD, Weintraub NL. Epoxyeicosatrienoic acids (EETs): metabolism and biochemical function. *Prog Lipid Res* 2004. 43:55-90
127. Campbell WB, Gebremedhin D, Pratt PF, Harder DR. Identification of epoxyeicosatrienoic acids as endothelium-derived hyperpolarizing factors. *Circ Res* 1996. 78:415-23
128. Hecker M, Bara AT, Bauersachs J, Busse R. Characterization of EDHF as a cytochrome P450-derived arachidonate metabolite in mammals. *J Physiol (London)* 1994. 481:407-14
129. O'Neill SC, Perez MR, Hammond KE, Sheader EA, Negretti N. Direct and indirect modulation of rat cardiac sarcoplasmic reticulum function by n-3 polyunsaturated fatty acids. *J Physiol* 2002. 538(Pt 1):179-84
130. van Bilsen M, Engels W, van der Vusse GJ, Reneman RS. Significance of myocardial eicosanoid production. *Mol Cell Biochem* 1989. 88(1-2):113-21
131. Chen J, Capdevila JH, Zeldin DC, Rosenberg RL. Inhibition of cardiac L-type calcium channels by epoxyeicosatrienoic acids. *Mol Pharmacol* 1999. 55(2):288-95
132. Karow T, Lang R. *Orale Antidiabetika*. 8 ed. *Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie*, ed. Lang R, Karow T. 2000, Bergisch-Gladbach: Druckerei F. Hansen. 495-500
133. Powell T, Terrar DA, Twist VW. Electrical properties of individual cells isolated from adult rat ventricular myocardium. *J Physiol (London)* 1980. 302:131-53
134. Piper HM, Volz A, Schwartz P. Adult ventricular heart muscle cells, in *Tissue culture techniques in heart and vessel research* H.P. Piper, ed. H. Berlin. 1992, Berlin, Heidelberg. 36-60
135. Shah AM, Mebazza A, Wetzel RC, Lacatta EG. Novel cardiac myofilament desensitizing factor released by endocardial and vascular endothelial cells. *Circ* 1994. 89:2492-7
136. Bolli R, Shinmura K, Tang X, Kodani E, Xuan Y, Guo Y, Dawn B. Discovery of a new function of cyclooxygenase (COX)-2: COX-2 is a cardioprotective protein that alleviates ischemia/reperfusion injury and

- mediates the late phase of preconditioning. *Cardiovasc Res* 2002. 55(3):506
137. Adderley SR and Fitzgerald DJ. Oxidative damage of cardiomyocytes is limited by extracellular regulated kinases $\frac{1}{2}$ -mediated induction of Cyclooxygenase. *DJ J Biol Chem* 1999. 274(8):5038-46
 138. Saito T, Rodger IW, Shennib H, Hu F, Tayara L, Giaid A. Cyclooxygenase-2 (COX-2) in acute myocardial infarction: cellular expression and use of selective COX-2 inhibitor. *Can J Physiol Pharmacol* 2003. 81(2):114-9
 139. Liu GS, Stanley AW and Downey J. Cyclooxygenase products are not involved in the protection against myocardial infarction afforded by preconditioning in rabbit. Cyclooxygenase pathway's involvement in preconditioning. *Am J Cardiovasc Pathol* 1992. 4(2):157-64
 140. Carroll MA, Garcia MP, Falck JR, McGiff JC. Cyclooxygenase dependency of the renovascular actions of cytochrome P450-derived arachidonate metabolites. *J Pharmacol Exp Ther* 1992. 260(1):104-9
 141. Pepe S and McLennan PL. Cardiac membrane fatty acid composition modulates myocardial oxygen consumption and postischemic recovery of contractile function. *Circ* 2002. 105(19):2303-8
 142. Marchioli R, Barzi F, Bomba E, Chieffo C, Di Gregorio D, Di Mascio R, Franzosi MG, Geraci E, Levantesi G, Maggioni AP, Mantini L, Marfisi RM, Mastrogiuseppe G, Mininni N, Nicolosi GL, Santini M, Schweiger C, Tavazzi L, Tognoni G, Tucci C, Valagussa F; GISSI-Prevenzione Investigators. Early protection against sudden death by n-3 polyunsaturated fatty acids after myocardial infarction: time-course analysis of the results of the Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto Miocardico (GISSI)-Prevenzione. *Circ* 2002. 105(16):1897-903
 143. Maulik N, Engelman DT, Watanabe M, Engelman RM, Maulik G, Cordis GA, Das DK. Nitric oxide signaling in ischemic heart. *Cardiovasc Res* 1995. 30(4):593-601
 144. Chrabi A and Horiberger JD. Stimulation of epithelial sodium channel activity by the sulfonylurea glibenclamide. *J Pharmacol Exp Ther* 1999. 290(1):341-7
 145. Dos Santos P, Kowaltowski AJ, Laclau MN, Seetharaman S, Paucek P, Boudina S, Thambo JB, Tariosse L, Garlid KD. Mechanisms by which

