

Signalmechanismen des anoxischen Preconditionings an isolierten Kardiomyozyten der  
adulten Ratte

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
des Fachbereichs Humanmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Hagen Maxeiner  
aus Dillenburg

Gießen 2001

Aus dem Institut für Physiologie  
Leiter: Prof. Dr. Dr. H. M. Piper  
des Klinikums der Justus-Liebig-Universität Gießen

Gutachter: Prof. Dr. Dr. H. M. Piper

Gutachter: Prof. Dr. R. Bohle

Tag der Disputation: 14. Mai 2001

---

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1 EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Zelluläre Ursachen der Schädigung durch Ischämie und Reperfusion</b>	<b>2</b>
1.1.1 Zellschädigung durch Ischämie	2
1.1.2 Zellschädigung durch Reperfusion nach Ischämie	5
<b>1.2 Das Phänomen des ischämischen Preconditionings</b>	<b>7</b>
1.2.1 Die Rolle der Proteinkinase C	7
1.2.2 Zusammenhänge zwischen Preconditioning und der Proteinkinase C	8
<b>2 MATERIAL</b>	<b>9</b>
<b>2.1 Chemikalien</b>	<b>9</b>
<b>2.2 Medien, Puffer und Lösungen</b>	<b>10</b>
2.2.1 Zellkulturmedien	10
2.2.2 Puffer und Lösungen für die Zellpräparation	10
2.2.3 Lösungen für die Versuche mit isolierten Herzmuskelzellen	11
<b>2.3 Geräte und Laborbedarf</b>	<b>13</b>
2.3.1 Zellkultur	13
2.3.2 Fluoreszenzmessung	13
2.3.3 Zelllängen-Messung	13
2.3.4 Anoxie-Reoxigenierungs-Experimente	14
<b>3 METHODEN</b>	<b>15</b>
<b>3.1 Die Isolierung von Herzmuskelzellen adulter Ratten</b>	<b>15</b>
3.1.1 Versuchstiere	15
3.1.2 Präparation von Herzmuskelzellen adulter Ratten	15
<b>3.2 Zellkultur</b>	<b>16</b>
<b>3.3 Messung der intrazellulären Ionenkonzentration von Ca<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup> und H<sup>+</sup></b>	<b>17</b>
3.3.1 Apparative Voraussetzungen	17
3.3.2 Beladung der Zellen mit den Fluoreszenzfarbstoffen und Kalibrierung des Fluoreszenzsignals	18
3.3.3 Kompartimentierung der Fluoreszenzfarbstoffe	21
<b>3.4 Anoxie-Reoxigenierungs-Experimente</b>	<b>22</b>
3.4.1 Apparative Voraussetzungen	22
3.4.2 Versuchsprotokolle	23

---

3.4.3 Meßparameter	25
3.4.4 Statistik	25
<b>4 ERGEBNISSE</b>	<b>27</b>
4.1 Auswirkungen anoxischen Preconditionings auf die $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase der Zellen	27
4.3 Auswirkungen anoxischen Preconditionings auf den zytosolischen pH-Wert	32
4.2 Auswirkungen anoxischen Preconditionings auf die Reoxigenierungs-induzierte Hyperkontraktur	33
4.5 Auswirkungen anoxischen Preconditionings auf die zytosolische $\text{Na}^+$ -Konzentration	35
4.4 Auswirkungen anoxischen Preconditionings auf den Reverse Mode des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers	37
<b>5 DISKUSSION</b>	<b>39</b>
5.1 Relevanz des Modells	39
5.2 Auswirkungen des anoxischen Preconditionings auf die Ionenhomöostase während der Anoxie	40
5.3 Auswirkungen anoxischen Preconditionings auf die Reoxigenierungs-induzierte Hyperkontraktur	42
5.4 Vergleich mit Preconditioning am ganzen Herzen	43
<b>6 ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>45</b>
<b>7 SUMMARY</b>	<b>46</b>
<b>8 LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>47</b>
<b>Lebenslauf</b>	<b>58</b>
<b>Danksagung</b>	<b>59</b>

## Verzeichnis der Abkürzungen

% (vol / vol)	Volumenprozent
% (wt / vol)	Gewichtsprozent
AP	Anoxisches Preconditioning
Aqua bidest.	demineralisiertes Wasser
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BCECF	2',7'-bis-(2-carboxyethyl)-5-(und-6)- carboxyfluorescein
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FCS	Fötale Kälberserum
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-2- ethanolsulfonsäure
IU	Internationale Einheit
KG	Körpergewicht
NBS	Natrium-Bicarbonat-Symporter
NCA	Natrium-Calcium-Austauscher
NHA	Natrium-Protonen-Austauscher
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der H <sup>+</sup> -Konzentration
PKC	Proteinkinase C
PP	Proteinphosphatasen
PTCA	Perkutane Transluminale Koronar- Angioplastie
SBFI	Natrium-bindendes Benzofuran-Isophtalat
SD	Standardabweichung
SEM	Standardfehler des Mittelwerts
U	Einheit
x g	x-fache Erdbeschleunigung

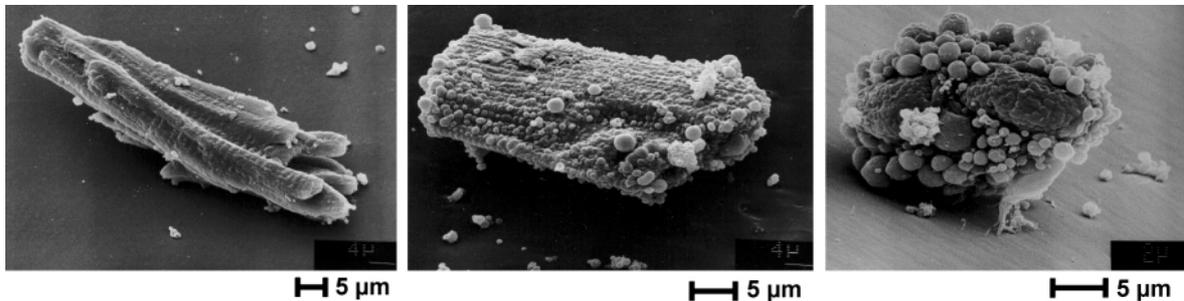
## 1 Einleitung

Das Myokard gehört zu den Geweben, welche eine geringe Toleranz gegenüber Sauerstoff- und Substratmangel aufweisen. Sein Stoffwechsel verläuft überwiegend oxidativ, somit führt eine Mangelversorgung durch Verengung oder Verschluß von Koronargefäßen rasch zur Infarzierung des Gewebes.

Entsteht ein thrombotischer Verschluß einer Koronararterie, so ist es das primäre Ziel der klinischen Therapie, die koronare Blutversorgung wiederherzustellen, um das Ausmaß des infarzierten Areal so gering wie möglich zu halten. Hierzu stehen verschiedene Verfahren zur Verfügung. Einerseits kann durch eine systemische Lysetherapie eine Auflösung des okkludierenden Thrombus‘ versucht werden, andererseits kann durch eine Perkutane Transluminale Koronar-Angioplastie (PTCA) eine direkte Aufdehnung einer stenotischen Koronararterie versucht werden, möglich ist hierbei auch die Kombination mit einer lokalen Applikation lytischer Medikamente. Um die klinische Therapie der koronaren Herzkrankheit und des Myokardinfarktes weiter optimieren zu können, ist es notwendig, die zugrundeliegenden schädigenden Mechanismen auf zellulärer Ebene zu untersuchen.

Die Entwicklung der Zellschädigung im ischämischen Gewebe beginnt mit dem Verlust des zellulären Energiegleichgewichts. Das aus der fehlenden mitochondrialen Energiegewinnung resultierende Defizit an ATP führt zu einer Verlangsamung oder zum völligen Sistieren metabolischer Prozesse, darunter der zellulären Kontrolle des  $\text{Na}^+$ - und  $\text{Ca}^{2+}$ -Haushaltes. Eine länger anhaltende Überladung des Zytosols und der Zellorganellen mit hohen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen kann durch die Aktivierung strukturschädigender Mechanismen zur Schädigung der Zelle führen (LADILOV et al. 1997, GANOTE und ARMSTRONG 1993, ARMSTRONG und GANOTE 1992, GANOTE und VANDER HEIDE 1987, STEENBERGEN et al. 1987, STEENBERGEN et al. 1990). Zu diesen Mechanismen zählt die Veränderung des Phosphorylierungszustands von Strukturproteinen, damit einhergehend eine Störung der zytoskelettalen Stabilität, und die Aktivierung lytischer Enzyme (FARBER et al. 1981). Muskelzellen sind hierbei besonders gefährdet, dergestalt, daß eine exzessiv hohe intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration zu einer Aktivierung des kontraktile Apparates und somit zur zusätzlichen mechanischen Schädigung der Zelle führen kann (PIPER 1989, SIEGMUND et al, 1993). Der Verlust der  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase ist ein Anzeichen für einen

fortgeschrittenen, aber nicht notwendigerweise irreversiblen Zellschaden, dessen Ausmaß im Modell allerdings in nicht unerheblichem Maße von der Dauer der simulierten Ischämie abhängt (LADILOV et al. 1997).



**Abb. 1.1: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Herzmuskelzellen der adulten Ratte unter Normoxie (Stäbchenform), unter Anoxie (Rigorform) und unter Reoxygenierung (Hyperkontraktur) (überlassen von Dr. Berthold Siegmund).**

## **1.1 Zelluläre Ursachen der Schädigung durch Ischämie und Reperfusion**

### 1.1.1 Zellschädigung durch Ischämie

Das Modell der isolierten Kardiomyozyten unter simulierter Ischämie versucht, die im Gewebe herrschenden Bedingungen unter Ischämie nachzuahmen. In vivo bedeutet das Sistieren der koronaren Perfusion, daß die Versorgung der Kardiomyozyten mit energieliefernden Substraten sowie mit Sauerstoff zusammenbricht. Im Modell werden diese Bedingungen durch Superfusion der Zellen mit anoxischem, glukosefreiem Medium in einer Perfusionskammer simuliert. Da infolge der Ischämie in vivo auch eine Ansäuerung des Gewebes beobachtet wird, wird der pH-Wert des Superfusionsmediums entsprechend abgesenkt. Dieses Modell ist insofern eine unvollständige Simulation der myokardialen Ischämie, da die im Gewebsverband zu beobachtende Anhäufung verschiedener Metabolite hier nicht simuliert werden kann. Diese werden durch Superfusion der isolierten Zellen sofort entfernt. Die Vorzüge des verwendeten Modells sind jedoch offensichtlich. Es gewährt Einblicke in zelluläre Vorgänge auf zytoplasmatischer Ebene. Störungen der zellulären Ionenbalance können an einzelnen Zellen unter Normoxie wie auch unter Anoxie verfolgt werden.

Die unter Normoxie, Anoxie und Reoxigenierung ablaufenden Prozesse werden im Zellkulturmodell anhand verschiedener Parameter untersucht:

### ATP

Unter Energieverarmung kommt es in den Zellen zu einem Absinken der ATP-Konzentration. Bei Erreichen einer kritischen Schwelle, die etwa bei 100  $\mu\text{M}$  liegt, unterlaufen die Zellen einen Kontraktionsvorgang, der unabhängig von der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration ist. Der Mechanismus dieser „Rigor-Kontraktur“ beruht wohl darauf, daß bei vereinzelter Ausbildung von Rigor-Querbrückenkomplexen an einem Aktinfilament die Myosin-Bindung an weiteren Bindungsstellen ermöglicht wird, was bei Vorhandensein geringer Restmengen von ATP an diesen Bindungsstellen zur Initiierung von Querbrücken-Zyklen und damit zur Kontraktion führt. Durch den Kontraktionsvorgang kommt es darüberhinaus zu einer Aktivierung der Myosin-ATPase und somit zum schnellen Verbrauch des verbliebenen ATPs; es resultiert eine vollständige Deenergetisierung der Zelle (BOWERS et al. 1992).

### pH-Wert

Unter Sauerstoffmangel führt die Nettohydrolyse von ATP (DENNIS et al. 1991) und die Bildung von Laktat zur Ansäuerung des ischämischen Myokards. Am Modell des isolierten Herzens konnte innerhalb von 10 Minuten ein Abfall des intrazellulären pH-Wertes von 7,1 auf 6,3 beobachtet werden (OWENS et al. 1996). Diese ischämische Ansäuerung aktiviert verschiedene transmembranäre Mechanismen zum Transport von  $\text{H}^+$  und  $\text{HCO}_3^-$ . Hierzu gehört in Kardiomyozyten auch der  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austauscher (FRELIN et al. 1985, 1988), der Protonen im Austausch gegen  $\text{Na}^+$  aus dem Zytosol entfernt. Es resultiert eine intrazelluläre Akkumulation von  $\text{Na}^+$ . Ein Teil der Protonen verbleibt, bedingt durch den Abbau der transsarkolemmalen Gradienten, im Zytosol und bewirkt dort eine zunehmende Ansäuerung (CLARKE et al. 1993, HENDRIKX et al. 1994). Hierdurch wird die Phosphofruktokinase, das Schlüsselenzym der Glykolyse, inhibiert und die glykolytische Bildung von ATP vermindert (FIDELMAN et al. 1982). Die Verminderung des zytosolischen ATP-Gehalts führt zur funktionellen Einschränkung aller primär bzw. sekundär aktiven Transportmechanismen. Die ischämische Ansäuerung kann auch zur Hemmung von Proteasen und Phosphatasen führen, da sie ihre Wirkung optimal unter

neutralen oder leicht alkalischen Bedingungen entfalten. Der intrazelluläre pH-Wert kann mit dem Fluoreszenzfarbstoff 2',7'-bis-(2-carboxyethyl)-5,6-carboxyfluorescein (BCECF) gemessen werden (PARADISO et al. 1984).

### Natrium

Unter Anoxie zeigt sich weiterhin eine Anreicherung des Zytosols mit  $\text{Na}^+$ , die fluoreszenzoptisch mit dem Farbstoff Natrium-bindendes Benzofuran-Isophthalat (SBFI) gemessen werden kann.  $\text{Na}^+$  gelangt über verschiedene sarkolemmale Mechanismen in das Zytosol, hierzu gehören Tetrodotoxin (TTX)-sensitive und unsensitive  $\text{Na}^+$ -Kanäle (HESS und TSIEN 1984) und der  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austauscher (MOHABIR et al. 1991, CORDEIRO et al. 1994). Wie bei anderen Ionen hängt auch die zelluläre  $\text{Na}^+$ -Homöostase von einem Gleichgewicht zwischen Ein- und Ausstrom ab. Die sarkolemmale  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase ist auf eine große Menge an freier Energie aus der ATP-Hydrolyse angewiesen (KAMMERMEIER 1987) und somit durch ein energetisches Defizit früh in Ihrer Funktion eingeschränkt. Diese Tatsache kann zur Erklärung des frühen  $\text{Na}^+$ -Anstiegs herangezogen werden. Der durch die Akkumulation von  $\text{Na}^+$  im Zytosol verringerte transsarkolemmale  $\text{Na}^+$ -Gradient und die Depolarisierung der Zellmembran (CORDEIRO et al. 1994) führen zu einer Aktivierung des „Reverse Mode“ des  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers (VER DONCK et al. 1993, DOERING und LEDERER 1993).

### Calcium

Einen besonderen Parameter in Hinsicht auf die Zellschädigung stellt die Überladung der Zellen mit  $\text{Ca}^{2+}$  dar. Die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration kann mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 bestimmt werden. Die Wege, auf denen  $\text{Ca}^{2+}$  in die Zellen gelangt, sind zum Teil noch unklar. Ein Influx durch L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle scheint jedoch ausgeschlossen werden zu können, da spezifische Hemmstoffe dieser Kanäle den  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx nicht verhindern können (LADILOV, HAFFNER et al. 1999). Ein anderer denkbarer Weg sind unspezifische „leak channels“, welche unter Energieverarmung einen unkontrollierten Kationeneinstrom ermöglichen sollen (CLAGUE et al. 1993). Eine andere bereits im vorigen Abschnitt beschriebene Hypothese geht davon aus, daß der  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom die Folge einer Überladung des Zytosols mit  $\text{Na}^+$  ist, da ein verringerter transsarkolemmaler  $\text{Na}^+$ -Gradient zu einem Netto-Influx von  $\text{Ca}^{2+}$  durch den  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -

Austauscher führen könnte (ZIEGELSTEIN et al. 1992). Für diese Hypothese spricht, daß in der Tat in energieverarmten Kardiomyozyten ein Anstieg des zytosolischen  $\text{Na}^+$  beobachtet werden kann (DONOSO et al. 1992), welcher vor dem Anstieg des  $\text{Ca}^{2+}$  einsetzt.  $\text{Na}^+$  beginnt bereits vor dem Beginn der Rigorkontraktur zu steigen,  $\text{Ca}^{2+}$  hingegen gleichzeitig mit dem Rigor oder kurz danach. Auch kann bei energieverarmten Kardiomyozyten ein Anstieg des zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$  durch eine Reduktion der extrazellulären  $\text{Na}^+$ -Konzentration hervorgerufen werden (LI et al. 1988; LADILOV, HAFFNER et al. 1999).

### 1.1.2 Zellschädigung durch Reperfusion nach Ischämie

Die zügige Wiederherstellung der koronaren Durchblutung ist primäres Ziel der klinischen Therapie. Paradoxerweise kann durch diese Reperfusion eine Schädigung des Gewebes induziert werden; somit ist die Untersuchung der Reoxigenierungsphase im Zellkulturmodell von besonderem Interesse. Wird den Zellen nach längerer Anoxie wieder Sauerstoff angeboten, so setzt sehr bald nach dieser Reoxigenierung die mitochondriale Energieproduktion ein (SIEGMUND et al. 1990). Den Zellen steht nun wieder Energie in Form von ATP zur Korrektur der gestörten Ionenhomöostase zur Verfügung. In der Tat zeigt sich, daß die Reoxigenierung zu einem rapiden Abfall der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration führt, gefolgt von einer Phase von  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillationen, in welchen sich die Aufnahme und Abgabe von  $\text{Ca}^{2+}$  durch das sarkoplasmatische Retikulum widerspiegelt (SIEGMUND et al. 1992). Die Ausschleusung des überschüssigen  $\text{Ca}^{2+}$  aus der Zelle scheint über den  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher stattzufinden (SIEGMUND et al. 1992, SIEGMUND et al. 1994).

