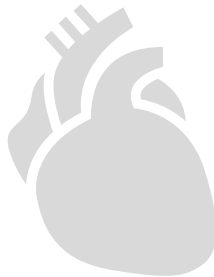


Jan Bernd Laubrock

Der Einfluss der Hypoxie-Intensität auf das
Ausmaß des Hypoxie-/Reoxygenationsschadens
in isolierten Kardiomyozyten



Inauguraldissertation zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei dem Autor dieses Werkes.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2018

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2018

© 2018 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition linguistique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

**Der Einfluss der Hypoxie-Intensität auf das Ausmaß des
Hypoxie-/Reoxygenationsschadens in isolierten
Kardiomyozyten**

INAUGURALDISSERTATION

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

vorgelegt von

Jan Bernd Laubrock
aus Münster

Gießen 2017

Aus der Medizinischen Klinik I (Kardiologie und Angiologie)
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Direktor der Klinik: Prof. Dr. med. Christian Hamm

Gutachter: Priv.-Doz. Dr. med. Yaser Abdallah

Gutachter: Prof. Dr. med. Rainer Schulz

Tag der Disputation: 10. April 2018

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Der Ischämie-/Reperfusionsschaden	1
1.2 Die zellulären Mechanismen bei der Entstehung des Ischämie-/ Reperfusionsschadens	4
1.2.1 Die Rolle des sarkoplasmatischen Retikulums	4
1.2.2 Die Rolle des Mitochondriums	6
1.3 Therapieansätze zur Protektion gegen den Ischämie-/Reperfusionsschaden	10
1.4 Ziele der Arbeit	12
2. Material und Methoden	13
2.1 Chemikalien	13
2.2 Medien und Puffer	15
2.2.1 Zellkulturmedien	15
2.2.2 Bei den Experimenten verwendete Perfusionsmedien	16
2.3 Geräte und Laborbedarf	17
2.4 Isolation von Kardiomyozyten	19
2.4.1 Versuchstiere	19
2.4.2 Präparation der Kardiomyozyten	19
2.4.3 Zellkultur	22
2.5 Versuchsaufbau	23
2.5.1 Perfusionskammer	23
2.5.2 Fluoreszenzmikroskopie	23
2.6 Experimentelles Protokoll	26
2.6.1 Versuchsanordnung	26
2.6.2 Messparameter	27
2.6.3 Messung der zytosolischen Kalzium-Konzentration	28
2.6.4 Detektion der nekrotischen Zellen	29
2.6.5 Statistik	29

3. Ergebnisse	30
3.1 Veränderung der Zellmorphologie während Hypoxie und Reoxygenation	30
3.1.1 Nekroseentwicklung nach Hypoxie und Reoxygenation	31
3.2 Zytosolisches Kalzium während Hypoxie und Reoxygenation	35
3.3 Zytosolische Kalzium-Oszillationen während der Reoxygenation	38
3.4 Amplitude der Kalzium-Oszillationen während der Reoxygenation	41
4. Diskussion	44
4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse	44
4.2 Die Entwicklung der Rigorkontraktur steigt mit sinkendem ATP-Angebot	45
4.3 Spontane Hyperkontrakturen treten bei kritischen Hypoxie-Zuständen auf	46
4.4 Die Rolle der Kalziumhomöostase unter steigender Hypoxie-Intensität	48
4.5 Die Kalzium-Oszillationen als Korrelat für Herzrhythmusstörungen	50
4.6 Die Ausbreitung der Hyperkontraktur im Myokard	51
4.7 Ausblick	54
5. Zusammenfassung	55
6. Summary	56
7. Abkürzungsverzeichnis	57
8. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	59
9. Literaturverzeichnis	61
10. Publikationsverzeichnis	75
11. Erklärung zur Dissertation	76
12. Danksagung	77
13. Lebenslauf	78

1. Einleitung

1.1 Der Ischämie-/Reperfusionsschaden

Die Weltgesundheitsorganisation zählt den Herzinfarkt sowie die ischämische Herzerkrankung in Europa und Nordamerika seit Jahrzehnten zu den Haupttodesursachen. Auch in den Schwellenländern ist ein starker Anstieg dieses Krankheitsbildes zu verzeichnen (Murray und Lopez 1997). Die häufigste Ursache für einen Myokardinfarkt ist die koronare Herzkrankheit. Darunter versteht man die Manifestation der Atherosklerose an den Herzkranzgefäßen. Bei dieser Erkrankung entstehen Plaques in der Intima des Gefäßes. Diese bestehen vor allem aus Ablagerungen von Cholesterin, Bindegewebe und Entzündungszellen (Stary et al. 1994). Beim Infarkt kommt es im Bereich der atherosklerotisch veränderten Koronararterie zu einer Plaqueruptur und nachfolgend zu einem teilweisen oder kompletten Gefäßverschluss. So entsteht im betroffenen Gewebe ein Mangel an Sauerstoff und Substraten, was als Ischämie bezeichnet wird (Thygesen et al. 2007; Eisen et al. 2016).

Das Ausmaß der Gefäßverengung spiegelt sich in der Klinik durch den ST-Hebungsinfarkt (STEMI) und den Nicht-ST-Hebungsinfarkt (NSTEMI) wider. Beim STEMI wird das Koronargefäß komplett verschlossen. Dadurch wird die gesamte Wand des Herzens minderversorgt, was als transmurale Ischämie bezeichnet wird. Im Gegensatz dazu ist beim NSTEMI die Koronararterie oftmals nicht komplett verschlossen und es besteht ein Restfluss (Grech und Ramsdale 2003; Amsterdam et al. 2014). Da die Koronargefäße von außen nach innen durch die Wandschichten des Herzens ziehen, werden die subendokardialen Abschnitte zuletzt mit Blut versorgt. Diese Bereiche des Herzmuskels werden beim Infarkt zuerst geschädigt (Reimer et al. 1983; Schünke et al. 2009). Der NSTEMI hat eine größere Prävalenz und eine höhere Langzeitmortalität als der STEMI (Terkelsen et al. 2005). Eine aktuelle Studie zeigt zudem eine höhere kumulative Inzidenz der Herzinsuffizienz bei NSTEMI Patienten nach einem Jahr. Die Mortalität während der Hospitalisierung ist hingegen bei Patienten mit einem STEMI höher (Kaul et al. 2013).

Den Goldstandard der Therapie eines akuten Gefäßverschlusses (ACS) stellt die Rekanalisation mittels perkutaner koronar Intervention (PCI) dar. Dadurch fließt wieder Blut in das ischämische Gebiet und das Gewebe kann mit Nährstoffen und Sauerstoff (Reoxygenation) versorgt werden (Steg et al. 2012).

Durch die Wiederherstellung des myokardialen Blutflusses kann es durch verschiedene metabolische Faktoren zur Ausbildung des Ischämie-/Reperfusionsschadens kommen, auch in der Kurzform als Reperfusionsschaden bezeichnet. Aus einer Studie von Piot et al. lässt sich entnehmen, dass ca. 18 % der mittels PCI behandelten Patienten mit akutem Herzinfarkt im Verlauf einen myokardialen Reperfusionsschaden entwickeln (Piot et al. 2008). Unter diesem Begriff werden zusätzliche negative Auswirkungen auf die kardialen Zellen zusammengefasst, die im Zuge der Reperfusion auftreten können. Das heißt durch die Reperfusion können paradoxerweise Schäden entstehen, die am Ende der Ischämie noch nicht erkennbar sind.