- opening the mitochondrial ATP- sensitive K(+) channel protects the ischemic heart. *Am J Physiol Circ Physiol* 2002. 283(1):H284-95
146. Weyermann A, Vollert H, Busch AE, Bleich M, Gogelein H. Inhibitors of ATP-sensitive potassium channels in guinea pig isolated ischemic hearts. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2004. 369(4):374-81
147. Wirth KJ, Klaus E, Englert HG, Scholkens BA, Linz W. HMR 1883, a cardioselective K(ATP) channel blocker, inhibits ischaemia- and reperfusion-induced ventricular fibrillation in rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1999. 360(3):295-300
148. Gross GJ and Peart JN. KATP channels and myocardial preconditioning: an update. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003. 285(3):H291-30
149. Aimond F, Rauzier JM, Bony C, Vassort G. Simultaneous activation of p38 MAPK and p42/44 MAPK by ATP stimulates the K⁺ current ITrek in cardiomyocytes. *J Biol Chem* 2000. 275(50):39110-16
150. Yue Y, Qin Q, Cohen MV, Downey JM, Critz SD. The relative order of mK(ATP) channels, free radicals and p38 MAPK in preconditioning's protective pathway in rat heart. *Cardiovasc Res* 2002. 55(3):681
151. Grover GJ,. Protective effects of ATP-sensitive potassium channel openers in experimental myocardial ischemia. *J Cardiovasc Pharmacol* 1994. 24(Suppl 4):S18-27
152. Auchampach JA, Grover GJ and Gross GJ. Blockade of ischemic preconditioning in dogs by the novel ATP dependent potassium channel antagonist sodium 5-hydroxydecanoate. *Cardiovasc Res* 1992. 26(11):1045-62
153. Hoag JB, Qian YZ, Nayeem MA, D'Angelo M, Kukreja RC. ATP-sensitive potassium channel mediates delayed ischemic protection by heat stress in rabbit heart. *Am J Physiol* 1997. 273(5 Pt 2):H2458-64
154. Shigematsu S, Sato T, Abe T, Saikawa T, Sakata T, Arita M. Pharmacological evidence for the persistent activation of ATPsensitive K⁺-channels in the early phase of reperfusion and its protective role against myocardial stunning. *Circ* 1995. 92(8):2266-75
155. Warltier DC, Auchampach JA and Gross GJ. Relationship of severity of myocardial stunning to ATP dependent potassium channel modulation. *Card Surg* 1993. 8(2 Suppl):279-83

156. Hayashi S, Horie M and Okada Y. Ionic mechanism of minoxidil sulfate-induced shortening of action potential durations in guinea pig ventricular myocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 1993. 265(3):1527-33
157. Grover GJ, D'Alonzo AJ, Sleph PG, Dzwonczyk S, Hess TA, Darbenzio RB. The cardioprotective and electrophysiological effects of cromakalim are attenuated by meclofenamate through a cyclooxygenase-independent mechanism. *J Pharmacol Exp Ther* 1994. 269(2):536-40
158. Zhu HF, Dong JW, Zhu WZ, Ding HL, Zhou ZN. ATP-dependent potassium channels involved in the cardiac protection induced by intermittent hypoxia against ischemia/reperfusion injury. *Life Sci* 2003. 73(10):1275-87
159. Baines CP, Liu GS, Birincioglu M, Critz SD, Cohen MV, Downey JM. Ischemic preconditioning depends on interaction between mitochondrial KATP channels and actin cytoskeleton. *Am J Physiol* 1999. 276(4 Pt 2):H1361-8
160. Lawson K. Potassium channel activation: A potential therapeutic approach? *Pharmacol Ther* 1996. 70(1):39-63

8. Abkürzungsverzeichnis

AG	Arbeitsgemeinschaft
AM	Akutmessung
AP	Aktionspotential
APD	Aktionspotentialdauer
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	bovines Serumalbumin
Ca ⁺⁺	Kalzium
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
COX	Cyclooxygenase
CYP	Cytochrom P
DAG	Diacylglycerin
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDHF	endothel derived hyperpolarizing factor
11,12 EET	11,12 Eicosatriensäure
17,18 EET	17,18 Epoxyeicosatetraensäure
FEX	Faktorextrakt
Fura-2-AM	Fluo-2-Acetonmethylester
5-HD	Sodium-5-Hydroxydecanoate
HETE	Hydroxyeicosatetraensäure
HEPES	Hydroxy-Ethyl-Piperazin-Ethan-Sulfonsäure
HPLC	high performance liquid chromatography
IF	ischämisches Effluat
IP ₃	Inositoltriphosphat
IPC	ischemic preconditioning
KF	Kontrolleffluat
K ⁺ -Kanal	Kaliumkanal
KHK	Koronare Herzkrankheit
M	mol/l
MAP	mitogen activated protein
mK _{ATP}	mitochondrialer ATP-regulierter Kaliumkanal
MPTP	mitochondrial permeability transition pore
NIS	Negative inotropic substances
NO	Stickstoffmonoxid
NSAID	nonsteroidal antiinflammatory drug