Im Verlauf einer längeren Anoxie erreichen Kardiomyozyten einen Punkt, an dem eine Reoxigenierung nicht zu einer folgenlosen Erholung der Zellen führt. Paradoxerweise kommt es durch die Reoxigenierung zu einer Schädigung von Zellen und Gewebe, einhergehend mit massiven Kontraktionsvorgängen und Enzymfreisetzung (GANOTE 1983, HEARSE et al. 1973). Der Grund hierfür liegt in der exzessiv hohen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration, welche sich im Laufe der Anoxie entwickelt und die Myofibrillen in einen Zustand der Aktivierung bringt. Dieser bleibt unter gedrosselter ATP-Hydrolyse und Energieverarmung zunächst folgenlos (GANOTE 1983, VANDER HEIDE et al. 1986); mit Einsetzen der mitochondrialen Energieproduktion kommt es jedoch an den aktivierten Myofibrillen zu kontraktile Vorgängen, welche zu einer starken, unkontrollierten Kontraktion der ganzen

Zelle führen. In isolierten Kardiomyozyten äußert sich dies als eine maximale Kontraktur der Myozyten unter Verlust der vorherigen Morphologie und Zerstörung des Zytoskeletts (Hyperkontraktur, siehe **Abb. 1.1**). Im ganzen Herzen kommt es durch die Einbindung der Zellen in den Gewebeverband darüberhinaus zu einer Zerreißung der Zellen mit massiver Enzymfreisetzung. Eine Hemmung dieser Hyperkontraktur kann Myokardgewebe somit vor Nekrosen schtzen.

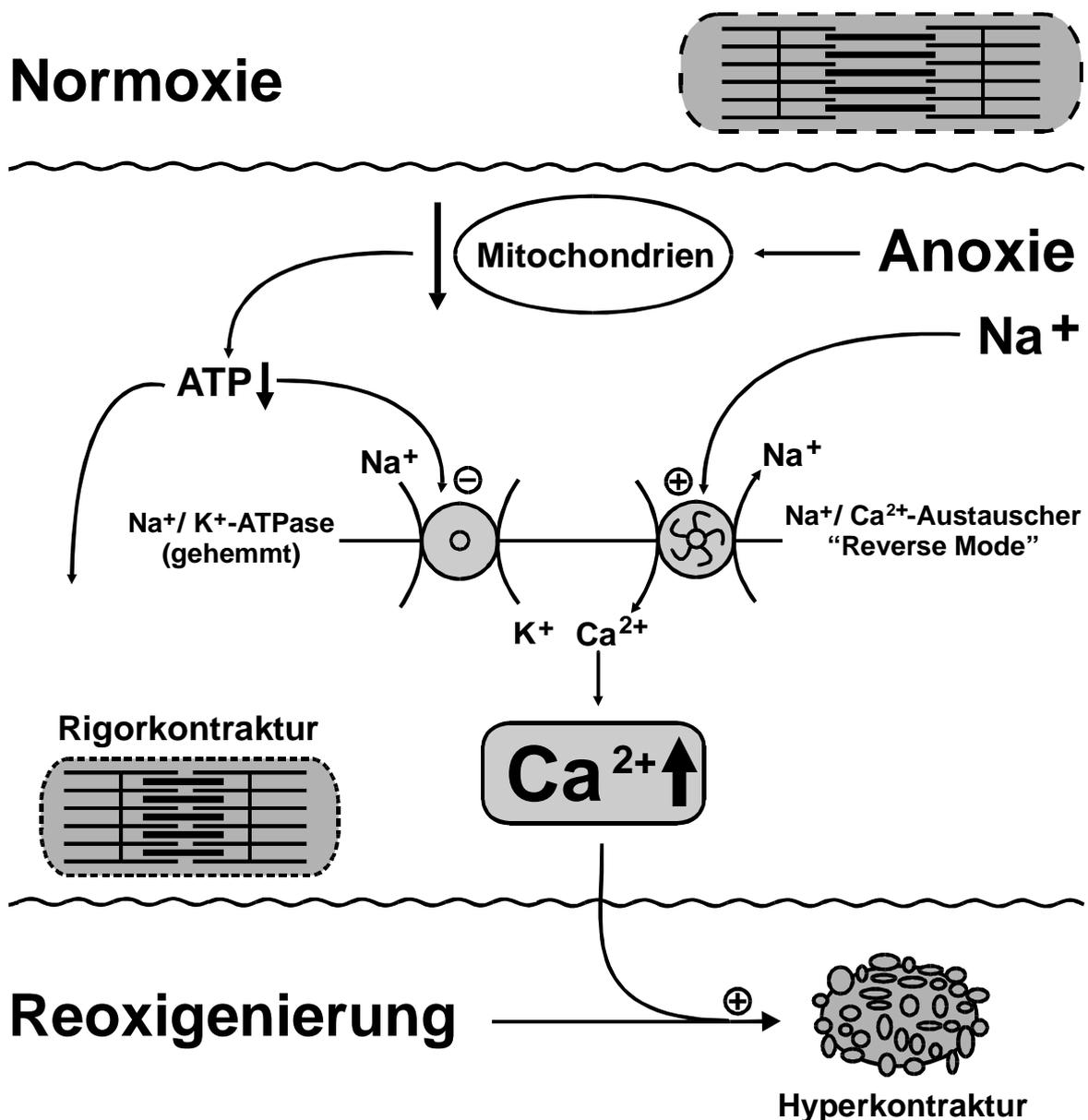


Abb. 1.2: Ursachen der Zellschädigung durch Anoxie und Reoxigenierung.

## 1.2 Ischämisches und anoxisches Preconditioning

Am ganzen Herzen konnte in verschiedenen Studien das Phänomen des ischämischen Preconditioning beobachtet werden. Hierbei handelt es sich um eine Protektion gegen unter Ischämie und Reperfusion auftretende Schäden, die durch eine oder mehrere kurze ischämische Episoden vor der eigentlichen, langanhaltenden Ischämie erreicht wird. Dieses Phänomen kann auch am Modell isolierter Herzmuskelzellen induziert werden, wenngleich die komplexen Vorgänge im Gewebeverband nur zum Teil simuliert werden können. Im hier verwendeten Zellkulturmodell geschieht diese Simulation der natürlichen Vorgänge durch Superfusion der Zellen mit anoxischem, im pH-Wert abgesenktem, glukosefreien Medium, also durch anoxisches Preconditioning. Es ist wichtig, dieses anoxische Preconditioning vom ischämischen Preconditioning zu unterscheiden, da die Anoxie sicherlich nur einen Teilaspekt der Ischämie darstellt und Ergebnisse beider Modelle oft nicht ohne weiteres miteinander verglichen werden können.

### 1.2.1 Die Rolle der Proteinkinase C

Zellen unterliegen einer Regulation durch den Gesamtorganismus. Der Organismus nimmt Einfluß auf ihre Funktion durch chemische Signalstoffe, z. B. zirkulierende Hormone. Es gibt Hormone, die als lipophile Substanzen die Zellmembran durchdringen und über intrazelluläre Rezeptoren auf die Transkription im Zellkern einwirken können. Hierzu zählen u.a. die Steroidhormone und das Thyroxin. Die hydrophilen Hormone, zu denen u.a. die Katecholamine und andere Tyrosinabkömmlinge zählen, können die Zellmembran nicht durchdringen. Sie binden an spezifische Membranproteine, die hierdurch eine Änderung ihrer Raumstruktur auf der Innenseite der Zellmembran erfahren. Das Signal kann auf der innenliegenden Seite des Rezeptors verschiedenartig weitergegeben werden. Eine Reihe von Rezeptoren geben ihr Aktivierungssignal intrazellulär biochemisch an die Phospholipase C weiter. Aktivierung der Phospholipase C führt zur Hydrolyse des Membranlipids Phosphatidyl-Inositol-bisphosphat und zur Bildung von Inositol-1,4,5-trisphosphat und Diacylglycerol. Als Second messenger aktiviert Diacylglycerol die Proteinkinase C (PKC), welche Serin- und Threoninreste von Proteinen phosphoryliert und dadurch deren Funktionszustand ändert.

### 1.2.2 Zusammenhänge zwischen Preconditioning und der Proteinkinase C

In zahlreichen Studien konnte gezeigt werden, daß die Effekte des ischämischen Preconditionings die Folge einer Freisetzung und Akkumulation endogener Mediatoren wie Adenosin oder Noradrenalin darstellt, in Folge derer es zu einer Aktivierung der Proteinkinase C kommt (YTREHUS et al. 1994, SPEECHLY-DICK et al. 1994, MITCHELL et al. 1995). Andererseits belegen Daten, daß ein Schutz durch ischämisches Preconditioning unabhängig von der Proteinkinase C erreicht werden kann (PRZYKLENK et al. 1995, MOOLMAN et al. 1996, VAHLHAUS et al. 1996, SANDHU et al. 1997). Zusätzlich zeigen Untersuchungen, daß ein Schutz des Myokards ähnlich dem durch ischämisches Preconditioning durch eine vorangehende kurze Hypoxie und einen Mechanismus erreicht werden kann, an welchem die Aktivierung von Adenosinrezeptoren oder G-Proteinen nicht beteiligt ist (MOOLMAN et al. 1994, ZHAI et al. 1993, LASLEY et al. 1993, YABE et al. 1995). Die Frage bleibt offen, ob der Grund für diese widersprüchlichen Ergebnisse in den verschiedenen experimentellen Modellen liegt oder ob es sich in der Tat um verschiedene zu einer Protektion führende Pfade handelt. Um dieser Frage nachzugehen, wurde das Modell simulierter Ischämie und Reperfusion an adulten isolierten ventrikulären Kardiomyozyten verwandt, in welchem frühere Studien eine Protektion durch eine nichtselektive Proteinkinase C -Aktivierung nachgewiesen hatten (LADILOV et al. 1998, LADILOV, BALSER-SCHAFFER et al. 1999). Um anoxisches Preconditioning zu erreichen, wurde das Protokoll modifiziert und der langanhaltenden Anoxie eine kurze anoxische Phase und eine kurze normoxische Phase vorangestellt.

Ziele der vorliegenden Studie waren es,

- herauszufinden, inwieweit dieses anoxische Preconditioning isolierte Kardiomyozyten gegen einen durch simulierte Ischämie und Reperfusion induzierten Schaden schützen kann,
- herauszufinden, welche Rolle hierbei der Proteinkinase C zukommt,
- herauszufinden, ob Proteinkinase C -unabhängige Mechanismen beteiligt sind.

## 2 Material

### 2.1 Chemikalien

Albumin (aus Rinderserum)	Boehringer, Mannheim
Bisindolylmaleimid I	Calbiochem, Bad Soden
BCECF	Molecular Probes, Leiden, NL
Carnitin	Sigma, Deisenhofen
Cantharidin	Sigma, Deisenhofen
Collagenase, Typ CLS II, (322 U / mg)	Biochrom, Berlin
Cystein	Sigma, Deisenhofen
Digitonin	Sigma, Deisenhofen
FCS	PAA Laboratories, Cölbe
Fura-2	Molecular Probes, Leiden, NL
Gramicidin D	Sigma, Deisenhofen
HOE 642	Hoechst Marion Roussel, Frankfurt
Ionomycin	Calbiochem, Bad Soden
KB-R7943	Kanebo, Osaka, Japan
Kreatin	Sigma, Deisenhofen
Medium 199 / Earl's Salts	Gibco BRL, Eggenstein
Nigericin	Sigma, Deisenhofen
Ouabain	Sigma, Deisenhofen
Penicillin-Streptomycin-Lösung	Gibco BRL, Eggenstein
Resazurin	Sigma, Deisenhofen
Ryanodin	Calbiochem, Bad Soden
SBFI	Molecular Probes, Leiden, NL
Taurin	Sigma, Deisenhofen

Die übrigen verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Boehringer (Mannheim), Gibco BRL (Eggenstein), Merck (Darmstadt), Riedel-de-Haën (Seelze) und Sigma (Deisenhofen) in der höchsten erhältlichen Qualität bezogen. Alle verwendeten Chemikalien wurden gemäß Herstellerangaben gelöst und aufbewahrt.

## 2.2 Medien, Puffer und Lösungen

### 2.2.1 Zellkulturmedien

#### Medium 199 / HEPES-gepuffert

Medium 199 / Earl's Salts	9,8 g / l
HEPES	15 mM
pH-Wert 7,4 bei 37° C	

#### Vorplattierungsmedium

Medium 199 / HEPES-gepuffert	100 ml
FCS	4 % (vol / vol)
Penicillin	100 IU / ml
Streptomycin	100 µg / ml

#### Ausplattierungsmedium

Medium 199 / HEPES-gepuffert	100 ml
Kreatin	5 mM
Karnitin	2 mM
Taurin	5 mM
Penicillin	100 IU / ml
Streptomycin	100 µg / ml

### 2.2.2 Puffer und Lösungen für die Zellpräparation

#### Calcium-Stammlösung:

CaCl <sub>2</sub>	100 mM
-------------------	--------

Powell-Medium:

NaCl	110 mM
NaHCO <sub>3</sub>	25 mM
KCl	2,6 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,2 mM
MgSO <sub>4</sub>	1,2 mM
Glukose	11 mM
gesättigt mit 95 % O <sub>2</sub> und 5 % CO <sub>2</sub>	
pH-Wert 7,25 bei 37° C	

Collagenasepuffer:

Powell-Medium	40 ml
Collagenase	25 mg
Calcium-Stammlösung	12,5 µl

Gradienten-Lösung:

Powell-Medium	50 ml
Albumin	4 %
Calcium-Stammlösung	500 µl

Alle Medien wurden bei 4°C aufbewahrt.

2.2.3 Lösungen für die Versuche mit isolierten HerzmuskelzellenNormoxische HEPES-gepufferte Tyrode-Lösung:

NaCl	140 mM
KCl	2,6 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,2 mM
MgSO <sub>4</sub>	1,2 mM

---

CaCl <sub>2</sub>	1,0 mM
HEPES	25,0 mM
Glukose	5,0 mM
pH-Wert 7,4 bei 37° C	

Na<sup>+</sup>-freie normoxische HEPES-gepufferte Tyrode-Lösung:

KCl	142,6 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,2 mM
MgSO <sub>4</sub>	1,2 mM
CaCl <sub>2</sub>	1,0 mM
HEPES	25,0 mM
Glukose	5,0 mM
pH-Wert 7,4 bei 37° C	

Anoxische HEPES-gepufferte Tyrode-Lösung:

NaCl	140,0 mM
KCl	2,6 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,2 mM
MgSO <sub>4</sub>	1,2 mM
CaCl <sub>2</sub>	1,0 mM
HEPES	25,0 mM
Resazurin	1 %
Cystein	5,0 mM
pH-Wert 6,4 bei 37° C	
durch Autoklavierung deoxigeniert	

Na<sup>+</sup>-freie anoxische HEPES-gepufferte Tyrode-Lösung:

KCl	127,6 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,2 mM
MgSO <sub>4</sub>	1,2 mM
CaCl <sub>2</sub>	1,0 mM

HEPES	25,0 mM
Resazurin	1 %
Cystein	5,0 mM
pH-Wert 6,4 bei 37° C	
durch Autoklavierung deoxigeniert	

Anoxische Medien wurde nach der von ALLSHIRE, PIPER et al. (1987) beschriebenen Methode durch Autoklavierung deoxigeniert. Nach Zusatz von Resazurin und Cystein wurde mit N<sub>2</sub> begast, bis ein Farbumschlag von lila nach rosa sichtbar wurde. Die anschließende Autoklavierung erfolgte für 40 Minuten bei 2 bar.

## 2.3 Geräte und Laborbedarf

### 2.3.1 Zellkultur

Brutschrank	Heraeus, Hanau
Gewebehacker	Bachofer, Reutlingen
LANGENDORFF-Perfusionsanlage	Eigenbau
Mikroskop	TMS-F, Nikon, Japan
Nylonnetz	NeoLab, Heidelberg
Sterilbank	Heraeus, Hanau

### 2.3.2 Fluoreszenzmessung

Analyse-Software	Spex Industries, Grasbrunn
AR-Cation Measurement System	Spex Industries, Grasbrunn
Inverses Mikroskop	Diaphot TMD, Nikon, Japan
Photomultiplier	Spex Industries, Grasbrunn

### 2.3.3 Zellängen-Messung

Monitor	Sony Deutschland, Köln
Videokamera	Sony Deutschland, Köln
Videoprinter	Sony Deutschland, Köln

---

### 2.3.4 Anoxie-Reoxigenierungs-Experimente

Anoxiegefäße und -verschlußdeckel	Alltrista Corp., Muncie IN (USA)
Dampfdruckkochtopf	All American, Manitowoc WI (USA)
Drucktaugliche Glasgefäße	All American, Manitowoc WI (USA)
Edelstahlkapillaren	Alltech, Deerfield IL (USA)
Gasdichte Schläuche	Kalensee, Gießen
Gasventile	Kalensee, Gießen
Perfusionskammer	Eigenbau

## 3 Methoden

### 3.1 Die Isolierung von Herzmuskelzellen adulter Ratten

#### 3.1.1 Versuchstiere

Die ventrikulären Herzmuskelzellen wurden von männlichen, 200-300 g schweren adulten Wistar-Ratten gewonnen. Diese wurden im Tierstall des Physiologischen Instituts der Justus-Liebig-Universität in Gießen gezüchtet und hatten freien Zugang zu Nahrung (Standardfutter Altromin<sup>®</sup>) und Wasser.