Dazu gehören beispielsweise ventrikuläre Arrhythmien, Stunning, no reflow oder schwere intramyokardiale Einblutungen. Besonders hervorzuheben ist die Entwicklung von Nekrosen in der frühen Reperfusionsphase (García-Dorado 2004). Nekrose ist ein Begriff aus der Pathologie und beschreibt den Zelltod mit unkontrollierter Freisetzung intrazellulärer, entzündungsstimulierender Bestandteile (Fink und Cookson 2005). Unter Stunning versteht man einen temporären Funktionsverlust des Herzmuskels, der sich klinisch durch reversible Hypo- bis Akinesien des Myokards zeigt. Dieser Aspekt wurde bereits 1975 von Heyndrickx et al. beschrieben (Heyndrickx et al. 1975). Das no-reflow Phänomen kann darüber hinaus nach Rekanalisation des Koronargefäßes auftreten (Braunwald und Kloner 1985). Für dieses Phänomen scheinen unter anderem Leukozyten verantwortlich zu sein, die sich in den Kapillaren ansammeln und den Blutfluss behindern (Engler et al. 1983). Des Weiteren ist ein Anstieg von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) im reperfundierten Herzgewebe zu verzeichnen (García-Dorado 2004; Johnson 2015).

Mikroskopisch lassen sich bisweilen Kontraktionsbandnekrosen nachweisen. Diese stellen irreversibel hyperkontrahierte Myokardzellen mit zerstörten Plasmamembranen dar. Kontraktionsbandnekrosen sind die schwerste Manifestationsform des Reperfusionsschadens und werden auch als letaler Reperfusionsschaden bezeichnet (Ganote 1983; Verma et al. 2002; Piper et al. 2004). Es kommt zu narbigen

Umbauprozessen und negative Folgen für die Kontraktilität des Myokards können resultieren (Jugdutt 2003; Ertl et al. 2017).

Zusammenfassend treten metabolische, elektrophysiologische, morphologische und funktionelle Schäden in Erscheinung (Hearse und Bolli 1992)

All die aufgeführten Schäden können schließlich zu einer Herzinsuffizienz führen. Die Herzinsuffizienz hat eine hohe Mortalitätsrate und ist ein häufiger Grund für die Hospitalisierung der an dieser Erkrankung leidenden Patienten. Damit verbunden sind, wie aktuelle Studien zeigen, hohe Kosten für das Gesundheitssystem (Jhund et al. 2009; Braunschweig et al. 2011; Guha und McDonagh 2013).

Der Ischämie-/Reperfusionsschaden kann darüber hinaus nicht nur am Herzen, sondern auch in anderen Organen wie beispielsweise der Leber oder der Lunge, auftreten (Tatham et al. 2017; Olthof et al. 2017).

In der Grundlagenforschung an isolierten Zellen werden auch die Termini Reoxygenation und Reoxygenationsschaden verwendet (Griffiths et al. 2000; Abdallah et al. 2006). In der vorliegenden Arbeit wurden isolierte Zellen mit Medien unterschiedlicher Hypoxie-Intensitäten perfundiert. Anschließend fand die Perfusion unter normoxischen Bedingungen statt. Aus diesem Grund sind die Begriffe Reoxygenation und Reoxygenationsschaden im Zusammenhang mit dieser Arbeit treffender, da die Perfusion der Zellen nicht unterbrochen wurde.

1.2 Die zellulären Mechanismen bei der Entstehung des Ischämie-/Reperfusionsschadens

1.2.1 Die Rolle des sarkoplasmatischen Retikulums

Im Folgenden soll nun auf Vorgänge der zellulären Ebene eingegangen werden, die laut derzeitigem Stand der Forschung zum myokardialen Ischämie-/Reperfusionsschaden führen:

Im Fokus steht hier das intrazelluläre beziehungsweise das zytosolische Kalzium. Setzt man isolierte Herzen der Ratte einer Ischämie aus, so ist nach 20 Minuten (min) ein Abfall des pH-Wertes auf 6.4 zu verzeichnen (Inserte et al. 2008). Die Ursache dafür liegt zum einen in einer Kumulation von Laktat durch die anaerobe Glykolyse, zum anderen in einem Anstieg der Protonen im Zytosol des Kardiomyozyten (Smith et al. 1993). Für die Myokardzelle ist die ausreichende Versorgung mit Sauerstoff obligat, da die kontraktile Prozesse abhängig vom Energieträger Adenosintriphosphat (ATP) sind. Dies wird größtenteils in der Atmungskette bereitgestellt (Kennedy und Jones 1986). Durch den Wegfall der oxidativen Phosphorylierung entsteht ein ATP-Mangel und der Ionentransport durch die Natrium/Kalium-ATPase kommt zum Erliegen. Dadurch steigt das Natrium in der Zelle an. Dem Natriumeinstrom wird durch den rückwärts Modus (reverse-mode) des Natrium/Kalzium-Austauschers entgegengewirkt. Dieser befördert Natriumionen aus der Zelle heraus und nimmt im Gegenzug Kalziumionen in die Zelle auf. Durch diesen Mechanismus kommt es zu einem Kalziumanstieg im Zytosol während der Ischämie (Piper et al. 2004). Dieser Kalziumanstieg findet darüber hinaus auch im Mitochondrium statt (Ruiz-Meana et al. 2006).

Unabhängig von diesem zytosolischen Kalziumanstieg ist die Rigorkontraktur zu beobachten, bei der sich die Zellen in der Ischämie verkürzen, dabei aber ihre stäbchenförmige Struktur und ihre Integrität beibehalten (Nichols und Lederer 1990; Ladilov et al. 2003; Ruiz-Meana et al. 2009). Diese kann auftreten, wenn der ATP-Gehalt der Zelle auf ≤ 1 mmol/l gesunken ist. Weiterhin scheint die Rigorkontraktur von dem Energieträger Kreatinphosphat abhängig zu sein (Nichols und Lederer 1990; Veksler et al. 1997). Die Verkürzung der Zelle entsteht durch die Querbrückenbildung von Aktin- und Myosinfilamenten. Dabei wird eine Spannung aufgebaut (Veksler et al. 1997).

Die Azidose, hervorgerufen durch Protonen und Laktat, hemmt den kontraktilen Apparat durch verringerte Kalziumbindung an das Troponin C (Orchard und Kentish 1990; Bers 2002). Außerdem bleibt die Länge der Zellen nach der Rigorkontraktur in der Ischämie aufgrund des Mangels an ATP, welches auch für die Lösung der Querbrückenbildung benötigt wird, konstant (Piper et al. 2003; Walklate et al. 2016).

Werden die Kardiomyozyten im Modell nun reperfundiert beziehungsweise reoxygeniert, steht diesen wieder Sauerstoff und konsekutiv ATP zur Verfügung. Der pH-Wert normalisiert sich (Inserate et al. 2008). Es werden Energieträger für die Natrium/Kalium-ATPase bereitgestellt und diese befördert Natrium aus der Zelle heraus. Zu diesem Zeitpunkt, in der frühen Phase der Reperfusion, befindet sich der Natrium/Kalium-Austauscher noch immer im reverse-mode (Schäfer et al. 2001).

Daraus ergibt sich in den ersten Minuten der Reperfusion nun folgendes Bild: Der Kardiomyozyt ist noch mit Kalzium überladen, durch die oxidative Phosphorylierung wird der Energieträger ATP bereitgestellt und der kontraktile Apparat ist aufgrund des pH-Anstieges und der ATP-Produktion wieder funktionsfähig (Piper et al. 2004).