PG	Prostaglandin
PTCA	Perkutane transluminale Katheterangioplastie
RCF	relative centrifugation force
rfu	relative fluorescence units
ROS	reactive oxygen species
SEM	Standardfehler
SERCA	Ca ⁺⁺ -ATPase des sarkoplasmatischen Retikulum
sK _{ATP}	sarkolemmaler ATP-regulierter Kaliumkanal
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
TXA	Thromboxan
WHO	World Health Organisation

9. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Die Dissertation ist bisher keiner anderen Fakultät vorgelegt worden.

Ich erkläre, dass ich bisher kein Promotionsverfahren erfolglos beendet habe und dass eine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades nicht vorliegt.

Greifswald, 10.10.2005

Corina Labitzke

10. Lebenslauf

Name	Corina Labitzke
Geburtstag	11. April 1979
Geburtsort	Rüdersdorf bei Berlin
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	Deutsch
Schulbildung	1992-1998 Gymnasium „Geschwister-Scholl“, Fürstenwalde/Spree 1985-1992 Grundschule „Gerhard-Gossmann“, Fürstenwalde/Spree
Studium	1998-2005 Studium der Humanmedizin an der Ernst- Moritz-Arndt Universität Greifswald
Approbation	24.11.2005
Forschung	09.2001-09.2002 Kardiologisches Forschungslabor der Klinik für Innere Medizin B, Ernst-Moritz-Arndt Universität Greifswald
Praktische Tätigkeit	12.2005 Assistenzärztin der Klinik für Anästhesiologie und Operative Intensivmedizin, Universitätsklinikum Schleswig- Holstein, Campus Kiel 02.2004-04.2004 Studentische Mitarbeit Forschungsabteilung Kardiologie, Klinik für Innere Medizin B, Universitätsklinikum Greifswald

03.2004-08.2004 Studentische Hilfskraft
Forschungsabteilung der Klinik für Orthopädie und
Orthopädische Chirurgie, Universitätsklinikum Greifswald

03.2000-03.2001 Studentische Hilfskraft
Institut für Medizinische Psychologie, Abteilung
"Community Medicine", Ernst-Moritz-Arndt Universität
Greifswald

Auslandsaufenthalte 02.2005-05.2005 2. Tertial, Anästhesiologie
Regionalspital Emmental, CH-3400 Burgdorf

09.2004-11.2005 1. Teil des 1. Tertials, Chirurgie
Concord-Repatriation-Hospital, NSW-2139 Sydney

08.2003 Famulatur, Neuropädiatrische Abteilung, Klinicki
Bolnicki Centar Rijeka, Klinika za Pedijatriju, HR-51000
Rijeka

Sprachkenntnisse	Deutsch	Muttersprache
	Englisch	fließend in Wort und Schrift
	Russisch	Basiswissen
	Latein	Basiswissen

Greifswald, 24.04.2006

Corina Labitzke

11. Dank

Ich möchte mich bei allen bedanken, die mir diese Arbeit ermöglicht haben.

Mein persönlicher Dank gilt dabei vor allem Herrn Prof. Dr. S.B. Felix für die Überlassung des Themas und die Unterstützung bei der Bearbeitung.

Ein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. A. Staudt, der mich als direkter Betreuer an die wissenschaftliche Arbeit heranführte und mir mit seinen Vorschlägen und Kritiken sehr geholfen hat.

Allen Mitarbeitern der Hagen Schunck AG, Max-Delbrück-Center Berlin einen herzlichen Dank für die freundliche und unkomplizierte Zusammenarbeit.

Hervorzuheben sind B. Püschel und S. Grugel, die als Medizinisch Technische Assistentinnen des Kardiologischen Forschungslabors mit Ihrem Wissen über Zellisolation und technischen Verfahrensweisen von großem Wert für mich waren.

Ich danke meinen Eltern und meiner Schwester Sylvia auf deren Unterstützung ich in allen Lebenslagen vertrauen konnte.

Herzlich danke ich Deborah und Ildikò.

Corina