#### 3.1.2 Präparation von Herzmuskelzellen adulter Ratten

Die ventrikulären Kardiomyozyten wurden nach der von PIPER et al. (1982) beschriebenen Methode isoliert.

Zu Beginn der Präparation der Kardiomyozyten wurde die LANGENDORFF-Perfusionsanlage mit Powell-Medium gespült, luftblasenfrei mit 80 ml der gleichen Lösung aufgefüllt und auf 37°C erwärmt. Vor und während der Zellisolierung wurde das Powell-Medium mit Carbogen gesättigt.

Die Tiere wurden mit Diethylether narkotisiert. Der Thorax wurde eröffnet, das Herz entfernt und sofort in eiskalte isotonische NaCl-Lösung überführt. In dieser Lösung wurde das Herz von Geweberesten, wie anhängendem Mediastinal- und Pulmonalgewebe, freipräpariert, anschließend mit der Aorta in eine LANGENDORFF-Perfusionsanlage eingebunden und retrograd perfundiert. Zunächst wurde das verbliebene Blut mit 20 ml Powell-Medium ausgewaschen. Das Herz wurde anschließend mit 50 ml Collagenasepuffer für 25 Minuten rezirkulierend perfundiert. Die Flußrate wurde durch ein Ventil auf 2-3 ml / Minute pro Herz (5 ml / g Frischgewicht / Minute) eingestellt. Nach Beendigung der Rezirkulationsphase wurde das Herz unterhalb der Vorhöfe von der LANGENDORFF-Apparatur abgesetzt und zunächst mechanisch mit einem Gewebehacker bei einer Schnittbreite von 0,7 mm, anschließend manuell mit zwei Skalpellern zerkleinert. Danach wurde es unter Carbogen-Begasung für 10 Minuten in Perfusionspuffer mit 1 %

Albumin bei 37°C inkubiert. In dieser Lösung wurde die Vereinzelung der Herzmuskelzellen durch behutsames Auf- und Absaugen mit einer Pipette unterstützt.

Als nächster Schritt folgte die Filtration durch ein Nylonnetz mit 200 µm Porengröße und die Zentrifugation bei 25 x g für drei Minuten, um die Collagenase-Lösung, Zelltrümmer und kleinere Zellen, wie z.B. Endothelzellen, von den intakten Herzmuskelzellen abzutrennen. Das hierbei gebildete Pellet wurde mit Powell-Medium, welches 200 µM CaCl<sub>2</sub> enthielt, aufgenommen und nochmals bei 25 x g für zwei Minuten zentrifugiert. Danach wurde das Pellet in Powell-Medium mit 400 µM CaCl<sub>2</sub> aufgenommen und zu einer homogenen Zellsuspension aufgeschüttelt. Die Suspension wurde entsprechend der Anzahl der präparierten Herzen auf Reagenzgläser verteilt, die zuvor mit einer ca. 10 cm hohen Flüssigkeitssäule der Gradienten-Lösung gefüllt worden waren. Nach erneuter Zentrifugation (60 Sekunden bei 25 x g) erhielt man eine Zellpopulation, die zu 70-80 % aus stäbchenförmigen ventrikulären Kardiomyozyten bestand.

### 3.2 Zellkultur

Um die Anheftung der Kardiomyozyten auf dem im späteren Versuchsaufbau verwendeten Glasdeckgläschen zu gewährleisten, wurden die Deckgläschen bereits am Vorabend der Präparation zusammen mit Vorplattierungsmedium (vgl. 2.2) in die Kulturschalen gegeben und über Nacht inkubiert. Dieses Medium wurde unmittelbar vor dem Ausplattieren der präparierten Kardiomyozyten aus den Kulturschalen abgesaugt.

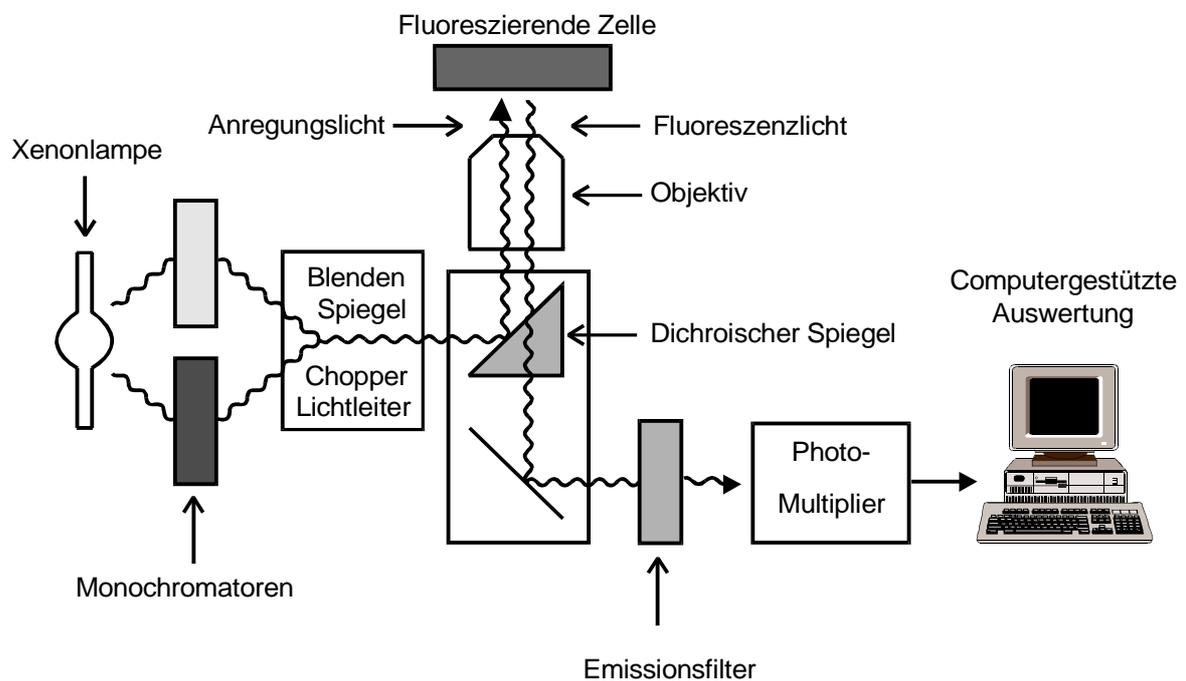
Die nach dem letzten Präparationsschritt gewonnenen Zellen eines Herzens wurden vorsichtig mit 25 ml Ausplattierungsmedium (vgl. 2.2) aufgenommen und gleichmäßig auf die vorplattierten Schalen verteilt.

Nach einer zweistündigen Inkubation bei 37°C wurden die Zellen mit Ausplattierungsmedium gewaschen. Dabei wurden abgerundete und nicht haftende Zellen entfernt und die verbliebene Kultur enthielt zu etwa 90 % intakte stäbchenförmige Kardiomyozyten (vgl. **Abb. 1.1**). Nach weiteren 2 Stunden Inkubation wurden die Zellen für die Experimente verwandt.

### 3.3 Messung der intrazellulären Ionenkonzentration von $\text{Ca}^{2+}$ , $\text{Na}^{+}$ und $\text{H}^{+}$

#### 3.3.1 Apparative Voraussetzungen

Die Messungen der intrazellulären Ionenkonzentrationen erfolgte mit Hilfe eines inversen Mikroskopes, welches in das AR-Cation Measurement System der Firma SPEX<sup>®</sup> (Grasbrunn) eingebunden war. Mit Hilfe von Monochromatoren konnte das Anregungslicht der UV-Lampe entsprechend dem Anregungsspektrum des verwendeten Fluoreszenzfarbstoffes eingestellt werden. Die somit selektierten Wellenlängen erreichten über Spiegel und Lichtleiter die Myozyten und führten dort zur Anregung des Farbstoffes. Das Fluoreszenzlicht gelangte durch einen dichroischen Spiegel und einen Emissionsfilter in den Photomultiplier des SPEX<sup>®</sup>-Systems (vgl. **Abb. 3.1**). Das entstehende Signal wurde digitalisiert und aufgezeichnet und konnte im Anschluß mit der dazugehörigen Software (DM3000CM) ausgewertet werden.



**Abb. 3.1:** Schemadarstellung der Meßanlage

### 3.3.2 Beladung der Zellen mit den Fluoreszenzfarbstoffen und Kalibrierung des Fluoreszenzsignals

#### Ermittlung der intrazellulären $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fura-2

Zur Bestimmung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration wurden die Zellen für 20 Minuten bei  $35^\circ\text{C}$  mit Fura-2 ( $2,5 \mu\text{M}$ ) in HEPES-Medium 199 beladen. Fura-2 gelangt als Acetoxymethylester in die Zelle, wird dort von zellulären Esterasen gespalten und kann infolgedessen als geladenes Molekül die Zellmembran nicht mehr durchdringen. Am Ende der Beladung erfolgte ein zweimaliges Waschen der Zellen mit HEPES-Medium 199 und eine Nachinkubationszeit von 30 Minuten. Dies war erforderlich, um eine vollständige Esterspaltung zu gewährleisten.

Die Anregung von Fura-2 erfolgte mit den Wellenlängen 340 nm und 380 nm, das Emissionsmaximum lag bei 510 nm. Die Daten der Fura-2-Messungen wurden als Verhältniszahl (Ratio) der Emissionen (340 nm / 380 nm) oder als kalibrierte Werte angegeben. Die Kalibrierung des Signals erfolgte modifiziert nach dem von Li et al. (1987) beschriebenen Protokoll.

#### Kalibrierungslösungen für $\text{Ca}^{2+}$

NaCl	10,0 mM
KCl	130,0 mM
MgSO <sub>4</sub>	1,0 mM
HEPES	25,0 mM
Ionomycin	5 $\mu\text{M}$
KCN	1mM
Nigericin	10 mg / ml
CaCl <sub>2</sub>	3 mM

#### alternativ

EGTA	5 mM
pH-Wert 6,5 oder 7,15 bei $37^\circ\text{C}$	

Zur Bestimmung der maximalen Ratio ( $R_{\max}$ ) wurde eine Kalibrierungslösung verwandt, die 3 mM  $\text{CaCl}_2$  enthielt, zur Bestimmung der minimalen Ratio ( $R_{\min}$ ) 5 mM EGTA. Um morphologische Veränderungen während des Kalibrierungsprozesses zu verhindern wurden die Zellen durch Zusatz von KCN (1 mM) metabolisch gehemmt. Die Konzentration des freien zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$  ermittelte sich nach der Formel von GRYNKIEWICZ et al. (1985):

$$[\text{Ca}^{2+}]_i = K_d \times b \times (R - R_{\min}) / (R_{\max} - R)$$

Der Faktor  $b$  wurde bestimmt durch den Quotienten der jeweiligen Emissionsintensitäten des  $R_{\min}$ -Wertes und des  $R_{\max}$ -Wertes bei 380 nm Wellenlänge. Der  $K_d$ -Wert ist ein Maß für die Bindungsaffinität von Fura-2 zu freien zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen. Dieser Wert variiert mit den experimentellen Bedingungen und ist vom intrazellulären pH-Wert abhängig. In vitro bestimmten GRYNKIEWICZ et al. (1985) für Fura-2 einen  $K_d$ -Wert von 224 nM. In vivo ermittelte sich bei einem intrazellulären pH-Wert von 7,15 ein  $K_d$ -Wert von  $312 \pm 9$  nM ( $n=8$ ), bei einem intrazellulären pH-Wert von 6,5 ein  $K_d$ -Wert von  $337 \pm 4$  nM ( $n=6$ ) (LADILOV et al. 1997). Zur Ermittlung der zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration wurde die Fura-2-Ratio mit den in vivo ermittelten  $K_d$ -Werten kalibriert.

#### Ermittlung der intrazellulären $\text{Na}^+$ -Konzentration mit dem Fluoreszenzfarbstoff SBFI

Zur intrazellulären  $\text{Na}^+$ -Messung wurden die Zellen mit dem Actoxymethylester SBFI (10  $\mu\text{M}$ ) für 30 Minuten bei 35°C beladen. Analog der Beladung mit Fura-2 schloß sich auch hier eine Waschung der Zellen mit HEPES-Medium 199 und eine Nachinkubation von 30 Minuten an. Die Anregung von SBFI erfolgte mit den Wellenlängen 340 nm und 380 nm, das Emissionsmaximum lag bei 510 nm. Die Änderungen der intrazellulären  $\text{Na}^+$ -Konzentration wurden als Verhältniszahl (Ratio) der Emissionen (340 nm / 380 nm) oder als kalibrierte Werte wiedergegeben. Die Kalibrierung erfolgte nach der von HAROOTUNIAN et al. (1989) beschriebenen Methode. Die Kalibrierungslösungen setzten sich wie folgt zusammen:

Kalibrierungslösungen für Na<sup>+</sup>

NaCl	0,0 – 140,0 mM
N-Methylglucamin	140,0 – 0,0 mM
KCl	4,7 mM
MgCl <sub>2</sub>	1,0 mM
HEPES	10,0 mM
EGTA	1,0 mM
Gramicidin D	6,0 µM
pH-Wert 6,5 oder 7,15 bei 37° C	

Um unterschiedliche Na<sup>+</sup>-Konzentrationen im Perfusionsmedium einzustellen ohne hierbei die Osmolarität der Lösung zu verändern, wurde die entsprechende Menge an NaCl durch N-Methylglucamin ersetzt. Der pH-Wert der Lösung wurde mit konz. HCl auf 7,2 bei 37°C eingestellt. Gramicidin D (6 µM) diene als Na<sup>+</sup>-Ionophor.

Ermittlung des intrazellulären pH-Wertes mit dem Fluoreszenzfarbstoffs BCECF

Zur Ermittlung des intrazellulären pH-Wertes wurden die Zellen für 15 Minuten bei 35°C mit dem Fluoreszenzfarbstoff BCECF (1,25 µM) beladen. Auch hier erfolgte nach der Beladung eine Waschung mit HEPES-Medium 199 und eine Nachinkubation von 30 Minuten. Der Farbstoff BCECF wird mit Wellenlängen von 440 nm und 490 nm angeregt, das Emissionsmaximum liegt zwischen 520 nm und 560 nm. Änderungen des pH-Wertes wurden als Änderungen der BCECF-Ratio (490 nm / 440 nm) oder als kalibrierte Werte wiedergegeben. Die Kalibrierung wurde nach der von KOOP et al. (1992) beschriebenen Methode durchgeführt. Die Kalibrierungslösungen setzten sich folgendermaßen zusammen:

Kalibrierungslösungen für H<sup>+</sup>

NaCl	10,0 mM
KCl	130,0 mM
MgCl <sub>2</sub>	1,0 mM
HEPES	25,0 mM

---

EGTA	1 mM
Nigericin	10 µg / ml
pH-Wert 6,4, 6,8 oder 7,2 bei 37° C	

Der pH-Wert der Lösungen wurde mit KOH bei 37°C auf die benötigten Werte eingestellt. Um den intrazellulären pH-Wert dem extrazellulären anzugleichen, wurde Nigericin (10 µg / ml) verwandt.

### 3.3.3 Kompartimentierung der Fluoreszenzfarbstoffe

Mit den unter 3.3.2 beschriebenen Beladungsprotokollen konnte das Verhältnis der Fluoreszenzsignale zwischen farbstoffbeladenen und nichtbehandelten Zellen optimal eingestellt werden. Angestrebt wurde eine Signalstärke, die dem 20 – 30fachen der Hintergrundaktivität entsprach.

Um das Ausmaß der intrazellulären Kompartimentierung der Farbstoffe bestimmen zu können, wurden die Zellen mit Digitonin (2,5 µM) „gehäutet“ (BORZAK et al. 1990). In dieser Konzentration permeabilisiert Digitonin die Zellmembran, ohne jedoch die Membranen der Zellorganellen zu beeinflussen (ALTSCHULD et al., 1985). Folgende Lösung wurde zur Bestimmung der Kompartimentierung verwandt:

### Kompartimentierungslösung

NaCl	5,0 mM
KCl	135,0 mM
HEPES	5,0 mM
EGTA	1,0 mM
KCN	1,0 mM
pH-Wert 7,2 bei 37° C	

Der Zusatz von KCN (1 mM) erfolgte, um morphologische Veränderungen der Zellen während dieses Vorgangs zu verhindern. Im ersten Schritt zur Messung der Kompartimentierung wurde Digitonin (2,5 µM) zugesetzt, welches zur Permeation der

Fluoreszenzfarbstoffe aus dem Zytosol führte. Die verbleibende Fluoreszenz, die sich nunmehr aus der Zellorganell- und Hintergrundfluoreszenz zusammensetzte, wurde gemessen. Um diese Parameter weiter unterscheiden zu können, erfolgte im zweiten Schritt der Zusatz von  $\text{MnCl}_2$  (1 mM) und Ionomycin (5  $\mu\text{M}$ ). Dadurch wurde die Fluoreszenz der Organellen ausgelöscht und die verbleibende Hintergrundfluoreszenz konnte bestimmt werden. Mit dieser Methode wurden folgende Kompartimentierungswerte bestimmt:

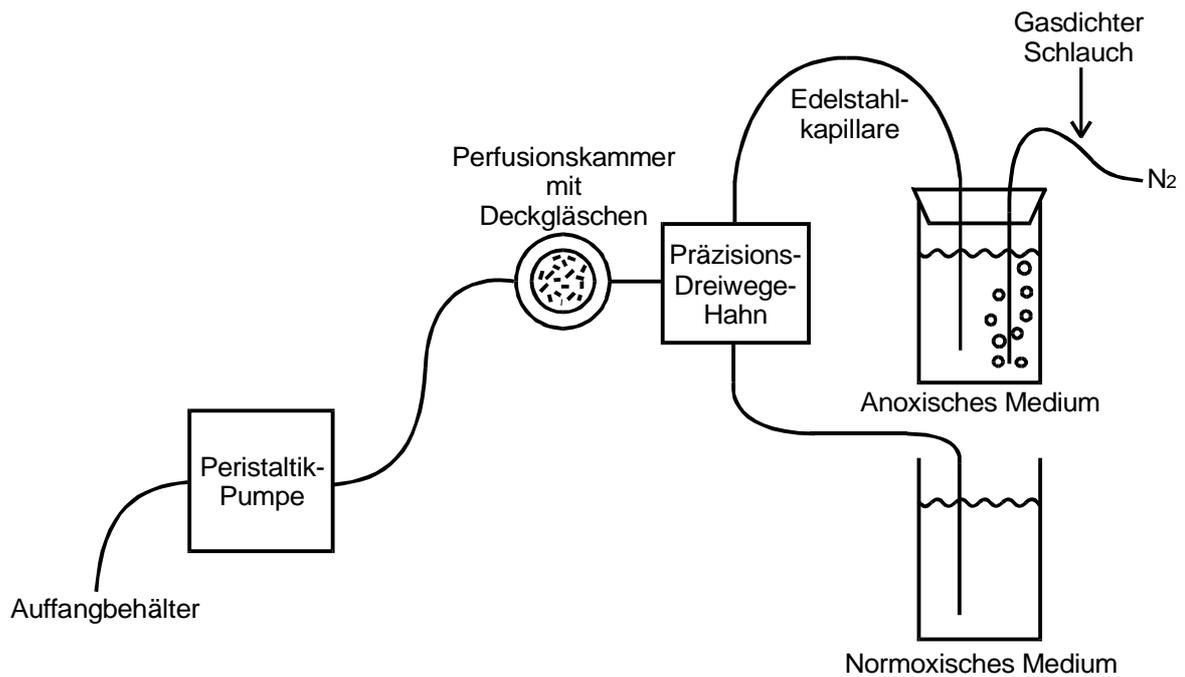
Fura-2	< 15 %
SBFI	< 10 %
BCECF	< 12 %

Anoxie und Reoxigenierung zeigten keinen signifikanten Einfluß auf das Ausmaß der Kompartimentierung.