In den ersten Minuten der (simulierten) Reperfusion lassen sich zytosolische Kalzium-Oszillationen in der Zelle messen. Diese entstehen durch die rasche Aufnahme und Freisetzung von Kalzium durch das sarkoplasmatische Retikulum. Dies ist der Hauptspeicher für Kalzium in den Kardiomyozyten und hat entscheidenden Anteil an der Entstehung des Ischämie-/Reperfusionsschadens (Garcia-Dorado et al. 2012). Durch die oxidative Energieproduktion in der Reperfusion steht der Kalziumpumpe des sarkoplasmatischen Retikulums (SERCA) wieder ATP als Substrat zur Verfügung. Somit wird Kalzium in das sarkoplasmatische Retikulum befördert. Des Weiteren findet in der frühen Phase der Reperfusion eine Kalziumfreisetzung durch den Ryanodin-Rezeptor (RyR) aus letztgenanntem Zellorganell statt. Dadurch entstehen die oben genannten Kalzium-Oszillationen, die im Zusammenspiel mit dem kontraktilen Apparat zu einer Hyperkontraktur der Zelle führen (Siegmond et al. 1997). Die Hyperkontraktur ist im Gegensatz zur Rigorkontraktur kalziumabhängig und irreversibel. Sie geht mit schweren Zellschäden einher (Piper und García-Dorado 1999). Für die Hyperkontraktur wird darüber hinaus ATP benötigt (Ladilov et al. 1997). Durch die Hyperkontraktur entstehen die zuvor erwähnten Kontraktionsbandnekrosen und im Zuge dessen ein irreversibler Funktionsverlust des Myokards (*siehe Abb. 1.1 und 1.2*). Von einigen Autoren wird für diese pathophysiologischen Zusammenhänge auch der Begriff des

Sauerstoff-Paradoxons verwendet (Ganote 1983; Siegmund et al. 1993; Lemasters 1999). Kalzium wird im Laufe der Reperfusion durch den Natrium/Kalzium-Austauscher wieder zurück in den Extrazellularraum befördert. Das zytosolische Kalzium sinkt dadurch (Piper et al. 1993; Abdallah et al. 2011).

Darüber hinaus zeigten Silverman et al. in einer Studie, dass isolierte Kardiomyozyten bereits während milder Hypoxie einen Strukturverlust entwickeln können (Silverman et al. 1992).

1.2.2 Die Rolle des Mitochondriums

Gegenstand der aktuellen Forschung bezüglich des kardialen Reperfusionsschadens ist zunehmend das Mitochondrium.

Die Kardiomyozyten sind auf eine hohe Energiebereitstellung angewiesen, die hauptsächlich in der Atmungskette in den Mitochondrien erfolgt (Kennedy und Jones 1986). Dabei wird ein elektrochemischer Gradient über der inneren Mitochondrienmembran (mitochondriales Membranpotential ($\Delta\Psi_m$)) aufgebaut, der schließlich für die Synthese von ATP genutzt wird (Piper et al. 1994). Der dafür benötigte Sauerstoff gelangt über Diffusion aus den Kapillargefäßen in die Zelle. Die Sauerstoffaufnahme der Zellen ist im Bereich von 150-5 Torr nahezu konstant (Noll et al. 1992). Kardiomyozyten haben also eine hohe Toleranz für ein sinkendes Sauerstoffangebot. Während Hypoxie-Zuständen findet eine Reduzierung des Partialdruckgradienten für Sauerstoff zwischen dem Extra- und Intrazellularraum statt. Dadurch kann, trotz ausgeprägtem Sauerstoffmangel, der elektrochemische Gradient aufrechterhalten werden. Negative Folgen für das Myokard lassen sich auf diese Weise in der Ischämie verhindern (Piper et al. 1994; Takahashi und Doi 1996).

Diese Protektionsmechanismen auf zellulärer Ebene scheinen allerdings bei schwerer Hypoxie erschöpft zu sein, sodass eine Kalziumüberladung entsteht (Piper et al. 1994; Griffiths et al. 1998).

Das Mitochondrium ist sowohl räumlich als auch funktionell eng mit dem sarkoplasmatischen Retikulum verknüpft. So beträgt der elektronenmikroskopisch gemessene Abstand zwischen diesen beiden Zellorganellen laut Csordás et al. nur ca. 25 nm (Csordás et al. 2006). Über Mikrodomänen scheinen das Mitochondrium und das

sarkoplasmatische Retikulum miteinander verbunden zu sein. Auch ein schneller Kalziumaustausch könnte auf diesem Weg stattfinden (Rapizzi et al. 2002; Kohlhaas und Maack 2013).

Während der Ischämie kann das Mitochondrium, wie bereits erwähnt, große Mengen an Kalzium aus dem Zytosol aufnehmen (Ruiz-Meana et al. 2006). Außerdem fallen vermehrt reaktive Sauerstoffspezies (ROS) im Mitochondrium an, die auf oxidativen Stress der Myokardzelle hinweisen (Abdallah et al. 2011). ROS oder Sauerstoffradikale sind chemische Sauerstoffverbindungen, die ein oder mehrere ungepaarte Elektronen aufweisen, dadurch sehr reaktionsfreudig sind und Zellschäden verursachen können (Ferrari 1995). Nimmt im Laufe der Reperfusion die ATP-Produktion wieder zu, kann durch den aktivierten mitochondrialen Kalzium Transporter (MCU) weiteres Kalzium aus dem mit Kalzium überladenen Zytosol in das Mitochondrium aufgenommen werden (Halestrap et al. 2004).

Eine zentrale Rolle bei der Entstehung des Ischämie-/Reperfusionsschadens spielt die Öffnung der mitochondrialen Permeabilitäts-Transitions-Pore (mPTP), die sich in der inneren Membran der Mitochondrien befindet. Diese Pore ist während der Ischämie geschlossen, öffnet sich aber innerhalb der ersten Minuten der Reperfusion (Halestrap et al. 1997; Shahzad et al. 2013). Dadurch wird die freie Passage von Molekülen mit einem Molekulargewicht von $< 1,5$ kDa ermöglicht. Es folgen der Zusammenbruch der Ionenhomöostase und eine Aktivierung von Proteasen und Nukleasen. Proapoptische Proteine wie das Cytochrom C werden freigesetzt und es resultiert schließlich der Zelltod. Die Öffnung der mPTP scheint durch oxidativen Stress, mitochondriale Kalziumüberladung und vermehrten Anfall von freien Phosphaten ausgelöst zu werden. Also durch Bedingungen, die in der Reperfusionsphase vorherrschen (Duchen et al. 1993; Halestrap et al. 2004).

Darüber hinaus wird durch die mPTP Kalzium in das Zytosol freigesetzt, das dann zwischen dem sarkoplasmatischen Retikulum und dem Mitochondrium oszilliert. Dies fördert ebenfalls die Entstehung der Hyperkontraktur des Kardiomyozyten (Piper et al. 2008). Es gibt des Weiteren Hinweise, dass ein Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials in engem Zusammenhang mit der Entstehung von postischämischen Arrhythmien steht (Akar et al. 2005). Die Öffnung der mPTP und der damit einhergehende Funktionsverlust scheinen nicht in allen Mitochondrien der Zelle gleichzeitig stattzufinden. In einigen Mitochondrien erfolgt während der Reperfusion

die Energiebereitstellung. Dadurch kann die irreversible Hyperkontraktur des Myozyten erfolgen (Piper et al. 2008).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass das sarkoplasmatische Retikulum und die Mitochondrien eine entscheidende Rolle bei der Entstehung des Ischämie-/Reperfusionsschadens spielen.