### 3.4 Anoxie-Reoxigenierungs-Experimente

#### 3.4.1 Apparative Voraussetzungen

Zur Durchführung der Anoxie-Reoxigenierungs-Experimente war der gasdichte Verschuß des Perfusionssystems unabdingbare Voraussetzung. Die autoklavierten, sauerstofffreien Medien wurden unter Stickstoffbegasung mittels Edelstahlkapillaren mit der Perfusionskammer verbunden. In diese wurden die Deckgläschen mit den anheftenden Kardiomyozyten eingelegt und fest verschraubt. Eine Peristaltikpumpe perfundierte die Kammer mit einer Flußrate von 0,6 ml / Minute. Das anoxische Medium wurde auch während des Anoxie-Reoxigenierungs-Experimentes mit Stickstoff (100 %) begast (vgl. **Abb. 3.2**). Die Temperatur in der Kammer betrug 37°C. Diese Temperatureinstellung erfolgte mittels eines Fühlers, der sich auf der Oberfläche eines Deckgläschens befand und unter den gleichen Bedingungen wie die Zellen umspült wurde.



**Abb. 3.2:** Graphische Darstellung der Komponenten der Anoxie-Reoxigenierungs-Experimente

### 3.4.2 Versuchsprotokolle

#### Kontrollversuche und anoxisches Preconditioning

Die Durchführung der Kontrollexperimente erfolgte dergestalt, daß nach 25 Minuten normoxischer Perfusion (glukosehaltig, pH 7,4) durch den Wechsel des Perfusionsmediums für 60 Minuten eine anoxische Inkubation (glukosefrei, pH 6,4) erreicht wurde. Daran schloß sich die Phase der Reoxigenierung (glukosehaltig, pH 7,4) an. Die Veränderungen des pH-Wertes und des Substratangebotes mit Beginn der anoxischen Perfusion und der Reoxigenierung dienten der Simulation von Ischämie und Reperfusion im Gewebe.

Anoxisches Preconditioning wurde in diesem Modell durch eine zehnminütige Anoxie (glukosefrei, pH 6,4) mit anschließender zehnminütiger Reoxigenierung (glukosehaltig, pH 7,4) vor dem Beginn der langen Anoxie (glukosefrei, pH 6,4) erreicht.

Die eingesetzten Hemmstoffe wurden jeweils vor und während der Anoxie eingesetzt. Bisindolylmaleimid ist in der verwendeten Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  ein selektiver Hemmstoff der Proteinkinase C. Cantharidin ist in der eingesetzten Konzentration von 20  $\mu\text{M}$  ein Hemmstoff der Proteinphosphatasen 1 und 2A (NEUMANN et al., 1995). KB-R7943 ist in einer Konzentration von 20  $\mu\text{M}$  ein selektiver Hemmstoff des „Reverse Mode“ des Natrium-Calcium-Austauschers (IWAMOTO, WATANO et al. 1996, LADILOV, HAFFNER et al. 1999). Vgl. auch **Abb. 3.3**.

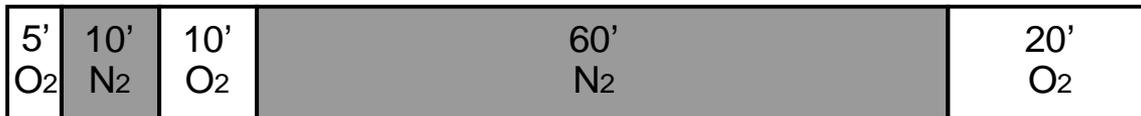
### Natrium-Entzugsexperimente

Um die Beteiligung des  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers im „Reverse Mode“ an der  $\text{Ca}^{2+}$ -Überladung bzw. an deren Beeinflussung zu untersuchen, wurden die Zellen nach einem modifizierten Protokoll in Kontroll- und Preconditioning-Experimenten untersucht. Hierzu wurde die lange anoxische Perfusion mit  $\text{Ca}^{2+}$ -freiem Medium begonnen. Etwa 10 – 15 Minuten nach Eintritt der Rigorkontraktur wurde, weiterhin unter anoxischen Bedingungen, mit  $\text{Na}^+$ -freiem aber  $\text{Ca}^{2+}$ -haltigen Medium perfundiert (Zusammensetzung vgl. 2.2.3). Dieser  $\text{Na}^+$ -Entzug im Perfusionsmedium führte zur Aktivierung des  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers im „Reverse Mode“ und somit zur  $\text{Ca}^{2+}$ -Überladung der Zellen, ein Vorgang, der sich in der Regel innerhalb von Sekunden abspielte (vgl. **Abb. 4.8**). Zur Auswertung wurde die maximale Anstiegsgeschwindigkeit  $[(d\text{Fura-2-Ratio} / dt)_{\text{max}}]$  herangezogen.

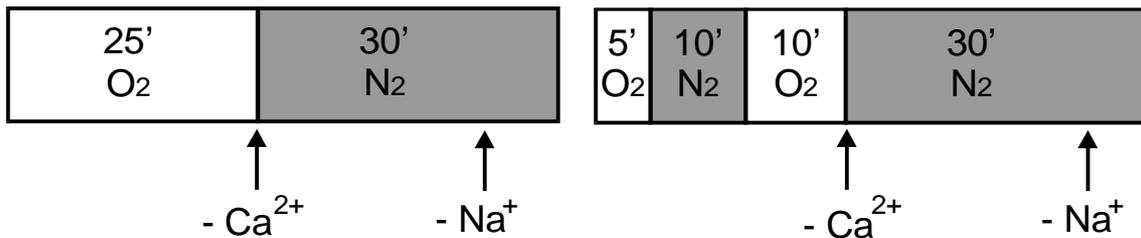
Um unter diesen experimentellen Bedingungen eine Beteiligung des sarkoplasmatischen Retikulums an der zellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase auszuschließen, wurden die Zellen mit Thapsigargin (100 nM, 30 Minuten) und Ryanodin (3 $\mu\text{M}$ ) fünf Minuten vor dem  $\text{Na}^+$ -Entzug inkubiert. Darüberhinaus wurde der Natrium-Protonen-Austauscher (NHA) mit HOE 642 (3  $\mu\text{M}$ , 5 Minuten) gehemmt. Nach dieser Vorbehandlung wurden die Zellen mit  $\text{Na}^+$ -freiem Medium, welches ebenfalls Ryanodin, Thapsigargin, HOE 642 und Ouabain (300  $\mu\text{M}$ ) enthielt, perfundiert. Weiterhin konnte durch den Einsatz von KB-R7943 in den verschiedenen Protokollen eine nahezu vollständige, selektive Hemmung des  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers im „Reverse Mode“ erreicht werden und die unter dieser Substanz gehemmte Anstiegsgeschwindigkeit (LADILOV et al. 1999) zum Vergleich mit Kontroll- und Preconditioning-Experimenten herangezogen werden.



Protokoll der Kontrolleexperimente



Protokoll der Preconditioning-Experimente



Kontrolle

Preconditioning

Protokolle der Natrium - Entzugsexperimente (Kontrolle und Preconditioning)

**Abb. 3.3: Graphische Darstellung der verschiedenen experimentellen Protokolle**

### 3.4.3 Meßparameter

Die Calcium- und Natriumkonzentration und der pH-Wert sind als errechnete Einheiten der jeweiligen Fluoreszenzfarbstoff-Ratio oder als kalibrierte Absolutwerte angegeben. Sie wurden mit den oben beschriebenen Methoden ermittelt. Die Rigorzeit ist die Zeitdifferenz zwischen Anoxiebeginn und Eintritt der Rigorkontraktur, angegeben in Minuten. Angaben zur Zellängenänderung bei Rigor- oder Hyperkontraktur beziehen sich immer auf die Zelllänge bei Versuchsbeginn und erfolgen in Prozent. Sie wurden durch Vermessung der Zellen anhand der Videoaufzeichnung ermittelt. Die maximal erreichte Anstiegsgeschwindigkeit der Fura-2-Ratio unter Na<sup>+</sup>-Entzug (dFura-2-Ratio / dt)<sub>max</sub> wurde graphisch aus den Original-Meßdaten bestimmt (vgl. **Abb. 4.8**).

### 3.4.4 Statistik

Die Daten sind als Mittelwerte ± Standardfehler des Mittelwertes von n verschiedenen Zellen wiedergegeben. Im Regelfall wurden 5 – 8 Zellen pro Experiment

beobachtet, der Mittelwert wurde somit aus 20 – 60 Zellen aus 4 – 10 Experimenten gebildet.

Statistische Vergleiche wurden durch einfache Varianzanalyse (ANOVA), gefolgt vom Bonferroni-Test, durchgeführt (WALLENSTEIN et al. 1980). Unterschiede mit  $p < 0,05$  wurden als statistisch signifikant angesehen.

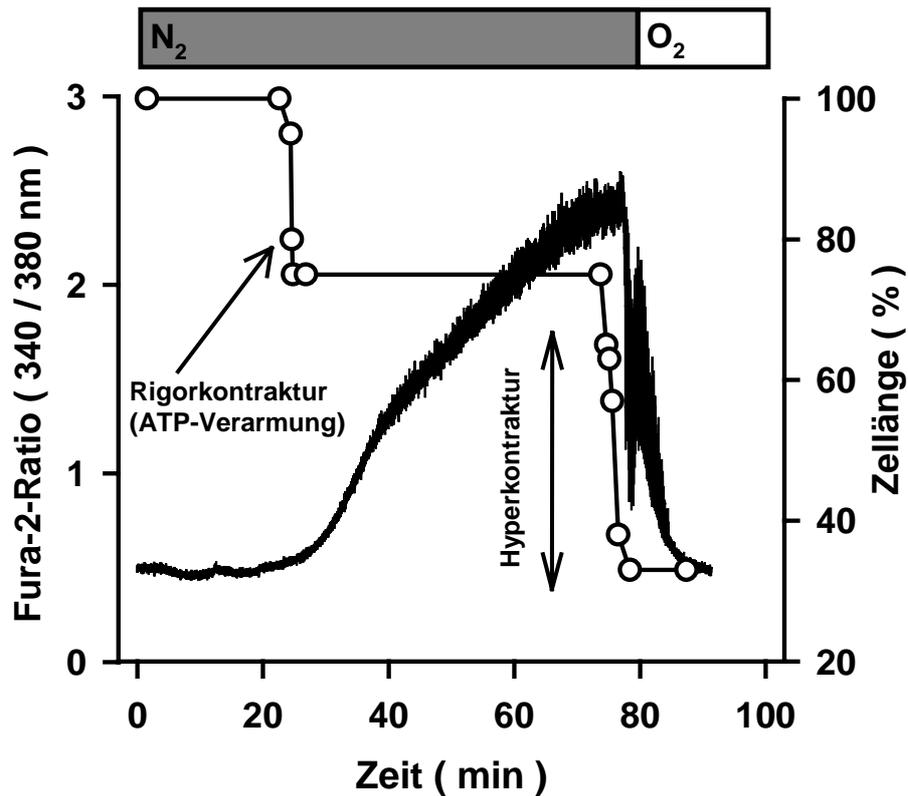
## 4 Ergebnisse

### 4.1 Auswirkungen anoxischen Preconditionings auf die $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase der Zellen

#### 4.1.1 Kontrolle und anoxisches Preconditioning

Unter normoxischen Bedingungen verhielten sich die Kardiomyozyten ruhig. Sie zeigten eine Konzentration des zytosolischen freien  $\text{Ca}^{2+}$ , die konstant bei  $68 \pm 3\text{nM}$  lag. Bei Zellen der Kontrollgruppe führte die Superfusion der Zellen mit anoxischem, glukosefreien Medium bei einem pH-Wert von 6,4 zu einer Überladung des Zytosols mit  $\text{Ca}^{2+}$ , die sich in einem Anstieg der Fura-2-Ratio zeigte (**Abb. 4.1, Abb. 4.2**). Durch Kalibrierung der Fura-2-Ratio nach der in Abschnitt 3.3.2 beschriebenen Methode konnte die endanoxische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration berechnet werden. Sie entsprach  $2,14 \pm 0,09 \mu\text{M}$  ( $n=28$ ). Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Überladung begann unmittelbar nachdem die Zellen eine Rigorkontraktur entwickelten, also nach  $16,5 \pm 0,5\text{minütiger}$  Anoxiedauer. Bei der Reoxigenierung nach 60minütiger Anoxiedauer kehrte die Fura-2-Ratio innerhalb von 10 Minuten auf ihren Ausgangswert zurück. Dieser Verlauf kann anhand der Originalregistrierung in **Abb 4.1** nachvollzogen werden.

Durch anoxisches Preconditioning konnte die endanoxische  $\text{Ca}^{2+}$ -Überladung signifikant vermindert werden ( $1,61 \pm 0,13 \mu\text{M}$ ,  $n=31$ ,  $p<0,05$  vs. Kontrolle). Bemerkenswert ist hierbei, daß es durch anoxisches Preconditioning zu einer früheren Erschöpfung der ATP-Reserven als unter Kontrollbedingungen kommt. Die Rigor-Kontraktur setzt somit früher ein als unter Kontrollbedingungen ( $13,1 \pm 0,6 \text{ min}$ ,  $p<0,01$  vs. Kontrolle). Die bei durch anoxisches Preconditioning behandelten Zellen beobachtete Verminderung der zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Überladung kann somit nicht durch eine spätere Erschöpfung der für zelluläre Transportmechanismen zur Verfügung stehenden Energie erklärt werden.



**Abb. 4.1:** Zeitlicher Verlauf des Anstiegs der zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration anhand der Fura-2-Ratio (340 / 380 nm - Relativeinheiten) und der Zelllänge in einer einzelnen Herzmuskelzelle während Anoxie (0 – 80 min) und Reoxygenierung (80 – 100 min). Es handelt sich um die Originalregistrierung eines Kontrollexperimentes. Deutlich zu erkennen ist der kurz nach der Rigorkontraktur einsetzende Anstieg der zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration und deren schneller Abfall während der Reoxygenierung. Außerdem zeigt die Registrierung der Zelllänge die Verkürzung der Zellen unter Reoxygenierung (Hyperkontraktur).

#### 4.1.2 Proteinkinase C -Hemmung in Kontrollgruppen und bei anoxischem Preconditioning

Die Zugabe des Proteinkinase C -Hemmstoffs Bisindolylmaleimid in einer Konzentration von  $1\mu\text{M}$  vor und während der Anoxie blieb unter Kontrollbedingungen ohne Effekt auf den Zeitpunkt der Rigorkontraktur und die zytosolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Überladung (**Abb. 4.2**). Im Gegensatz hierzu führte die Behandlung mit Bisindolylmaleimid bei Zellen, die anoxischem Preconditioning unterzogen wurden, zu einer Verminderung der zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Überladung ( $0,75 \pm 0,06 \mu\text{M}$ ,  $n=37$ ,  $p<0,05$  vs. Kontrolle und anoxisches Preconditioning) (**Abb. 4.2**). Die Entwicklung der Rigorkontraktur bei diesen Zellen geschah hingegen zeitgleich. Die Behandlung mit Bisindolylmaleimid scheint hier

einen protektiven Effekt anoxischen Preconditionings auf die  $\text{Ca}^{2+}$ -Überladung der Zellen aufzudecken.

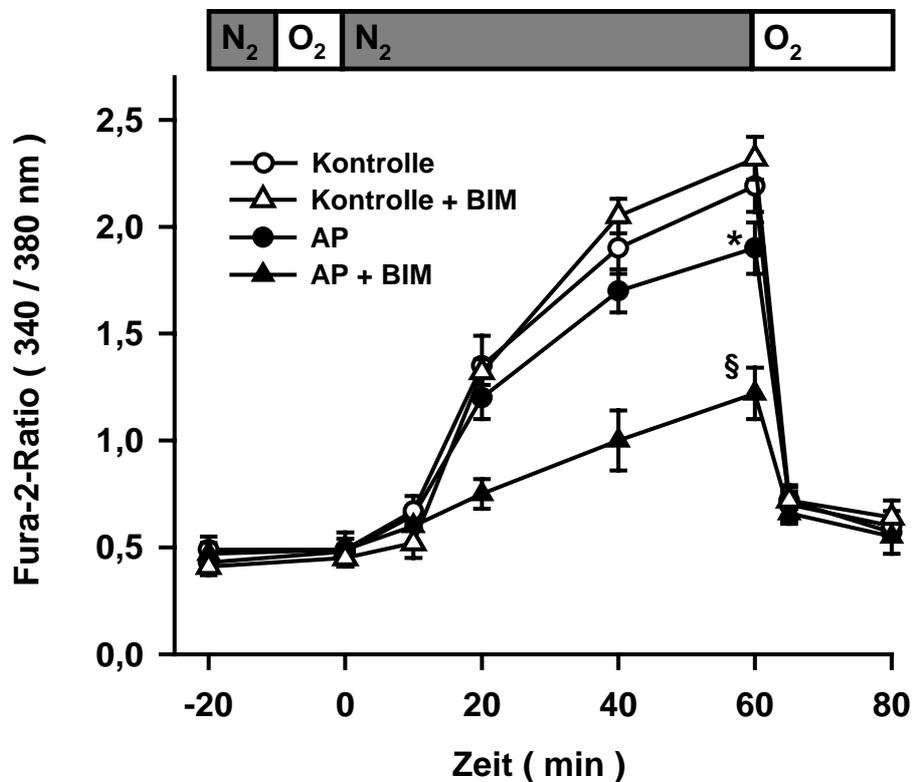


Abb. 4.2: Zeitlicher Verlauf des Anstiegs der zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration anhand der Fura-2-Ratio (340 / 380 nm - Relativeinheiten) in Kardiomyozyten während Anoxie und Reoxigenierung. Es wurden die folgenden experimentellen Protokolle durchgeführt: Kontrolle (Kontrolle, n = 28), Kontrolle in Gegenwart von 1  $\mu\text{M}$  Bisindolylmaleimid (Kontrolle + BIM, n = 18), anoxisches Preconditioning (AP, n = 31), und anoxisches Preconditioning in Gegenwart von 1  $\mu\text{M}$  Bisindolylmaleimid (AP + BIM, n = 37). Bisindolylmaleimid wurde jeweils über die gesamte Versuchsdauer appliziert. Die Daten sind dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  SEM. \* -  $p < 0,05$  vs. Kontrolle, § -  $p < 0,05$  vs. Kontrolle und anoxisches Preconditioning. Es zeigte sich eine deutliche Verminderung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Überladung unter Anoxie bei anoxischem Preconditioning in Gegenwart von Bisindolylmaleimid, nicht jedoch in Kontrollexperimenten in Gegenwart von Bisindolylmaleimid.

Um auszuschließen, daß der protektive Effekt anoxischen Preconditionings in Gegenwart von Bisindolylmaleimid die Folge der kurzen Azidose während des Preconditioning-Protokolls ist, wurde in einem Kontrollexperiment eine pH-abgesenkte und glukosefreie normoxische Episode anstelle des anoxischen Preconditionings der langen Anoxieperiode vorangestellt. Es zeigte sich, daß dieses „normoxische

Preconditioning“ keine Protektion zu bewirken vermochte (Abb. 4.3). Die beobachteten protektiven Effekte müssen also im Zusammenhang mit Vorgängen unter Anoxie stehen.

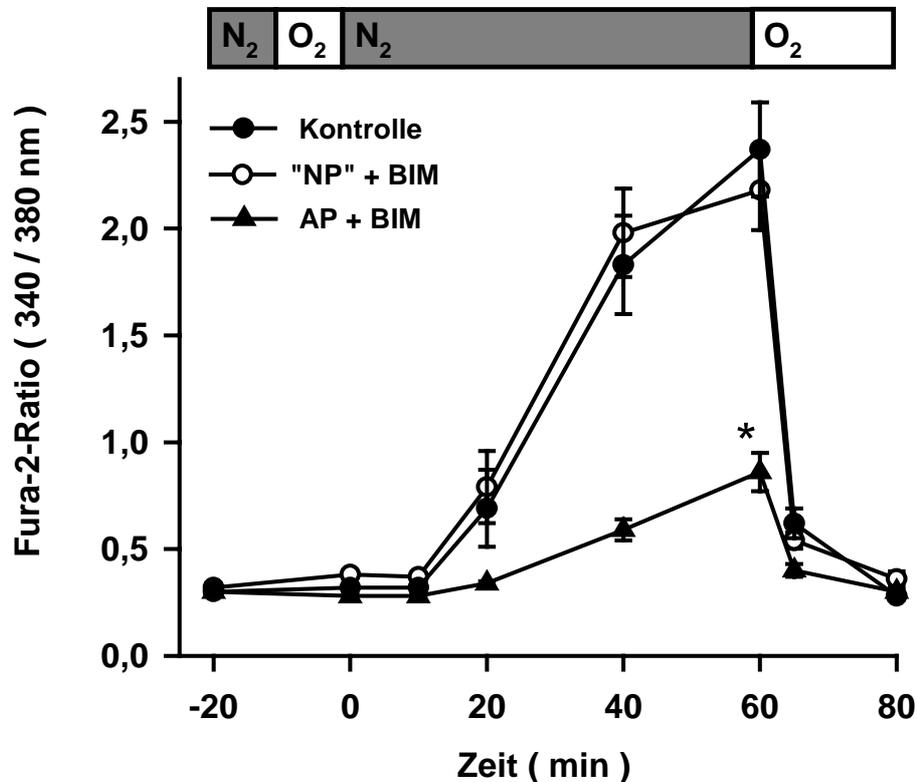


Abb. 4.3: Zeitlicher Verlauf des Anstiegs der zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration anhand der Fura-2-Ratio (340 / 380 nm - Relativeinheiten) in Kardiomyozyten während Anoxie und Reoxigenierung. Es wurden die folgenden experimentellen Protokolle durchgeführt: Kontrollexperimente (Kontrolle, n = 9), „normoxisches Preconditioning“ in Gegenwart von 1  $\mu\text{M}$  Bisindolylmaleimid, also wie anoxisches Preconditioning, jedoch mit Normoxie während des 10minütigen Preconditionings („NP“ + BIM, n = 19), anoxisches Preconditioning in Gegenwart von 1  $\mu\text{M}$  Bisindolylmaleimid (AP + BIM, n = 9). Bisindolylmaleimid wurde jeweils über die gesamte Versuchsdauer appliziert. Die experimentellen Protokolle sind in Abb. 3.3 veranschaulicht. Die Daten sind dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  SEM, \* -  $p < 0,05$  vs. Kontrolle. Es zeigte sich, daß anoxisches Preconditioning in Gegenwart von Bisindolylmaleimid eine Verminderung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Überladung zu bewirken vermochte, „normoxisches Preconditioning“ in Gegenwart von Bisindolylmaleimid hingegen nicht.

#### 4.1.3 Beteiligung von Proteinphosphatasen an der beobachteten Protektion

Um zu überprüfen, ob dieser durch anoxisches Preconditioning induzierte Schutz auf eine Aktivierung von Proteinphosphatasen zurückzuführen ist, wurden die

Versuchsprotokolle in Gegenwart von Cantharidin (20  $\mu\text{M}$ ) wiederholt. Cantharidin ist ein Hemmstoff sowohl der Proteinphosphatase 1 als auch der Proteinphosphatase 2A. Unter Kontrollbedingungen wie auch bei durch anoxisches Preconditioning behandelten Zellen zeigte sich eine unverändert hohe  $\text{Ca}^{2+}$ -Überladung, wohingegen der protektive Effekt von Bisindolylmaleimid bei durch anoxisches Preconditioning behandelten Zellen völlig aufgehoben werden konnte. (Abb. 4.4)

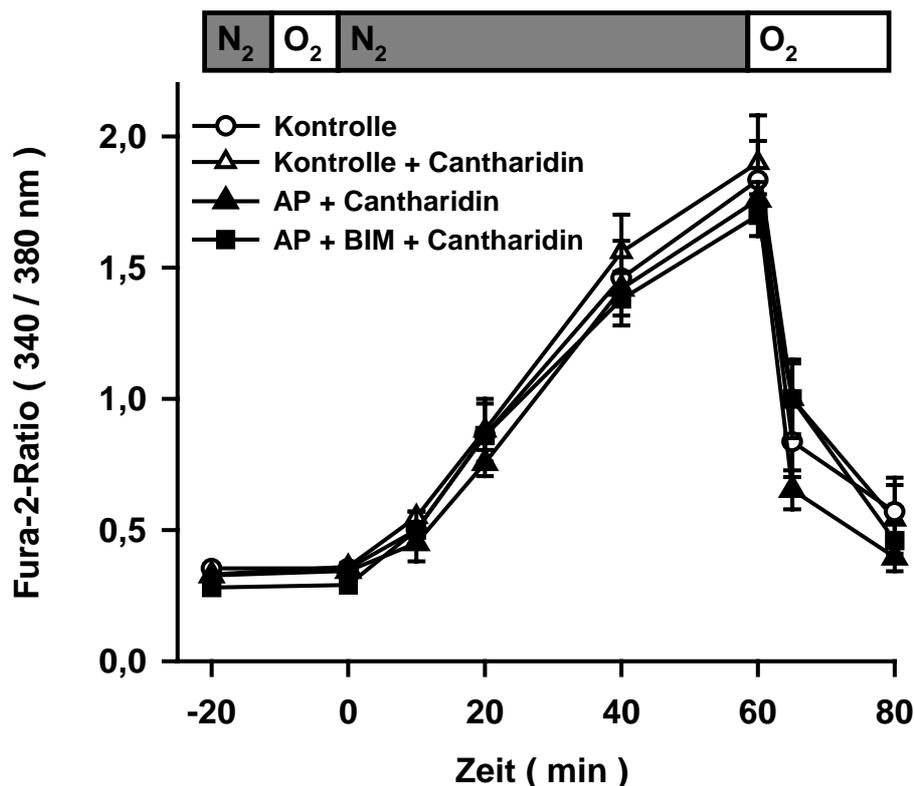
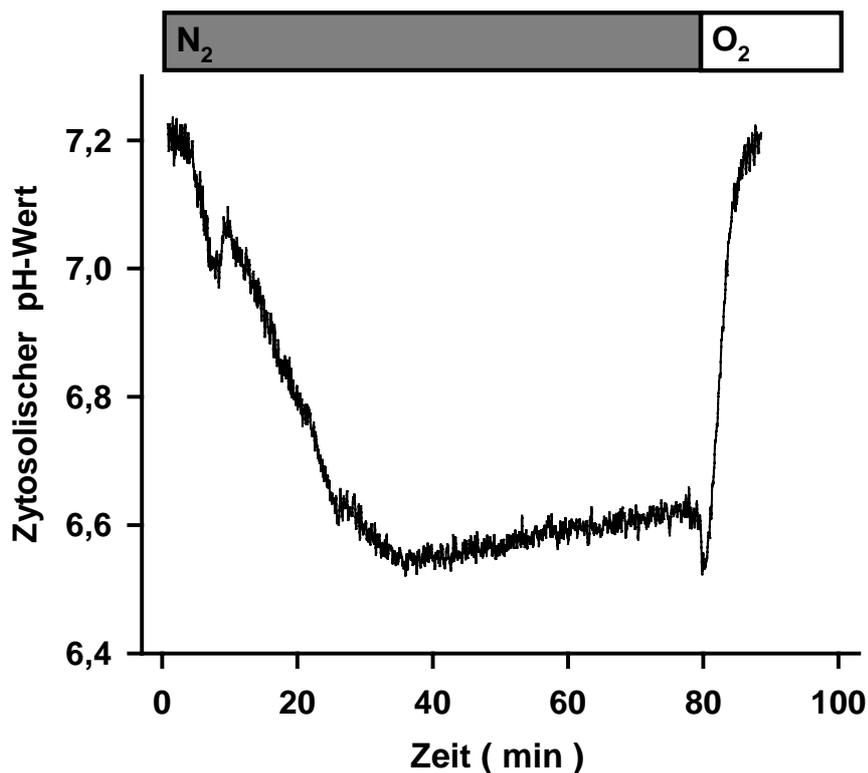


Abb 4.4: Zeitlicher Verlauf des Anstiegs der zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration anhand der Fura-2-Ratio (340 / 380 nm - Relativeinheiten) in Kardiomyozyten während Anoxie und Reoxigenierung. Es wurden die folgenden experimentellen Protokolle durchgeführt: Kontrolle (Kontrolle,  $n = 22$ ), Kontrolle in Gegenwart von 20  $\mu\text{M}$  Cantharidin (Kontrolle + Cantharidin,  $n = 17$ ), anoxisches Preconditioning in Gegenwart von 20  $\mu\text{M}$  Cantharidin (AP + Cantharidin,  $n = 36$ ), und anoxisches Preconditioning in Gegenwart von 1  $\mu\text{M}$  Bisindolylmaleimid und 20  $\mu\text{M}$  Cantharidin (AP + BIM + Cantharidin,  $n = 27$ ). Die experimentellen Protokolle sind in Abb. 3.3 veranschaulicht. Bisindolylmaleimid und Cantharidin wurde jeweils über die gesamte Versuchsdauer appliziert. Die Daten sind dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  SEM. Die Unterschiede sind statistisch nicht signifikant. Somit zeigte sich, daß Cantharidin die Verminderung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Überladung durch anoxisches Preconditioning in Gegenwart von Bisindolylmaleimid aufzuheben vermochte.

#### 4.3 Auswirkungen anoxischen Preconditionings auf den zytosolischen pH-Wert

Um die ischämische Azidose zu simulieren, wurden die Anoxie bei einem extrazellulären pH-Wert von 6,4 durchgeführt. Unter diesen Bedingungen sank der intrazelluläre pH-Wert der Kontrollzellen im Verlauf einer 60minütigen Anoxie von  $7,15 \pm 0,02$  auf  $6,47 \pm 0,02$  ( $n=42$ ) (**Abb 4.5, Tabelle 4.1**). Anoxisches Preconditioning alleine ( $6,5 \pm 0,04$ ;  $n=24$ ), in Kombination mit Bisindolylmaleimid ( $6,49 \pm 0,03$ ;  $n=29$ ) oder mit Bisindolylmaleimid und Cantharidin ( $6,45 \pm 0,04$ ;  $n=21$ ) hatte keine Auswirkungen auf den endanoxischen intrazellulären pH-Wert. Während der Reoxygenierung erfolgte die Rückkehr des intrazellulären pH-Wertes auf präanoxische Werte unter allen Versuchsbedingungen mit vergleichbarer Geschwindigkeit.



**Abb. 4.5:** Zeitlicher Verlauf des zytosolischen pH-Wertes während Anoxie (0 – 80 min) und Reoxygenierung (80 – 100 min), gemessen anhand der BCECF-Ratio (490 / 440 nm) und kalibriert nach der in Abschnitt 3.3.2 beschriebenen Methode. Es handelt sich um die Originalregistrierung eines Kontrollexperimentes. Deutlich zu erkennen ist der Abfall des pH-Wertes im Verlaufe der Anoxie und die zügige Erholung auf prä-anoxische Werte unter Reoxygenierung.

Protokolle	Normoxie	60 min Anoxie	5 min Reox.	20 min Reox.
Kontrolle (n=42)	7,15 ± 0,02	6,47 ± 0,02	6,81 ± 0,03	7,20 ± 0,02
AP (n=24)	7,18 ± 0,02	6,50 ± 0,04	6,74 ± 0,05	7,24 ± 0,03
AP+BIM (n=29)	7,16 ± 0,02	6,49 ± 0,03	6,74 ± 0,04	7,17 ± 0,03
AP+BIM+Cantharidin (n=21)	7,13 ± 0,01	6,45 ± 0,04	6,76 ± 0,03	7,25 ± 0,03

**Tabelle 4.1 Die Entwicklung des intrazellulären pH-Wertes. Dargestellt sind die pH-Werte vor der Anoxie (Normoxie), nach 60minütiger Anoxie und nach 5 sowie nach 20 Minuten Reoxigenierung als Mittelwerte ± SEM. Die folgenden experimentellen Protokolle sind dargestellt: Kontrolle (n = 42), anoxisches Preconditioning (AP, n = 24), anoxisches Preconditioning in Gegenwart von 1µM Bisindolylmaleimid (AP + BIM, n = 29) und anoxisches Preconditioning in Gegenwart von 1µM Bisindolylmaleimid und 20 µM Cantharidin (AP + BIM + Cantharidin, n = 21). Die Unterschiede sind statistisch nicht signifikant.**

#### 4.2 Auswirkungen anoxischen Preconditionings auf die Reoxigenierungs-induzierte

##### Hyperkontraktur

Die Reoxigenierung der Zellen der Kontrollgruppe nach 60minütiger Anoxie führte innerhalb der ersten fünf Minuten zu einer irreversiblen Verkürzung der Zellen auf ca. 30 % der Ausgangslänge, also zur Hyperkontraktur (**Abb. 4.6, vgl. auch Abb. 1.1**). Die Behandlung der Zellen unter Kontrollbedingungen mit Bisindolylmaleimid oder Cantharidin konnte das Ausmaß der Hyperkontraktur nicht signifikant beeinflussen. Zellen, welche anoxischem Preconditioning unterzogen wurden, zeigten eine geringe, aber dennoch signifikante Verminderung der Hyperkontraktur. Einzig unter Anwesenheit von Bisindolylmaleimid konnte bei Zellen unter anoxischem Preconditioning eine deutliche Reduktion der Hyperkontraktur beobachtet werden. Diese Protektion konnte wiederum durch Zugabe von Cantharidin vollständig aufgehoben werden, wohingegen Cantharidin bei alleinig durch anoxisches Preconditioning vorbehandelten Zellen die Entwicklung der Hyperkontraktur nicht beeinflussen konnte.