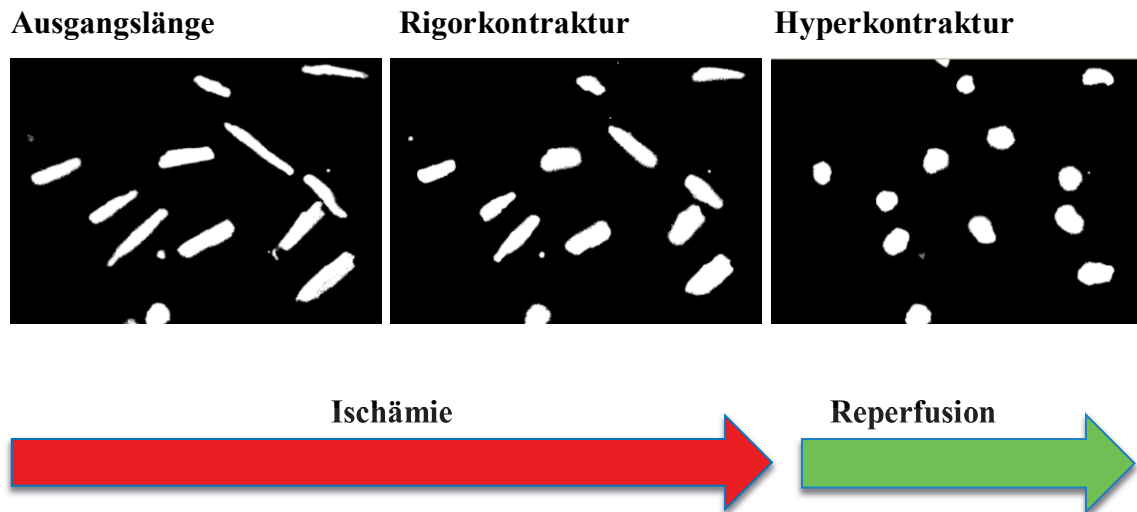


Abb. 1.1: Die Veränderungen der Zellmorphologie

Die Abbildung zeigt die Veränderungen der Zellmorphologie isolierter Kardiomyozyten im Verlauf eines Hypoxie-/Reoxygenationsexperiments, das im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurde. Dargestellt sind Originalbilder.

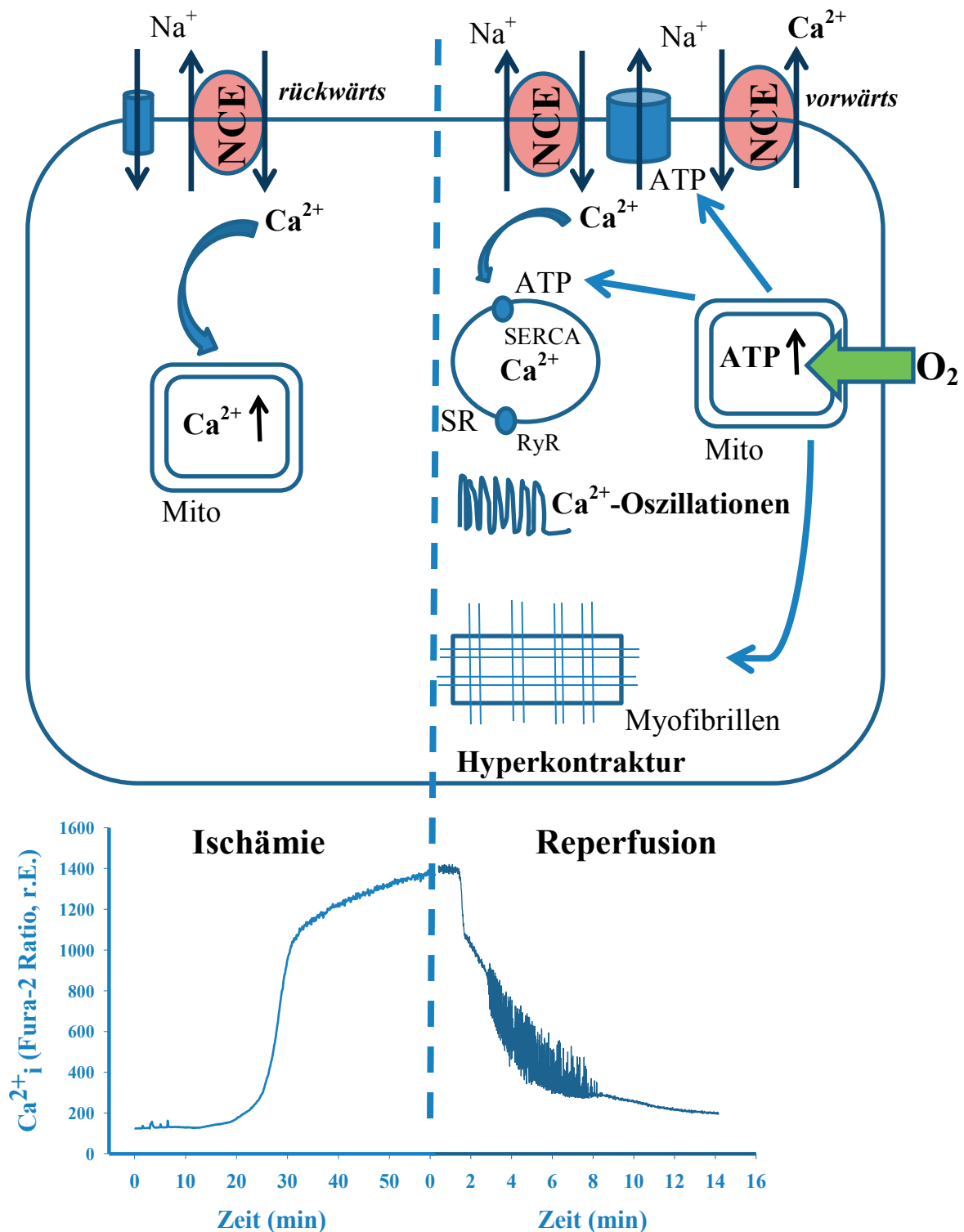


Abb. 1.2: Die zellulären Mechanismen (Abbildung modifiziert nach Piper et al. 2004)
 Die Abbildung zeigt schematisch die Vorgänge auf zellulärer Ebene des Kardiomyozyten während Ischämie und nachfolgender Reperfusion. Der Verlauf der zytosolischen Kalzium-Konzentration und die Kalzium-Oszillationen in der Reperfusion werden am Beispiel von Originalaufzeichnungen einer Zelle aus der vorliegenden Arbeit dargestellt. Das zytosolische Kalzium wurde als Fura-2 Ratio in relativen Einheiten (r.E.) gemessen.
 NCE: Natrium-Kalzium Austauscher; Mito: Mitochondrium; SR: sarkoplasmatisches Retikulum; ATP: Adenosintri-phosphat; Ca²⁺: Kalzium; Na⁺: Natrium; Ca²⁺_i: zytosolische Kalzium-Konzentration; O₂: Sauerstoff; SERCA: Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase; RyR: Ryanodin-Rezeptor

1.3 Therapieansätze zur Protektion gegen den Ischämie-/Reperfusionsschaden

Im Laufe der letzten Jahre wurden verschiedene experimentelle Ansätze zur Therapie des myokardialen Ischämie-/Reperfusionsschadens entwickelt und weiter untersucht.

Das zytosolische Kalzium spielt, wie zuvor erläutert, eine große Rolle bei der Entstehung des Reperfusionsschadens. Abdallah et al. führten Studien zur Funktion von cyclischem Guanosinmonophosphat (cGMP) durch (Abdallah et al. 2005). Sie konnten sowohl eine Reduktion des zytosolischen Kalziums als auch der Kalzium-Oszillationen durch cGMP vermittelte Signalkaskaden zeigen. In dieser Arbeit wird eine Aktivierung der SERCA über cGMP vermittelte Signalwege diskutiert. Durch diesen Mechanismus wird mehr Kalzium aus dem Zytosol in das sarkoplasmatische Retikulum aufgenommen. Es resultiert in einer Abschwächung der Kalzium-Oszillationen und der Hyperkontraktur (Piper et al. 2004; Abdallah et al. 2005).

Weiterhin konnte eine Desensitivierung der Myofibrillen für Kalzium durch cGMP Signalketten beobachtet werden (Shah et al. 1994). Auf diesem Wege könnte ebenfalls eine Protektion vor der irreversiblen Hyperkontraktur stattfinden (Piper et al. 2004).

Eine weitere Möglichkeit den Reperfusionsschaden zu verhindern, ist die pharmakologische Blockade des kontraktilen Apparats.

Dazu wurden Anoxie-Reoxygenationsexperimente an isolierten Kardiomyozyten mit der Substanz 2,3-Butanedione monoxime (BDM) durchgeführt. Eine temporäre Blockade der Myofibrillen durch BDM konnte die Hyperkontraktur in den Zellen suffizient verhindern und ermöglichte gleichzeitig eine Normalisierung der zytosolischen Kalzium-Konzentration (Siegmond et al. 1991).

Darüber hinaus hat ein saures Reperfusionsmilieu kardioprotektive Auswirkungen. Eine wenige Minuten dauernde Perfusion mit pH 6.4 zu Beginn der Reperfusion führte zu reduzierter Laktatdehydrogenase (LDH) Freisetzung. Außerdem wurde ein geringeres Infarktmaß im Vergleich zur Kontrollgruppe detektiert (Inserte et al. 2008). Ähnlich wie BDM, wirkt die Azidose negativ inotrop auf das Myokard (Orchard und Kentish 1990). Des Weiteren indizieren Studien, dass ein saurer pH-Wert eine inhibierende Wirkung auf den Natrium/Kalzium-Austauscher hat und somit einem weiteren Anstieg des zytosolischen Kalziums in der Reperfusion entgegenwirkt (Philipson et al. 1982; Inserte et al. 2008).

Weitere Therapiemöglichkeiten sind die Prä- und Postkonditionierung (Pre-/Postconditioning).

Unter Preconditioning werden kurze Ischämieepisoden vor der eigentlichen Ischämiephase bezeichnet. Beim Myokardinfarkt wird das Augenmerk verstärkt auf das Postconditioning gelegt. Hier können kurze Ischämieperioden, die direkt vor der eigentlichen Reperfusion durchgeführt werden, den Reperfusionsschaden verringern (Zhao et al. 2003). Das Preconditioning ist beim akuten Infarkt nicht anwendbar, da hier das Gefäß bereits verschlossen ist. Diese Methode kann aber durchaus bei elektiven Eingriffen, wie der operativen Myokardrevaskularisation (CABG) oder Klappenrekonstruktionen, eingesetzt werden. Zudem wird das Preconditioning auch organfern (remote) durch aufblasbare Manschetten angewendet (Hausenloy et al. 2007). Aktuelle, größer angelegte klinische Studien zeigen allerdings keinen positiven Effekt des (remote) Preconditionings im Rahmen herzchirurgischer Operationen (Meybohm et al. 2015; Hausenloy et al. 2015). In einer kleinen klinischen Studie konnten Saat et al. den Nutzen des Postconditionings im Rahmen der PCI demonstrieren (Staat et al. 2005). Als Pharmakon, das auf die mPTP am Mitochondrium wirkt, ist an dieser Stelle Ciclosporin A (CspA) zu nennen. Bereits Ende der 1980er Jahre konnte gezeigt werden, dass CspA die Öffnung der mPTP verhindern kann (Crompton et al. 1988). Durch die Bindung von CspA an Cyclophilin A wird darüber hinaus Calcineurin inhibiert (Liu et al. 1991). Calcineurin ist in der Lage Proteine zu dephosphorylieren und dadurch kardioprotektive Signalwege zu deaktivieren (Ni et al. 2007; Gedik et al. 2013)

Aufgrund einiger vielversprechender Ergebnisse *in vitro* und am Tiermodell *in vivo*, wurden bereits klinische Studien an ausgewählten Patientenkollektiven durchgeführt. Während Piot et al. in einer kleinen Studie einen positiven Effekt von Ciclosporin A zeigen konnten, verlief die größer angelegte CIRCUS Studie (Does Cyclosporine Improve Clinical Outcome in ST Elevation Myocardial Infarction Patients) jüngst frustan. Hier war kein Unterschied im klinischen Ausgang im Vergleich zur Kontrollgruppe feststellbar (Piot et al. 2008; Cung et al. 2015).

1.4 Ziele der Arbeit

In dieser Arbeit werden isolierte Kardiomyozyten einer steigenden Hypoxie-Intensität ausgesetzt. Dadurch soll ein sinkendes Angebot an Energieträgern beziehungsweise eine Energieverarmung simuliert werden. Anschließend findet die Reoxygenation statt. Die Hypoxie wird physiologisch durch sinkende Sauerstoff-Sättigungen im Perfusionsmedium und ein maximales Energiedefizit durch metabolische Inhibierung erreicht.

Ziel ist es, die in vivo Situation von Ischämie und Reperfusion zu simulieren.

Untersucht werden sollen schwerpunktmäßig folgende Aspekte:

1. Der Einfluss der Hypoxie-Intensität auf die Kontraktur- und Nekroseentwicklung im Hypoxie-/Reoxygenationsexperiment. Hierbei soll auch untersucht werden, ob eine Nekroseentwicklung während der Hypoxie oder während der Reoxygenation stattfindet.
2. Der Einfluss der Hypoxie-Intensität auf das zytosolische Kalzium im Hypoxie-/Reoxygenationsexperiment.
3. Die physiologisch induzierte Hypoxie soll mit der metabolischen Inhibierung bezüglich der Punkte 1 und 2 verglichen werden.

2. Material und Methoden

2.1 Chemikalien

Aqua	B. Braun, Melsungen
Cytosin-Arabinofuranosid	Sigma-Aldrich, Steinheim
DMSO	Applichem, Darmstadt
Fötales bovines Serum (FCS)	Merck, Darmstadt
Glukose	Merck, Darmstadt
HEPES	Carl Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Karnitin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Kollagenase, u.a. Typ II 240 UI/mg	Worthington, U.S.A
Kreatin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Laminin	Roche, Mannheim
Magnesiumsulfat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Medium 199	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe
Penicillin-Streptomycin-Lösung	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
Taurin	Sigma-Aldrich, Steinheim

Hypoxie-/Reoxygenationsexperimente:

Fura-2, AM	Biotium, U.S.A
Natriumcyanid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Stickstoff, gasförmig	Praxair, Düsseldorf
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Weitere für diese Arbeit verwendete Chemikalien wurden von den Firmen Sigma-Aldrich, Thermo Fisher Scientific, Merck und Carl-Roth bezogen. Alle verwendeten Chemikalien wurden den Herstellerangaben entsprechend gelöst und aufbewahrt.

2.2 Medien und Puffer

2.2.1 Zellkulturmedien

CCT-Medium:

Medium 199	500 ml
+	
HEPES	3,6 g/l
Kreatin	5 mmol/l
Karnitin	2 mmol/l
Taurin	5 mmol/l
Cytosin-Arabinofuranosid	10 µmol/l

Das CCT-Medium wurde mit NaOH-Lösung auf einen pH-Wert von 7,4 bei 37 °C titriert.