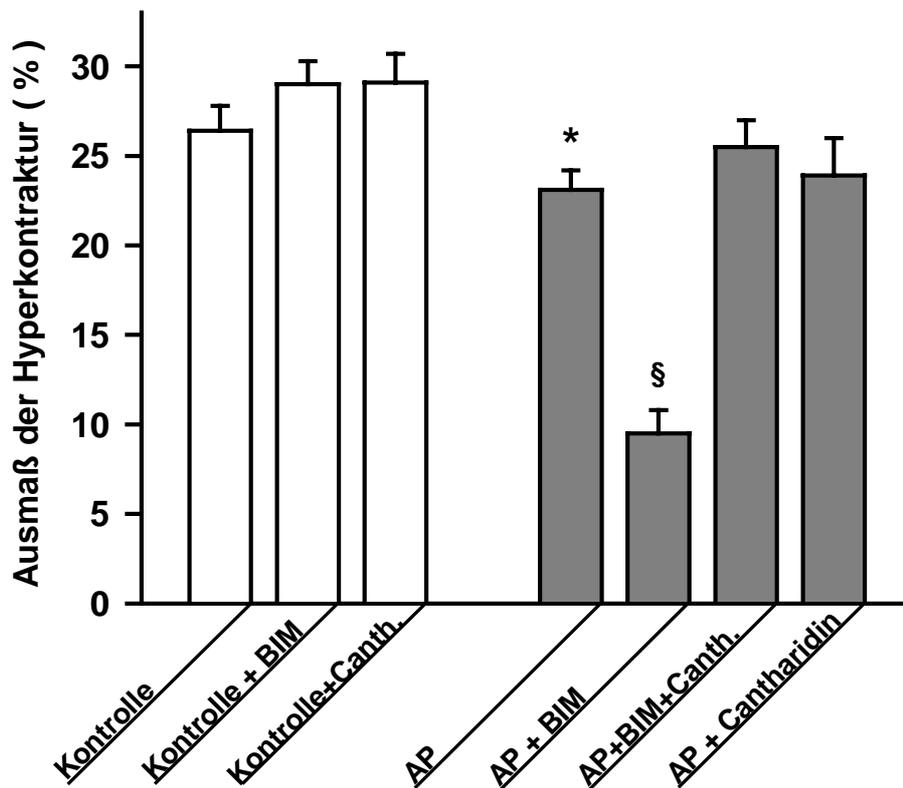


Abb 4.6: Ausmaß der sich während 20minütiger Reoxigenierung entwickelnden Hyperkontraktur nach 60minütiger Anoxie. Die Daten wurden von den gleichen Zellen gewonnen, bei denen auch die in den vorigen Abschnitten beschriebene  $\text{Ca}^{2+}$ -Messung erfolgte. Demgemäß wurden die folgenden experimentellen Protokolle herangezogen: Kontrollexperimente (Kontrolle, n = 28), Kontrollexperimente in Gegenwart von 1  $\mu\text{M}$  Bisindolylmaleimid (Kontrolle + BIM, n = 18), Kontrollexperimente in Gegenwart von 20  $\mu\text{M}$  Cantharidin (Kontrolle + Cantharidin, n = 17), anoxisches Preconditioning (AP, n = 31), anoxisches Preconditioning in Gegenwart von 1  $\mu\text{M}$  Bisindolylmaleimid (AP + BIM, n = 37), anoxisches Preconditioning in Gegenwart von 1  $\mu\text{M}$  Bisindolylmaleimid und 20  $\mu\text{M}$  Cantharidin (AP + BIM + Cantharidin, n = 27) und anoxisches Preconditioning in Gegenwart von 20  $\mu\text{M}$  Cantharidin (AP + Cantharidin, n = 36). Bisindolylmaleimid und Cantharidin wurde jeweils über die gesamte Versuchsdauer appliziert. Die Darstellung erfolgt in % der normoxischen Zelllänge. Kontrollgruppen sind weiß, durch anoxisches Preconditioning behandelte Gruppen grau dargestellt. Die Daten sind Mittelwerte  $\pm$  SEM. \* - p < 0,05 vs. Kontrolle ohne Behandlung. § - p < 0,05 vs. anoxisches Preconditioning ohne Behandlung.

#### 4.5 Auswirkungen anoxischen Preconditionings auf die zytosolische Na<sup>+</sup>-Konzentration

Unter anoxischen Bedingungen ist eine intrazelluläre Ansammlung von Na<sup>+</sup> eine wichtige Ursache für die Aktivierung des Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>-Austauschers im „Reverse Mode“. Um zu untersuchen, inwieweit eine Veränderung des zytosolischen Na<sup>+</sup> für die Auswirkungen des anoxischen Preconditionings auf das zytosolische Ca<sup>2+</sup> verantwortlich ist, wurde die zytosolische Na<sup>+</sup>-Konzentration mittels des Fluoreszenzfarbstoffs SBFI gemessen.

Unter Kontrollbedingungen stieg die SBFI-Ratio während 60minütiger Anoxie von 1 auf 1,45 an (**Abb. 4.7**), entsprechend einem Na<sup>+</sup>-Anstieg von  $5,0 \pm 0,7$  mM auf  $85,0 \pm 6$  mM (n=38). Die Behandlung von Kontrollzellen mit Bisindolylmaleimid oder Cantharidin zeigte keinen signifikanten Effekt auf das Ausmaß der zytosolischen Na<sup>+</sup>-Überladung zum Ende der Anoxie. Anoxisches Preconditioning für sich hatte ebenfalls keinen Effekt. Lediglich in Gegenwart von Bisindolylmaleimid war bei anoxischem Preconditioning der Anstieg der SBFI-Ratio deutlich vermindert, entsprechend einer verminderten endanoxischen Na<sup>+</sup>-Überladung der Zellen von  $41 \pm 6$  mM (n=39, p<0,05 vs. Kontrolle). Auch hier konnte durch zusätzliche Behandlung mit Cantharidin die endanoxische Na<sup>+</sup>-Reduktion aufgehoben werden (entsprechend einer Na<sup>+</sup>-Konzentration von  $80 \pm 7$  mM, n=27, p<0,05 vs. Kontrolle).

Wie im Fall der Ca<sup>2+</sup>-Überladung scheint auch hier die Hemmung der Proteinkinase C durch Bisindolylmaleimid einen protektiven Effekt des anoxischen Preconditionings auf die Na<sup>+</sup>-Überladung aufzudecken. Dieser protektive Effekt steht offenbar im Zusammenhang mit Proteinphosphatasen, da er durch deren Hemmung aufhebbar ist.

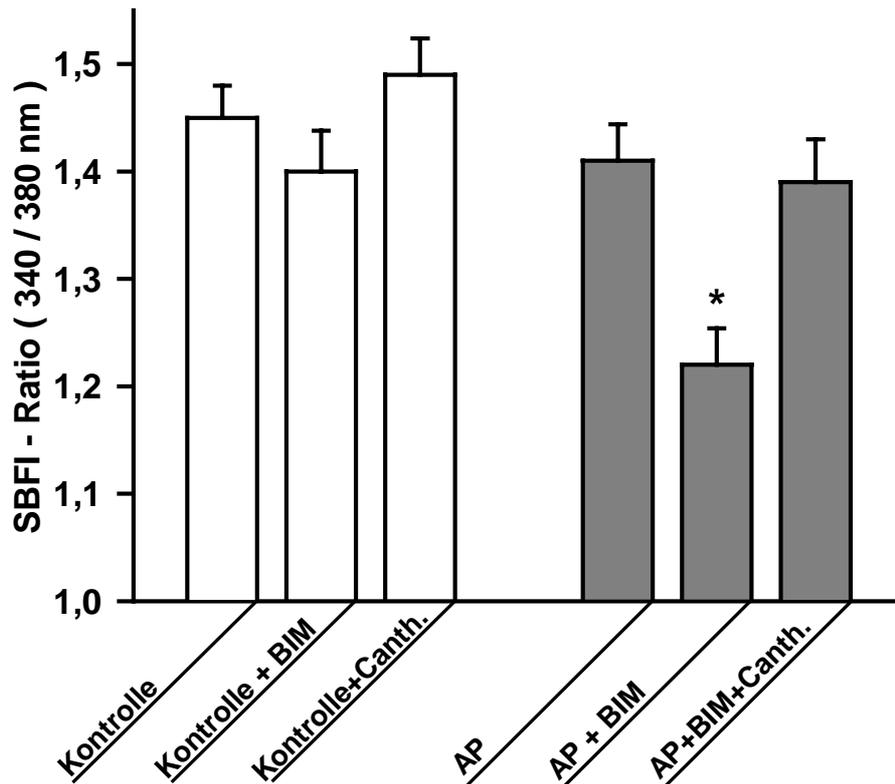
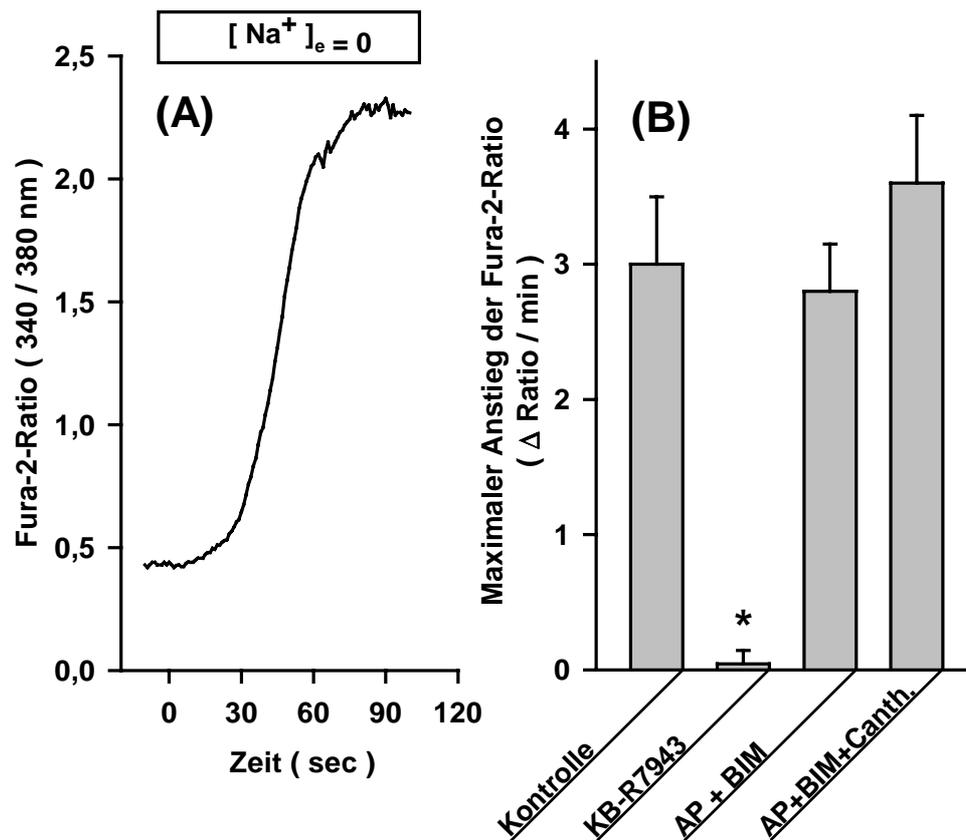


Abb. 4.7: Das Ausmaß der zytosolischen  $\text{Na}^+$ -Überladung nach 60minütiger Anoxie. Dargestellt sind Einheiten der SBFI-Ratio (340 / 380 nm-Relativeinheiten). Es wurden die folgenden experimentellen Protokolle durchgeführt: Kontroll-experimente (Kontrolle,  $n = 38$ ), Kontrollexperimente in Gegenwart von  $1 \mu\text{M}$  Bisindolylmaleimid (Kontrolle + BIM,  $n = 29$ ), anoxisches Preconditioning (AP,  $n = 42$ ), anoxisches Preconditioning in Gegenwart von  $1 \mu\text{M}$  Bisindolylmaleimid (AP + BIM,  $n = 39$ ) und anoxisches Preconditioning in Gegenwart von  $1 \mu\text{M}$  Bisindolylmaleimid und  $20 \mu\text{M}$  Cantharidin (AP + BIM + Cantharidin,  $n = 27$ ). Bisindolylmaleimid und Cantharidin wurden jeweils über die gesamte Versuchsdauer appliziert. Die Versuchsprotokolle sind in Abb. 3.3 veranschaulicht. Die Daten sind Mittelwerte  $\pm$  SEM. \* -  $p < 0,05$  vs. Kontrolle und AP. Eine Hemmung der Proteinkinase C konnte bei anoxischem Preconditioning signifikant die  $\text{Na}^+$ -Überladung während Anoxie vermindern.

#### 4.4 Auswirkungen anoxischen Preconditionings auf den Reverse Mode des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers

Der „Reverse Mode“ des  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers ist die Hauptursache der zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Überladung in energieverarmten Kardiomyozyten (LADILOV, HAFFNER et al. 1999). Die Aktivität dieses „Reverse Mode“ wird durch Phosphorylierung geregelt (IWAMOTO, PAN et al. 1996). Aus diesem Grund wurde untersucht, inwieweit anoxisches Preconditioning die Aktivität des „Reverse Mode“ des  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers verändert und inwieweit hierbei eine Beteiligung der Proteinkinase C und Proteinphosphatasen gegeben ist. Hierzu wurden die Kardiomyozyten mit  $\text{Na}^+$ -freiem Medium superfundiert, was zu einer maximalen Aktivierung des  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers führte.

Der  $\text{Na}^+$ -Entzug führte unter Anoxiebedingungen zu einem massiven Anstieg der zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration, welcher im Anstieg der Fura-2-Ratio deutlich wurde (**Abb. 4.8a**). Wurde der  $\text{Na}^+$ -Entzug in Gegenwart von 20  $\mu\text{M}$  KB-R7943, einem spezifischen Hemmstoff des „Reverse Mode“ des  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers (IWAMOTO, WATANO et al. 1996), durchgeführt, blieb der  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg aus (**Abb. 4.8b**). Eine Hemmung der Proteinkinase C durch Bisindolylmaleimid vermochte die Aktivität des „Reverse Mode“ des  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers nicht zu beeinflussen, ebensowenig wie eine Hemmung der Proteinphosphatasen 1 und 2A.



**Abb. 4.8:  $Na^+$ -Entzugsexperimente** (A) Der Anstieg der Fura-2 Ratio (340 / 380 nm, Original-Registrierung) in isolierten Kardiomyozyten bei Superfusion mit  $Na^+$ -freiem Medium unter anoxischen Bedingungen. (B) Die maximale Aktivität des  $Na^+/Ca^{2+}$ -Austauschers anhand der Anstiegsgeschwindigkeit der Fura-2-Ratio in  $Na^+$ -Entzugsexperimenten. Es wurden die folgenden experimentellen Protokolle durchgeführt: Kontrollexperimente (Kontrolle,  $n = 12$ ), Kontrollexperimente in Gegenwart von 20  $\mu M$  KB-R7943, einem spezifischen Hemmstoff des „Reverse Mode“ des  $Na^+/Ca^{2+}$ -Austauschers (KB-R7943,  $n = 6$ ), anoxisches Preconditioning in Gegenwart von 1  $\mu M$  Bisindolylmaleimid (AP + BIM,  $n = 8$ ) und anoxisches Preconditioning in Gegenwart von 1  $\mu M$  Bisindolylmaleimid und 20  $\mu M$  Cantharidin (AP + BIM + Cantharidin,  $n = 7$ ). Bisindolylmaleimid, KB-R7943 und Cantharidin wurden jeweils über die gesamte Versuchsdauer appliziert. Die Versuchsprotokolle sind in Abb. 3.3 veranschaulicht. Die Daten sind dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  SEM. \* -  $p < 0,05$  vs. Kontrolle. Unter KB-R7943 war der Anstieg der Fura-2-Ratio signifikant gehemmt, die anderen Protokolle vermochten seine Aktivität jedoch nicht zu beeinflussen.

## 5 Diskussion

Ziele der vorliegenden Studie waren es,

- herauszufinden, inwieweit anoxisches Preconditioning isolierte Kardiomyozyten gegen einen durch simulierte Ischämie und Reperfusion induzierten Schaden schützen kann,
- herauszufinden, welche Rolle hierbei der Proteinkinase C zukommt,
- herauszufinden, ob Proteinkinase C -unabhängige Mechanismen hieran beteiligt sind.

### 5.1 Relevanz des Modells

Anoxisches Preconditioning konnte in der vorliegenden Studie deutlich die  $\text{Ca}^{2+}$ -Überladung während langer Anoxie vermindern und der Entwicklung einer Hyperkontraktur während der Reoxigenierung entgegenwirken, sofern zeitgleich eine Proteinkinase C -Hemmung erfolgte. Dieser Schutz gegen die zytosolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Überladung ist die Folge einer verringerten zytosolischen  $\text{Na}^+$ -Überladung. Der Schutz gegen die  $\text{Na}^+$ -Überladung konnte durch die unselektive Hemmung der Proteinphosphatasen 1 und 2A aufgehoben werden. Dies deutet auf einen positiven Einfluß der Proteinphosphatasen hin, welcher durch Proteinkinase C verschleiert sein könnte.

Das in der vorliegenden Studie angewandte Modell der isolierten Kardiomyozyten, die einer simulierten Ischämie ausgesetzt wurden, ist bereits in mehreren früheren Studien verwandt worden (LADILOV et al. 1998, LADILOV, BALSER-SCHAFFER et al. 1999, LADILOV, HAFFNER et al. 1999). Unter anoxischen Bedingungen entwickeln die Zellen ein Defizit an ATP, woraus eine Rigor-vermittelte Verkürzung der Zellen erfolgt. Die Zellen beginnen kurz vor dieser Rigor-Kontraktur,  $\text{Na}^+$  im Zytosol zu akkumulieren, nach der Rigorkontraktur kommt es auch zu einer Akkumulation von  $\text{Ca}^{2+}$ . Während der Reoxigenierung wird dieses Ionen-Ungleichgewicht rasch behoben. Geschieht dies bei Zellen, die bereits eine gewisse  $\text{Ca}^{2+}$ -Überladung überschritten haben, resultiert eine irreversible Hyperkontraktur. Es konnte bereits gezeigt werden, daß diese Hyperkontraktur die Folge der sich erholenden Energieproduktion bei noch erhöhten  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen

infolge der Anoxie ist (LADILOV et al. 1999, VANDER HEIDE et al. 1986). Demgemäß entsteht der durch Anoxie und Reoxigenierung induzierte Zellschaden in unserem Modell aus zwei wichtigen Mechanismen: (i) der sich unter simulierter Ischämie ausbildenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Überladung und (ii) der sich in deren Folge entwickelnden Hyperkontraktur unter Reoxigenierung. Die vorliegende Studie diente dazu, die Auswirkungen anoxischen Preconditionings auf diese beiden grundlegenden Mechanismen zu untersuchen.

## 5.2 Auswirkungen des anoxischen Preconditionings auf die Ionenhomöostase während der Anoxie

Anoxisches Preconditioning alleine bewirkte lediglich eine geringe Verminderung der anoxischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Überladung. Dieser Effekt wurde durch die Hemmung der Proteinkinase C durch Bisindolylmaleimid vor und während der Anoxie deutlich verstärkt. Die Verminderung der anoxischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Überladung in durch anoxisches Preconditioning behandelten Zellen stellt jedoch keine unspezifische Wirkung der Substanz an sich dar, da Bisindolylmaleimid in Kontrollzellen keinen Effekt auf die  $\text{Ca}^{2+}$ -Überladung zeigte. Auch konnte durch „normoxisches Preconditioning“ gezeigt werden, daß beim eigentlichen Vorgang des anoxischen Preconditionings nicht die Azidose, sondern die Anoxie für dessen Effekte verantwortlich ist. Am gleichen Modell konnte in früheren Studien gezeigt werden, daß Bisindolylmaleimid in einer Konzentration von  $1\mu\text{M}$  die Effekte einer Proteinkinase C -Aktivierung mit 1,2-Dioctanoylglycerol komplett blockiert (LADILOV et al. 1998, LADILOV, BALSER-SCHAFFER et al. 1999). In der vorliegenden Studie konnte somit angenommen werden, daß die Verminderung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Überladung in durch anoxisches Preconditioning behandelten Zellen durch Bisindolylmaleimid das Resultat einer Hemmung der Proteinkinase C ist. Dieser protektive Effekt anoxischen Preconditionings in Gegenwart von Bisindolylmaleimid konnte gänzlich durch Zugabe von  $20\mu\text{M}$  Cantharidin, einem Hemmstoff der Proteinphosphatasen 1 und 2A, aufgehoben werden. Andererseits hatte Cantharidin keinen Effekt auf die  $\text{Ca}^{2+}$ -Überladung in Kontrollzellen. Betrachtet man die beschriebenen Effekte zusammen, so scheint der protektive Effekt des anoxischen Preconditionings auf die  $\text{Ca}^{2+}$ -Überladung durch eine Aktivierung von Proteinphosphatasen vermittelt zu sein. Die Aktivität von Proteinkinase C verschleiert diesen Effekt, der deshalb erst bei Proteinkinase C -Hemmung deutlich wird.

Wie bereits erwähnt, beginnt der Anstieg des zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$  unter anoxischen Bedingungen zeitgleich mit oder kurz nach dem Versiegen der ATP-Reserven. Da dies auch zu einer Zellverkürzung in Form der Rigor-Kontraktur führt, kann jene als ein Indikator der zellulären Energieverarmung angesehen werden. Anoxisches Preconditioning beschleunigte bei allen experimentellen Protokollen die Entwicklung der Rigorkontraktur. Demgemäß ist die Verminderung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Überladung bei durch anoxisches Preconditioning behandelten Zellen in Gegenwart von Bisindolylmaleimid nicht die Folge einer Verzögerung der Energieverarmung.

Bereits früher konnte gezeigt werden, daß die Hauptursache der  $\text{Ca}^{2+}$ -Überladung in metabolisch gehemmten Kardiomyozyten ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom aus dem Extrazellulärraum über den „Reverse Mode“ des  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers ist (LADILOV, HAFFNER et al. 1999). Der Anstieg der zytosolischen  $\text{Na}^+$ -Konzentration ist eine der Hauptursachen für die Aktivierung des  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers im „Reverse Mode“ in Kardiomyozyten (DOERING et al. 1993, VER-DONCK et al. 1993). Diese Aussage wird durch die vorliegenden Ergebnisse bestätigt: Unter vergleichbaren experimentellen Bedingungen korrelieren Veränderungen der  $\text{Na}^+$ -Überladung mit denen der  $\text{Ca}^{2+}$ -Überladung. Diese Daten weisen darauf hin, daß der zur  $\text{Na}^+$ -Überladung führende Mechanismus den primären Angriffspunkt des anoxischen Preconditionings darstellt. Die Mechanismen, über welche anoxisches Preconditioning, Proteinkinase C und Proteinphosphatasen eine Veränderung der  $\text{Na}^+$ -Überladung bewirken, sind noch nicht vollständig aufgeklärt. Es wurde angenommen, daß ein „non-inactivating“  $\text{Na}^+$ -Fluß für die  $\text{Na}^+$ -Überladung unter ischämischen Bedingungen verantwortlich ist (HAMMARSTROM et al. 1998, JU et al. 1996). Neuere Studien deuten darauf hin, daß eine Stimulation von Proteinkinase C die Inaktivierung dieses Flusses signifikant verlangsamen kann (WATSON et al. 1997). Das Molekül des  $\text{Na}^+$ -Kanals ist außerdem auch Angriffspunkt der Proteinphosphatase 1 (SCHIFFMANN et al. 1998). Eine mögliche Schlußfolgerung ist, daß die beobachteten Veränderungen der  $\text{Na}^+$ -Überladung in durch anoxisches Preconditioning behandelten Zellen unter Blockade von Proteinkinase C und Proteinphosphatasen die Folge einer veränderten Phosphorylierung von  $\text{Na}^+$ -Kanälen sind.

Auch die Aktivität des  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers wird durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung geregelt, die Reduktion der anoxischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Überladung in durch anoxisches Preconditioning behandelten Zellen unter Gegenwart von Bisindolylmaleimid

hätte somit durch eine Hemmung des „Reverse Mode“ vermittelt sein können. Um dies untersuchen zu können, wurde die durch Entzug des extrazellulären  $\text{Na}^+$  ausgelöste maximale Aktivität des  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers unter anoxischen Bedingungen bestimmt. Hierbei fanden sich keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen, was darauf hindeutet, daß Veränderungen der maximalen Aktivität des „Reverse Mode“ des  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers nicht für die beobachteten Auswirkungen auf die anoxische  $\text{Ca}^{2+}$ -Überladung verantwortlich sind.

### 5.3 Auswirkungen anoxischen Preconditionings auf die Reoxigenierungs-induzierte Hyperkontraktur

Die Hyperkontraktur ist ein wichtiger Faktor des durch Reoxigenierung induzierten Schadens am Myokard. In isolierten Zellen, wo sich die Kraft nicht wie im Gewebeverband von Zelle zu Zelle übertragen kann, führt die Hyperkontraktur nicht zwangsläufig zur Zellzerreiung und somit zum Zelltod (LADILOV et al. 1995, LADILOV et al. 1998, LADILOV, BALSER-SCHAFFER et al. 1999, LADILOV, HAFNER et al. 1999). In der vorliegenden Untersuchung zeigte sich in durch anoxisches Preconditioning behandelten Zellen in Gegenwart von Bisindolylmaleimid ein deutlicher Schutz gegen die Entwicklung einer Hyperkontraktur; dieser Effekt konnte durch Cantharidin aufgehoben werden. Die Behandlung von Zellen der Kontrollgruppen mit Bisindolylmaleimid oder Cantharidin beeinflusste die Hyperkontraktur nicht, was gegen einen unspezifischen Effekt der Substanzen spricht.

In früheren Studien konnte eine Verlängerung der zytosolischen Azidose über den Zeitpunkt der Reoxigenierung hinaus einer Reoxigenierungs-induzierten Hyperkontraktur vorbeugen (LADILOV et al. 1995). Diese Beobachtung kann jedoch als Ursache für die hier beobachteten Effekte ausgeschlossen werden. Der zytosolische pH-Wert vor und während der Reoxigenierung in der Kontrollgruppe und bei durch anoxisches Preconditioning behandelten Zellen mit Bisindolylmaleimid oder mit Bisindolylmaleimid und Cantharidin zeigte keinen Unterschied.

Ein Schutz gegen Reoxigenierungs-induzierte Hyperkontraktur kann Folge einer verminderten  $\text{Ca}^{2+}$ -Überladung zum Beginn der Reoxigenierung sein. Ein enger

Zusammenhang zwischen der endanoxischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Überladung und dem Ausmaß der Hyperkontraktur konnte kürzlich am selben Modell gezeigt werden (LADILOV, BALSER-SCHAFFER et al. 1999, LADILOV, HAFFNER et al. 1999). In der vorliegenden Studie wurden durch anoxisches Preconditioning mit bzw. ohne Bisindolylmaleimid die endanoxische  $\text{Ca}^{2+}$ -Überladung und die Hyperkontraktur gleichsinnig und etwa im selben Ausmaß vermindert. Die Behandlung mit Cantharidin hob bei durch anoxisches Preconditioning behandelten Zellen sowohl die positiven Effekte auf die  $\text{Ca}^{2+}$ -Überladung als auch auf die Hyperkontraktur auf. Dies weist darauf hin, daß der Schutz gegen Reoxigenierungs-induzierte Hyperkontraktur in der Tat die Folge einer verminderten endanoxischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Überladung ist.

#### 5.4 Vergleich mit Preconditioning am ganzen Herzen

In vielen experimentellen Modellen wurde gezeigt, daß die durch Mediatoren vermittelte Aktivierung von Proteinkinase C von großer Bedeutung für den durch ischämisches Preconditioning erreichten Schutz des ganzen Herzens ist. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß die pharmakologische Aktivierung von Proteinkinase C vor der langanhaltenden Ischämie diesen Schutzmechanismus nachahmen kann (YTREHUS et al. 1994, SPEECHLY-DICK et al. 1994, MITCHELL et al. 1995). Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen konnte erst kürzlich am gleichen Modell isolierter Kardiomyozyten gezeigt werden, daß eine Aktivierung von Proteinkinase C durch Vorbehandlung mit 1,2-Dioctanoylglycerol die Zellen gegen Reoxigenierungs-induzierte Hyperkontraktur schützt (LADILOV et al. 1998, LADILOV, BALSER-SCHAFFER et al. 1999). Um im gleichen Modell isolierter Kardiomyozyten ischämisches Preconditioning nachahmen zu können, wurde der langanhaltenden Anoxie eine 10minütige anoxische Episode, gefolgt von einer 10minütigen Reoxigenierung vorangestellt (vgl. auch **Abb 3.3**). Dieses anoxische Preconditioning bot eine deutliche Protektion durch einen Mechanismus, welcher unabhängig von einer Proteinkinase C -Aktivierung ist. Es konnte gezeigt werden, daß dieser Protektion eine Aktivierung von Proteinphosphatasen zugrunde liegt. Es scheint, daß ischämisches und anoxisches Preconditioning verschiedene protektive Mechanismen aktivieren. Es ist noch nicht geklärt, ob der Anoxie-Reoxigenierungs-Übergang bei ischämischem Preconditioning ebenfalls in der Lage ist, diesen Proteinkinase C -unabhängigen Mechanismus zu aktivieren. Es kann jedoch davon ausgegangen werden,

---

daß dieser Mechanismus für die paradoxe, Proteinkinase C -unabhängige Protektion des ischämischen Preconditionings in einigen Studien verantwortlich ist. (PRZYKLENK et al. 1995, MOOLMAN et al. 1996, VAHLHAUS et al. 1996, SANDHU et al. 1997).

## 6 Zusammenfassung

Bei Unterbrechung des koronaren Blutflusses entsteht ein Herzinfarkt. Frühzeitige Reperfusion kann das Ausmaß der ischämischen Myokardschädigung verringern. Allerdings kann auch die Reperfusion selbst zum Gewebeschaden beitragen (Reperfusionsschaden). Unter ischämischen Bedingungen kommt es zu einer zytosolischen Akkumulation von  $H^+$ ,  $Na^+$  und  $Ca^{2+}$  in den Kardiomyozyten. Unter Reperfusionsbedingungen können hohe zytosolische  $Ca^{2+}$ -Konzentrationen eine Hyperkontraktur der Zellen auslösen. Ischämisch-reperfundiertes Myokard kann durch ischämisches Preconditioning vor den erwähnten Schäden geschützt werden. Ischämisches Preconditioning bezeichnet das Vorschalten kurzer Ischämieepisoden vor die anhaltende Ischämie.

Ziel der Arbeit war, den Protektionsmechanismus eines Anoxie-Preconditioning-Protokolls auf isolierte Herzmuskelzellen unter simulierter Ischämie-Reperfusion zu untersuchen. Adulte Kardiomyozyten der Ratte wurden für 60 Minuten bei pH 6,4 anoxisch inkubiert (simulierte Ischämie) und dann für 20 Minuten bei pH 7,4 reoxigeniert (simulierte Reperfusion). Anoxisches Preconditioning wurde durch Vorschalten einer 10minütigen Anoxiephase erreicht. Es verringerte die unter anhaltender Anoxie beobachtete  $Na^+$ - und  $Ca^{2+}$ -Akkumulation und die bei Reoxigenierung auftretende Hyperkontraktur. Der Effekt des anoxischen Preconditioning war bei Hemmung der Proteinkinase C verstärkt und wurde bei zusätzlicher Hemmung von Proteinphosphatasen aufgehoben.

Die Ergebnisse weisen daraufhin, daß ein protektiver Effekt von anoxischem Preconditioning durch Aktivierung bestimmter Proteinphosphatasen vermittelt wird und durch Aktivierung bestimmter Isoformen der Proteinkinase C maskiert werden kann. Die Ergebnisse zeigen, daß Proteinphosphatasen einen interessanten Angriffspunkt für neue Protektionsstrategien des ischämisch-reperfundierten Myokards darstellen, z.B. in der Therapie des Herzinfarktes oder in der Kardiochirurgie.

## 7 Summary

Interruption of coronary perfusion leads to myocardial infarction. Early reperfusion is able to reduce the degree of myocardial injury, but reperfusion itself can also contribute to tissue damage (reperfusion-injury). Under ischemic conditions, a cytosolic accumulation of  $H^+$ ,  $Na^+$  and  $Ca^{2+}$  develops in cardiomyocytes. Under conditions of reperfusion, high levels of cytosolic  $Ca^{2+}$  can trigger a hypercontracture of cells. Ischemic-reperfused myocardium can be protected by ischemic preconditioning. Ischemic Preconditioning means the exposure of cells to brief ischemic episodes before sustained ischemia occurs.

The aim of this study was to investigate the protective mechanism of an anoxia-preconditioning-protocol on isolated cardiomyocytes under simulated ischemia-reperfusion. Adult cardiomyocytes of the rat were incubated anoxically for 60 min at pH 6.4 (simulated ischemia) and thereafter reoxygenated for 20 min at pH 7.4 (simulated reperfusion). Anoxic preconditioning was achieved by exposing cells to a preceding 10 min period of anoxia. This anoxic preconditioning attenuated  $Na^+$ - and  $Ca^{2+}$ -accumulation under sustained anoxia and hypercontracture observed under reoxygenation. The effect of anoxic preconditioning was augmented by inhibition of protein kinase C and abolished by additional inhibition of protein phosphatases.

These results suggest that a protective effect of anoxic preconditioning is mediated through activation of certain protein phosphatases and can be masked by activation of certain protein kinase C -isoforms. The results of this study show that taking influence on protein phosphatases is a promising approach to new protective strategies for ischemic-reperfused myocardium, e.g. in the treatment of myocardial infarction or in cardiac surgery.

## 8 Literaturverzeichnis

Allshire-A; Piper-HM; Cuthbertson-KS; Cobbold-PH

Cytosolic free Ca<sup>2+</sup> in single rat heart cells during anoxia and reoxygenation.

Biochem-J. 1987 Jun 1; 244(2): 381-5

Altschuld-RA; Wenger-WC; Lamka-KG; Kindig-OR; Capen-CC; Mizuhira-V; Vander-Heide-RS; Brierley-GP

Structural and functional properties of adult rat heart myocytes lysed with digitonin.

J-Biol-Chem. 1985 Nov 15; 260(26): 14325-34

Armstrong-SC; Ganote-CE

Flow cytometric analysis of isolated adult cardiomyocytes: vinculin and tubulin fluorescence during metabolic inhibition and ischemia.

J-Mol-Cell-Cardiol. 1992 Feb; 24(2): 149-62

Borzak-S; Kelly-RA; Kramer-BK; Matoba-Y; Marsh-JD; Reers-M

In situ calibration of fura-2 and BCECF fluorescence in adult rat ventricular myocytes.

Am-J-Physiol. 1990 Sep; 259(3 Pt 2): H973-81

Bowers-KC; Allshire-AP; Cobbold-PH

Bioluminescent measurement in single cardiomyocytes of sudden cytosolic ATP depletion coincident with rigor.

J-Mol-Cell-Cardiol. 1992 Mar; 24(3): 213-8

Clague-JR; Post-JA; Langer-GA

Cationic amphiphiles prevent calcium leak induced by ATP depletion in myocardial cells.