Vorplattiermedium:

CCT-Medium	
+	
Laminin	0,5 µl/ml
Penicillin-Streptomycin-Lösung	2 %

Ausplattiermedium:

CCT-Medium	
+	
Penicillin-Streptomycin-Lösung	2 %
FCS	4 %

Die Medien wurden unter sterilen Bedingungen hergestellt und verwendet. Die Aufbewahrung fand bei 4 °C statt.

2.2.2 Bei den Experimenten verwendete Perfusionsmedien

Normoxische HEPES gepufferte Tyrode-Lösung:

NaCl	125,0 mmol/l
KCl	2,6 mmol/l
KH ₂ PO ₄	1,2 mmol/l
MgSO ₄	1,2 mmol/l
HEPES	25,0 mmol/l
CaCl ₂	1,2 mmol/l
Glucose	2,5 mmol/l

Der pH-Wert wurde mit NaOH-Lösung (2 mol/l) auf 7,4 bei 37 °C titriert.

Hypoxische HEPES gepufferte Tyrode-Lösung:

NaCl	125,0 mmol/l
KCl	2,6 mmol/l
KH ₂ PO ₄	1,2 mmol/l
MgSO ₄	1,2 mmol/l
HEPES	25,0 mmol/l
CaCl ₂	1,2 mmol/l

Der pH-Wert wurde mit NaOH-Lösung (2 mol/l) auf 6,4 bei 37 °C titriert.

HEPES gepufferte Tyrode-Lösung mit metabolischer Inhibierung:

NaCl	125,0 mmol/l
KCl	2,6 mmol/l
KH ₂ PO ₄	1,2 mmol/l
MgSO ₄	1,2 mmol/l
HEPES	25,0 mmol/l
CaCl ₂	1,2 mmol/l
NaCN	2,0 mmol/l

Der pH-Wert wurde mit NaOH-Lösung (2 mol/l) auf 6,4 bei 37 °C titriert.

2.3 Geräte und Laborbedarf

Zellkultur und Kardiomyozytenisolierung:

Deckgläser (25 mm Durchmesser)	Menzel, Braunschweig
Gewebehacker	Mickle Laboratory Engineering, U.K.
Inkubator	Heraeus, Hanau
Langendorff-Apparatur	Eigenbau, Werkstatt des physiologischen Instituts Gießen
Mikroskop	Leica, Wetzlar
Nylonnetz (200 µm)	NeoLab, Heidelberg
Präparationsbesteck	Aeskulap, Heidelberg; Eickenmeyer, Tuttlingen
Sterilbank	Heraeus, Hanau
Zentrifuge	Hettich, Tuttlingen

Fluoreszenzmikroskopie:

CCD-Kamera	TILL Photonics, Gräfeling
Software	TILL Photonics, Gräfeling
Dichroid-Spiegel	Olympus, Hamburg
Emissionsfilter	Olympus, Hamburg
Inverses Mikroskop IX 71	Olympus, Hamburg
Monochromator	TILL Photonics, Gräfeling
Xenon-Lampe	TILL Photonics, Gräfeling

Hypoxie-/Reoxygenationsexperimente:

Digitales Oxymeter für gelösten Sauerstoff, GMH 3630	Greisinger, Regenstauf
Edelstahlkapillaren	Alltech, Unterhaching
Feinwaage	Sartorius, Göttingen
Feuchteammer	Memmert, Schwabach
Gasdichte Schläuche	Kalensee, Gießen
Gasventile	Kalensee, Gießen
Glasgeräte	Schott, Mainz

Hamiltonspritze (500 µl)	Hamilton, Schweiz
Magnet-Heizrührer	Ika-Werke, Staufen
Perfusionsheizung	Eigenbau, Werkstatt des physiologischen Instituts Gießen
Perfusionskammer	Eigenbau, Werkstatt des physiologischen Instituts Gießen
Peristaltikpumpe	Gilson-Abimed, Langenfeld
pH-Meter	Hanna Instruments, Vöhringen
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Skalpell	Feather, Japan
Vortexer	IKA-Werke, U.S.A
Wasserbad	Lauda, Königshofen
Wasserdemineralisierungsanlage	Merck-Millipore, Darmstadt

Verbrauchsmaterialien:

Eppendorf-Gefäße	Sarstedt, Nümbrecht
Falcon-Röhrchen	Becton Dickinson, Heidelberg
Kulturschalen	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht

2.4 Isolation von Kardiomyozyten

2.4.1 Versuchstiere

Für die Hypoxie-/Reoxygenationsexperimente wurden ventrikuläre Kardiomyozyten von männlichen Wistar Ratten aus der Züchtung von Janvier verwendet. Die Tiere waren zum Zeitpunkt der Tötung zwischen acht und zwölf Wochen alt und wogen 200-400 g. Die Ratten wurden nach ihrer Ankunft im Tierstall des physiologischen Instituts der Justus-Liebig-Universität Gießen gehalten. Die Tiere wurden nach den aktuellen Tierschutzrichtlinien gehalten und hatten freien Zugang zu Nahrung (Futter der Firma Altromin) und Wasser. Die Registrierungsnummern für die Tiertötungen lauteten: 473_M; 530_M; 589_M.

2.4.2 Präparation der Kardiomyozyten

Die Isolation von ventrikulären Kardiomyozyten erfolgte nach dem Standard-Protokoll des physiologischen Instituts der Justus-Liebig-Universität Gießen. Als Grundlage diente die von Piper et al. beschriebene Methode (Piper et al. 1982).

Es wurden für die Isolation der Kardiomyozyten weitere, im Vorigen noch nicht beschriebene, Medien verwendet:

Ca²⁺-Stammlösung:

CaCl ₂	100,0 mmol/l
-------------------	--------------

Powell-Medium:

NaCl	110,0 mmol/l
------	--------------

KCl	2,5 mmol/l
-----	------------

KH ₂ PO ₄	1,2 mmol/l
---------------------------------	------------

MgSO ₄ 7H ₂ O	1,2 mmol/l
-------------------------------------	------------

HEPES	25,0 mmol/l
-------	-------------

Glucose-Monohydrat	10,0 mmol/l
--------------------	-------------

Der pH-Wert wurde mit NaOH-Lösung auf 7,4 titriert und die Lösung bei 4 °C gelagert.

Kollagenase Puffer:

Powell-Medium	5,0 ml
Kollagenase	chargenabhängig
Ca ²⁺ - Stammlösung	12,5 µl

Nach Einsetzen der Narkosewirkung von Isofluran (4 %) wurden die Ratten durch Genickbruch getötet. Der Thorax wurde unterhalb des Sternums eröffnet, das Herz-Lungen-Paket herausgeschnitten und in eine Petrischale gelegt. Diese war mit 4 °C kalter NaCl-Lösung gefüllt. Im nächsten Schritt erfolgte die Freipräparation des Herzens von Lungen-, Trachea-, Ösophagus- und sonstigen Geweberesten. Danach wurde das Herz mit Hilfe von zwei Pinzetten an der Aorta ascendens gefasst, über die Kanüle der Langendorff-Perfusionsanlage gestülpt und sofort darauf fixiert. Im nächsten Schritt wurde das Herz zunächst retrograd mit ca. 35 ml Powell Medium perfundiert um das verbliebene Blut aus dem Herzen heraus zu spülen. Anschließend erfolgte die rezirkulierende Perfusion des Herzens mit dem Kollagenase Puffer. Die Geschwindigkeit der Perfusion betrug 2-3 ml/min, die Temperatur 37 °C und die Dauer 30 min. Das Rezirkulationsmedium wurde zudem mit einem Gasgemisch, bestehend aus 95 % Sauerstoff und 5 % Kohlenstoffdioxid, begast. Nach der Rezirkulationsphase wurde das Herz mit der Pinzette gefasst und unterhalb der Vorhöfe abgeschnitten. Das Herz, welches jetzt nur noch aus den beiden Ventrikeln bestand, wurde mit einem Gewebehacker mechanisch zerkleinert. Anschließend erfolgte der zehn min dauernde Nachverdau des Herzmuskelgewebes in der zuvor verwendeten Rezirkulationslösung. Unterstützt wurde der Nachverdau durch langsames Auf- und Absaugen der Zellsuspension mit einer Pipette. Diese wurde daraufhin durch ein Nylonnetz mit der Porengröße 200 µm filtriert, um grobe Zellreste zu entfernen. Die filtrierte Zellsuspension wurde anschließend für zwei min zentrifugiert (ca. $25 \times 9,81 \text{ m/s}^2$). Dadurch wurden die Kardiomyozyten von Endothelzellen und Fibroblasten getrennt. Nach der Zentrifugation erfolgte das Entfernen des Überstands (Endothelzellen, Fibroblasten) und das Hinzufügen von Powell-Medium und Ca^{2+} -Stammlösung (CaCl_2) in einer Konzentration von 200 µmol/l. Diese Suspension wurde nun erneut für zwei min zentrifugiert (ca. $25 \times 9,81 \text{ m/s}^2$) und der Überstand danach wieder verworfen. Im nächsten Schritt erfolgte das Hinzufügen von Powell-Medium und die Konzentration der Ca^{2+} -Stammlösung wurde schrittweise auf 1 mmol/l erhöht. Nach nochmaliger Zentrifugation (ca. $25 \times 9,81 \text{ m/s}^2$) wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet vorsichtig in 24 ml Ausplattiermedium gegeben.

2.4.3 Zellkultur

Die isolierten Kardiomyozyten wurden in Kunststoffschalen, die jeweils ein Deckglas mit 25 mm Durchmesser für die Anheftung enthielten, ausplattiert. Einen Tag vor der Ausplattierung sind diese Schalen mit 1,5 ml Vorplattiermedium bei 37 °C inkubiert worden. Dieses Medium wurde dann kurz vor der Ausplattierung der isolierten Zellen unter dem Abzug abgesaugt. Die Kardiomyozyten wurden anschließend gleichmäßig auf die Kunststoffschalen verteilt und es schloss sich eine zwei Stunden dauernde Anheftungsphase im Inkubator bei 37 °C an. Nach dieser Zeit fand ein Wechsel des Ausplattiermediums unter dem Abzug statt, um Zellen, die nicht auf dem Deckglas hafteten, zu entfernen. So konnten schließlich 80-90 % stäbchenförmige, vitale Kardiomyozyten isoliert werden. Diese wurden anschließend für die Experimente verwendet.

2.5 Versuchsaufbau

2.5.1 Perfusionskammer

Die auf dem Deckglas haftenden isolierten Kardiomyozyten wurden in eine gasdichte Kammer eingebaut und Hypoxie-/Reoxygenationsexperimenten unterzogen. Die entsprechenden Perfusionsmedien erreichten die Kammer durch gasdichte Edelstahlkapillaren und der Fluss von 0,5 ml/min wurde durch eine elektrische Pumpe aufrechterhalten. Die Temperatur in der Kammer betrug 37 °C und wurde durch eine im System eingebaute Heizplatte gewährleistet.

2.5.2 Fluoreszenzmikroskopie

Für die Erhebung der Messwerte wurde die Fluoreszenzmikroskopie eingesetzt. Zur Anwendung kam ein inverses Mikroskop. Eine Xenon-Lampe generierte Licht im Bereich von 320 nm bis 680 nm. Ein Monochromator filterte aus diesem Licht die entsprechenden Wellenlängen heraus, die für die Anregung des verwendeten Fluoreszenzfarbstoffes benötigt wurden. Das auf diese Weise gefilterte Licht wurde über einen Dichroid-Spiegel auf die Kardiomyozyten gelenkt. Das von den Fluochromen emittierte Licht wiederum, gelangte durch einen Emissionsfilter zu einer CCD-Kamera (charge-coupled device). Diese Kamera war mit einem Computer verbunden und das Signal konnte dadurch digital verarbeitet werden.

Die Auswertung der Daten erfolgte durch die Software TILLVISION© der Firma TILL Photonics, die mittlerweile zur FEI Munich GmbH gehört (*siehe Abb. 2.1*).