Circ-Res. 1993 Jan; 72(1): 214-8

Clarke-K; Stewart-LC; Neubauer-S; Balschi-JA; Smith-TW; Ingwall-JS; Nedelec-JF; Humphrey-SM; Kleber-AG; Springer-CS Jr

Extracellular volume and transsarcolemmal proton movement during ischemia and reperfusion: a <sup>31</sup>P NMR spectroscopic study of the isovolumic rat heart.

NMR-Biomed. 1993 Jul-Aug; 6(4): 278-86

Cordeiro-JM; Howlett-SE; Ferrier-GR

Simulated ischaemia and reperfusion in isolated guinea pig ventricular myocytes.

Cardiovasc-Res. 1994 Dec; 28(12): 1794-802

Dennis-SC; Gevers-W; Opie-LH

Protons in ischemia: where do they come from; where do they go to? [editorial]

J-Mol-Cell-Cardiol. 1991 Sep; 23(9): 1077-86

Doering-AE; Lederer-WJ

The mechanism by which cytoplasmic protons inhibit the sodium-calcium exchanger in guinea-pig heart cells.

J-Physiol-Lond. 1993 Jul; 466: 481-99

Donoso-P; Mill-JG; O'Neill-SC; Eisner-DA

Fluorescence measurements of cytoplasmic and mitochondrial sodium concentration in rat ventricular myocytes.

J-Physiol-Lond. 1992 Mar; 448: 493-509

Farber-JL; Chien-KR; Mitnacht-S Jr

Myocardial ischemia: the pathogenesis of irreversible cell injury in ischemia.

Am-J-Pathol. 1981 Feb; 102(2): 271-81

Fidelman-ML; Seeholzer-SH; Walsh-KB; Moore-RD

Intracellular pH mediates action of insulin on glycolysis in frog skeletal muscle.

Am-J-Physiol. 1982 Jan; 242(1): C87-93

Frelin-C; Vigne-P; Lazdunski-M

The role of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange system in the regulation of the internal pH in cultured cardiac cells.

Eur-J-Biochem. 1985 May 15; 149(1): 1-4.

Frelin-C; Vigne-P; Ladoux-A; Lazdunski M

The regulation of the intracellular pH in cells from vertebrates.

Eur-J-Biochem. 1988 May 16; 174(1): 3-14. Review.

Ganote-CE

Contraction band necrosis and irreversible myocardial injury.

J-Mol-Cell-Cardiol. 1983 Feb; 15(2): 67-73

Ganote-CE; Vander-Heide-RS

Cytoskeletal lesions in anoxic myocardial injury. A conventional and high-voltage electron-microscopic and immunofluorescence study.

Am-J-Pathol. 1987 Nov; 129(2): 327-44

Ganote-C; Armstrong-S

Ischaemia and the myocyte cytoskeleton: review and speculation.

Cardiovasc-Res. 1993 Aug; 27(8): 1387-403

Grynkiewicz-G; Poenie-M; Tsien-RY

A new generation of Ca<sup>2+</sup> indicators with greatly improved fluorescence properties.

J-Biol-Chem. 1985 Mar 25; 260(6): 3440-50

Haigney-MC; Miyata-H; Lakatta-EG; Stern-MD; Silverman-HS

Dependence of hypoxic cellular calcium loading on Na(+)-Ca<sup>2+</sup> exchange.

Circ-Res. 1992 Sep; 71(3): 547-57

Hammarstrom-AK; Gage-PW

Inhibition of oxidative metabolism increases persistent sodium current in rat CA1 hippocampal neurons.

J-Physiol-Lond. 1998 Aug 1; 510 ( Pt 3): 735-41

Harootunian-AT; Kao-JP; Eckert-BK; Tsien-RY

Fluorescence ratio imaging of cytosolic free Na<sup>+</sup> in individual fibroblasts and lymphocytes.

J-Biol-Chem. 1989 Nov 15; 264(32): 19458-67

Hearse-DJ; Humphrey-SM; Chain-EB

Abrupt reoxygenation of the anoxic potassium-arrested perfused rat heart: a study of myocardial enzyme release.

J-Mol-Cell-Cardiol. 1973 Aug; 5(4): 395-407

Hendrikx-M; Mubagwa-K; Verdonck-F; Overloop-K; Van-Hecke-P; Vanstapel-F; Van-Lommel-A; Verbeken-E; Lauweryns-J; Flameng-W

New Na(+)-H+ exchange inhibitor HOE 694 improves postischemic function and high-energy phosphate resynthesis and reduces Ca<sup>2+</sup> overload in isolated perfused rabbit heart.

Circulation. 1994 Jun; 89(6): 2787-98

Hess-P; Tsien-RW

Mechanism of ion permeation through calcium channels.

Nature. 1984 May 31-Jun 6; 309(5967): 453-6

Iwamoto-T; Pan-Y; Wakabayashi-S; Imagawa-T; Yamanaka-HI; Shigekawa-M

Phosphorylation-dependent regulation of cardiac Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger via protein kinase C.

J-Biol-Chem. 1996 Jun 7; 271(23): 13609-15

Iwamoto-T; Watano-T; Shigekawa-M

A novel isothioureia derivative selectively inhibits the reverse mode of Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchange in cells expressing NCX1.

J-Biol-Chem. 1996 Sep 13; 271(37): 22391-7

Ju-YK; Saint-DA; Gage-PW

Hypoxia increases persistent sodium current in rat ventricular myocytes.

J-Physiol-Lond. 1996 Dec 1; 497 ( Pt 2): 337-47

Kammermeier-H

High energy phosphate of the myocardium: concentration versus free energy change.

Basic-Res-Cardiol. 1987; 82 Suppl 2: 31-6

Koop-A; Piper-HM

Protection of energy status of hypoxic cardiomyocytes by mild acidosis.

J-Mol-Cell-Cardiol. 1992 Jan; 24(1): 55-65

Ladilov-YV; Siegmund-B; Piper-HM

Protection of reoxygenated cardiomyocytes against hypercontracture by inhibition of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange.

Am-J-Physiol. 1995 Apr; 268(4 Pt 2): H1531-9

Ladilov-YV; Siegmund-B; Balsler-C; Piper-HM

Simulated ischemia increases the susceptibility of rat cardiomyocytes to hypercontracture.

Circ-Res. 1997 Jan; 80(1): 69-75

Ladilov-YV; Balsler-C; Piper-HM

Protection of rat cardiomyocytes against simulated ischemia and reoxygenation by treatment with protein kinase C activator.

Circ-Res. 1998 Mar 9; 82(4): 451-7

Ladilov-Y; Haffner-S; Balsler-Schafer-C; Maxeiner-H; Piper-HM

Cardioprotective effects of KB-R7943: a novel inhibitor of the reverse mode of Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger.

Am-J-Physiol. 1999 Jun; 276(6 Pt 2): H1868-76

Ladilov-YV; Balsler-Schafer-C; Haffner-S; Maxeiner-H; Piper-HM

Pretreatment with PKC activator protects cardiomyocytes against reoxygenation-induced hypercontracture independently of Ca<sup>2+</sup> overload.

Cardiovasc-Res. 1999 Aug 1; 43(2): 408-16

Lasley-RD; Anderson-GM; Mentzer-RM Jr

Ischaemic and hypoxic preconditioning enhance postischaemic recovery of function in the rat heart.

Cardiovasc-Res. 1993 Apr; 27(4): 565-70

Li-Q; Altschuld-RA; Stokes-BT

Quantitation of intracellular free calcium in single adult cardiomyocytes by fura-2 fluorescence microscopy: calibration of fura-2 ratios.

Biochem Biophys Res Commun. 1987 Aug 31;147(1):120-6.

Li-QA; Altschuld-RA; Stokes-BT

Myocyte deenergization and intracellular free calcium dynamics.

Am-J-Physiol. 1988 Aug; 255(2 Pt 1): C162-8

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 Jan; 76(1): 73-81

Mohabir-R; Lee-HC; Kurz-RW; Clusin-WT

Effects of ischemia and hypercarbic acidosis on myocyte calcium transients, contraction, and pHi in perfused rabbit hearts.

Circ-Res. 1991 Dec; 69(6): 1525-37

Moolman-JA; Genade-S; Winterbach-R; Lochner-A

Preconditioning with hypoxia versus global ischemia in the isolated rat heart: effect on function and metabolism.

Cardioscience. 1994 Jun; 5(2): 73-80

Moolman-JA; Genade-S; Tromp-E; Lochner-A

No evidence for mediation of ischemic preconditioning by alpha 1-adrenergic signal transduction pathway or protein kinase C in the isolated rat heart.

Cardiovasc-Drugs-Ther. 1996 May; 10(2): 125-36

Neumann-J; Herzig-S; Boknik-P; Apel-M; Kaspareit-G; Schmitz-W; Scholz-H; Tepel-M; Zimmermann-M

On the cardiac contractile, biochemical and electrophysiological effects of cantharidin, a phosphatase inhibitor.

J-Pharmacol-Exp-Ther. 1995; 274: 530-539

Owens-LM; Fralix-TA; Murphy-E; Cascio-WE; Gettes-LS

Correlation of ischemia-induced extracellular and intracellular ion changes to cell-to-cell electrical uncoupling in isolated blood-perfused rabbit hearts. Experimental Working Group.

Circulation. 1996 Jul 1; 94(1): 10-3

Paradiso-AM; Tsien-RY; Machen-TE

Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchange in gastric glands as measured with a cytoplasmic-trapped, fluorescent pH indicator.

Proc-Natl-Acad-Sci-USA. 1984 Dec; 81(23): 7436-40

Piper-HM; Probst-I; Schwartz-P; Hutter-FJ; Spieckermann-PG

Culturing of calcium stable adult cardiac myocytes.

J-Mol-Cell-Cardiol. 1982 Jul; 14(7): 397-412

Piper-HM

Energy deficiency, calcium overload or oxidative stress: possible causes of irreversible ischemic myocardial injury.

Klin-Wochenschr. 1989 May 2; 67(9): 465-76

Przyklenk-K; Sussman-MA; Simkhovich-BZ; Kloner-RA

Does ischemic preconditioning trigger translocation of protein kinase C in the canine model?

Circulation. 1995 Sep 15; 92(6): 1546-57

Sandhu-R; Diaz-RJ; Mao-GD; Wilson-GJ

Ischemic preconditioning: differences in protection and susceptibility to blockade with single-cycle versus multicycle transient ischemia.

Circulation. 1997 Aug 5; 96(3): 984-95

Schiffmann-SN; Desdouits-F; Menu-R; Greengard-P; Vincent-JD; Vanderhaeghen-JJ; Girault-JA

Modulation of the voltage-gated sodium current in rat striatal neurons by DARPP-32, an inhibitor of protein phosphatase.

Eur-J-Neurosci. 1998 Apr; 10(4): 1312-20

Siegmund-B; Koop-A; Kliez-T; Schwartz-P; Piper-HM

Sarcolemmal integrity and metabolic competence of cardiomyocytes under anoxia-reoxygenation.

Am-J-Physiol. 1990 Feb; 258(2 Pt 2): H285-91

Siegmund-B; Zude-R; Piper-HM

Recovery of anoxic-reoxygenated cardiomyocytes from severe Ca<sup>2+</sup> overload.

Am-J-Physiol. 1992 Oct; 263(4 Pt 2): H1262-9

Siegmund-B; Schluter-KD; Piper-HM

Calcium and the oxygen paradox.

Cardiovasc-Res. 1993 Oct; 27(10): 1778-83

Siegmund-B; Ladilov-YV; Piper-HM

Importance of sodium for recovery of calcium control in reoxygenated cardiomyocytes.

Am-J-Physiol. 1994 Aug; 267(2 Pt 2): H506-13.

Speechly-Dick-ME; Mocanu-MM; Yellon-DM

Protein kinase C. Its role in ischemic preconditioning in the rat.

Circ-Res. 1994 Sep; 75(3): 586-90

Steenbergen-C; Hill-ML; Jennings-RB

Cytoskeletal damage during myocardial ischemia: changes in vinculin immunofluorescence staining during total in vitro ischemia in canine heart.

Circ-Res. 1987 Apr; 60(4): 478-86

Steenbergen-C; Murphy-E; Watts-JA; London-RE

Correlation between cytosolic free calcium, contracture, ATP, and irreversible ischemic injury in perfused rat heart.

Circ-Res. 1990 Jan; 66(1): 135-46

Vahlhaus-C; Schulz-R; Post-H; Onallah-R; Heusch-G

No prevention of ischemic preconditioning by the protein kinase C inhibitor staurosporine in swine.

Circ-Res. 1996 Sep; 79(3): 407-14

Vander-Heide-RS; Angelo-JP; Altschuld-RA; Ganote-CE

Energy dependence of contraction band formation in perfused hearts and isolated adult myocytes.

Am-J-Pathol. 1986 Oct; 125(1): 55-68

Ver-Donck-L; Borgers-M; Verdonck-F

Inhibition of sodium and calcium overload pathology in the myocardium: a new cytoprotective principle.

Cardiovasc-Res. 1993 Mar; 27(3): 349-57

Wallenstein-S; Zucker-CL; Fleiss-JL

Some statistical methods useful in circulation research.

Circ Res. 1980 Jul;47(1):1-9.

Watson-CL; Gold-MR

Modulation of Na<sup>+</sup> current inactivation by stimulation of protein kinase C in cardiac cells.

Circ-Res. 1997 Sep; 81(3): 380-6

Yabe-K; Nasa-Y; Takeo-S

Hypoxic preconditioning in isolated rat hearts: non-involvement of activation of adenosine A1 receptor, Gi protein, and ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel.

Heart-Vessels. 1995; 10(6): 294-303

Ytrehus-K; Liu-Y; Downey-JM

Preconditioning protects ischemic rabbit heart by protein kinase C activation.

Am-J-Physiol. 1994 Mar; 266(3 Pt 2): H1145-52

Zhai-X; Lawson-CS; Cave-AC; Hearse-DJ

Preconditioning and post-ischaemic contractile dysfunction: the role of impaired oxygen delivery vs extracellular metabolite accumulation.

J-Mol-Cell-Cardiol. 1993 Jul; 25(7): 847-57

Ziegelstein-RC; Zweier-JL; Mellits-ED; Younes-A; Lakatta-EG; Stern-MD; Silverman-HS

Dimethylthiourea, an oxygen radical scavenger, protects isolated cardiac myocytes from hypoxic injury by inhibition of Na(+)-Ca<sup>2+</sup> exchange and not by its antioxidant effects.

Circ-Res. 1992 Apr; 70(4): 804-11

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sind in der folgenden Form veröffentlicht:

Originalartikel:

**Ladilov Y, Maxeiner H, Wolf C, Piper HM:**

Role of protein phosphatases in the protective effect of anoxic preconditioning.

American Journal of Physiology 2001, in Revision

Abstrakts:

**Ladilov Y, Maxeiner H, Balsler-Schaefer C, Piper HM:**

The effect of anoxic preconditioning on Na<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> overload depends on Protein Kinase C and Protein Phosphatases activation

Pfluegers Archiv, European Journal of Physiology, Suppl. to Vol. 437, No. 5, S. R64 (1999)

**Ladilov Y, Maxeiner H, Balsler-Schaefer C, Piper HM:**

Anoxisches Preconditioning beschleunigt Proteinkinase C -abhängig Na<sup>+</sup>- und Ca<sup>2+</sup>-Überladung in Herzmuskelzellen adulter Ratten.

Supplementum 1 zur Zeitschrift für Kardiologie, Band 88, S. 243 (1999)

**Ladilov Y, Maxeiner H, Haffner S, Balsler C, Piper HM:**

Effects of Protein Kinase C Preactivation in anoxic-reoxygenated cardiomyocytes

Pfluegers Archiv, European Journal of Physiology, Suppl. to Vol. 435, No. 6, S. R80 (1998)

**Ladilov Y, Maxeiner H, Balsler-Schaefer C, Piper HM:**

Pharmacological Preconditioning in isolated rat cardiomyocytes

Journal of Molecular and Cellular Cardiology, Volume 30, Abstract Book, S. A76 (1998)

## Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name	Hagen Maxeiner
Geburtsdatum	13. November 1973
Geburtsort	Dillenburg
Staatsangehörigkeit	Deutsch
Familienstand	Ledig

### Schulbildung

1979 – 1983	Grundschule Dillenburg-Nanzenbach
1983 – 1992	Wilhelm-von-Oranien-Gymnasium Dillenburg

### Zivildienst

1992 – 1993	DRK-Kreisverband Dillkreis
-------------	----------------------------

### Studium

1994 – 2000	Studium der Humanmedizin an der Justus-Liebig-Universität Gießen
1996	Physikum
1997	1. Staatsexamen
1999	2. Staatsexamen
1999 – 2000	Praktisches Jahr in Gießen und Wetzlar, Wahlfach Hals-Nasen Ohrenheilkunde
2000	3. Staatsexamen

### Berufliche Tätigkeit

Seit August 2000	Tätigkeit als Arzt im Praktikum in der Abteilung für Anästhesiologie und Operative Intensivmedizin am Universitätsklinikum Gießen, Leiter: Prof. Dr. Dr. h.c. G. Hempelmann
------------------	---

## **Danksagung**

Ich möchte Herrn Prof. Dr. Dr. H. M. Piper für die Bereitstellung des Themas und des Arbeitsplatzes sowie für die engagierte fachliche Beratung und Unterstützung danken.

Sehr herzlich möchte ich Herrn Dr. Yury Ladilov danken, der mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite stand und insbesondere in methodischen Fragen viel zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Allen Mitarbeitern des Physiologischen Instituts möchte ich für ihre stete Aufgeschlossenheit und Hilfsbereitschaft danken. Ohne diese angenehme Zusammenarbeit hätte diese Arbeit nicht entstehen können.

Auch meinen Eltern möchte ich für ihr Verständnis und die Unterstützung danken, die unabdingbare Voraussetzung für das Entstehen dieser Arbeit waren.