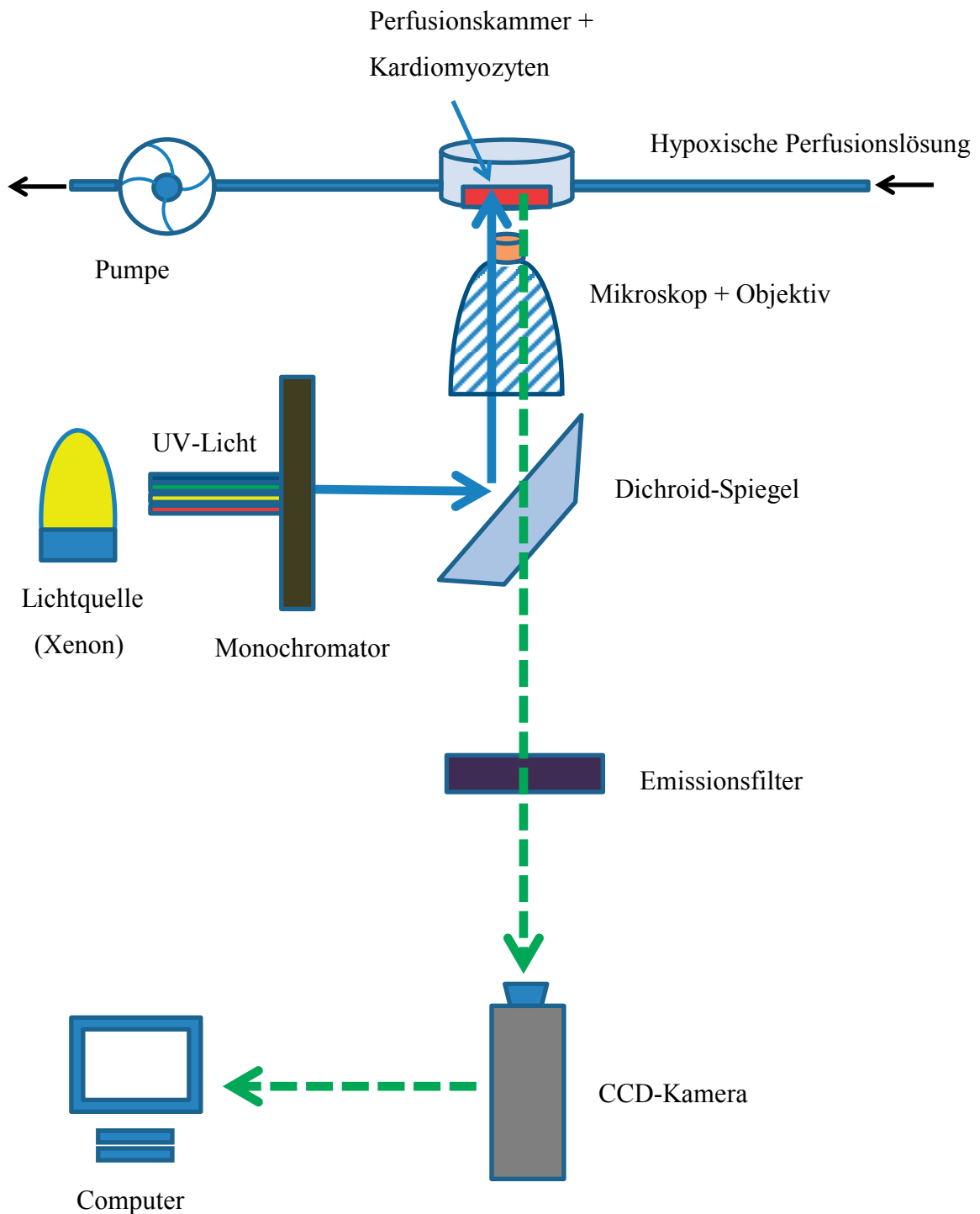


Abb. 2.1: Der allgemeine Versuchsaufbau (Abbildung modifiziert nach Micoogullari 2014)
Schematische Darstellung des allgemeinen Versuchsaufbaus und der Fluoreszenzmikroskopie. Eine Xenon-Lampe erzeugt ein Lichtspektrum, das durch den Monochromator gefiltert und über den Dichroid-Spiegel auf die mit dem Fluoreszenzfarbstoff beladenen Kardiomyozyten gelenkt wird (durchgezogene, blaue Pfeile). Das fluoreszierte Licht wird von der CCD-Kamera aufgezeichnet, zum Computer geleitet und dort digital verarbeitet (gestrichelte, grüne Pfeile). UV: Ultraviolett; CCD: charge-coupled device

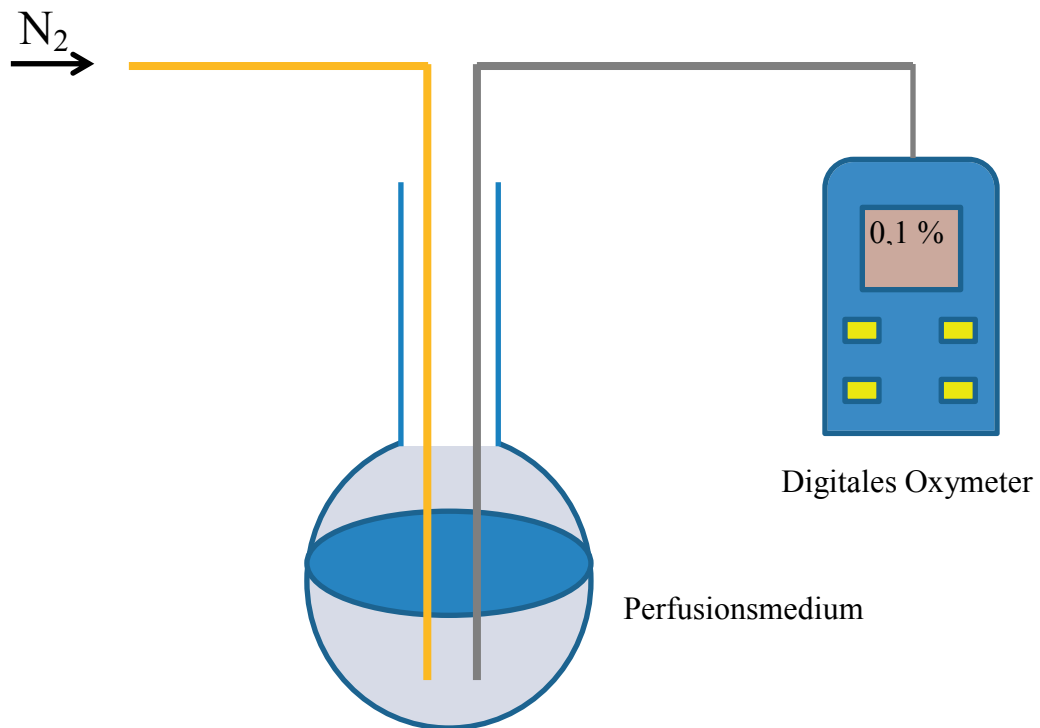


Abb. 2.2: Der spezielle Versuchsaufbau

Die Abbildung zeigt schematisch den speziellen Versuchsaufbau für die Hypoxie-/Reoxygenationsexperimente. Das Medium wird mit Stickstoff begast, bis die gewünschte Sauerstoff-Sättigung erreicht ist. Zur Kontrolle dient ein digitales Oxymeter für gelösten Sauerstoff. N₂: Stickstoff

2.6 Experimentelles Protokoll

2.6.1 Versuchsanordnung

In dieser Arbeit wurden Hypoxie-/Reoxygenationsexperimente an isolierten Kardiomyozyten der Ratte durchgeführt. Dadurch sollte die in vivo Situation von Ischämie und Reperfusion simuliert werden. Ein maximales Energiedefizit wurde durch metabolische Inhibierung mit Natriumcyanid (2 mmol/l) erreicht, weil eine Sauerstoff-Sättigung von 0 % mit unserer Methode zur Induktion der Hypoxie technisch nicht realisierbar ist. Cyanid hemmt die Cytochrom-C-Oxidase in der Atmungskette (Antonini et al. 1971). Dadurch wird die oxidative Phosphorylierung in den Zellen blockiert. Die Konzentration des Natriumcyanids orientierte sich dabei an Werten aus der Literatur (Allue et al. 1996; Rodrigo und Standen 2005). Das Modell zur metabolischen Inhibierung ist bereits etabliert und eine Konzentration von 2 mmol/l unterdrückt die Energieproduktion in den Zellen (Ladilov et al. 2003).

Zunächst wurde in Vorversuchen die Schwelle der Rigorkontraktur durch steigende Hypoxie-Intensität (Dauer maximal 90 min) bestimmt. Eine Rigorkontraktur trat erstmals unter 2-3 % Sauerstoff-Sättigung auf. Es wurden dann zwei Hypoxie-Intensitäten (2-3 %; 0,1-1 %) mit oben abgebildeter und neu entwickelter Methode simuliert, wobei jeweils die Sauerstoff-Sättigung im Perfusionsmedium gemessen wurde. Der Zeitpunkt der Rigorkontraktur und des zytosolischen Kalziumanstiegs bis zum Erreichen eines Plateaus (*siehe Abb. 1.2*), wies in den Vorversuchen zwischen den Versuchsgruppen Variationen auf. In der Literatur wird dieser Aspekt ebenfalls beschrieben (Stern et al. 1985; Ladilov et al. 1995). Deshalb wurde für die Gruppen 0,1-1 % und metabolische Inhibierung eine Hypoxiedauer von 40-60 min und für die Gruppe 2-3 % eine Hypoxiedauer von 60-90 min vorab festgelegt. Die durchschnittliche Dauer der simulierten Ischämie betrug 60 ± 15 min (*Mittelwert \pm Standardabweichung aus $n = 35$ Experimenten*). Die Reoxygenationsdauer lag in allen Versuchsgruppen bei 15 min. 1 % Sauerstoff-Sättigung entspricht laut Literaturangaben einem Sauerstoffgehalt von ca. 0,1 mg/l (Truesdale und Downing 1954). Diese Methode wurde speziell für die Fragestellung entwickelt. Vor jeder Messreihe fand die Kalibrierung der Sauerstoff-Elektrode den Herstellerangaben entsprechend statt.

Die Begasung des Hypoxiemediums (pH 6,4) erfolgte mit Stickstoff, bis die gewünschte Sauerstoff-Sättigung erreicht war (*siehe Abb. 2.2*). Durch einen Magnetrührer wurde das Medium stetig in Bewegung gehalten, was die Messgenauigkeit und den Gasaustausch verbesserte. Das Medium für die metabolische Inhibierung (pH 6,4) wurde nicht begast. Das Reoxygenationsmedium (pH 7,4) wurde mit Raumluft begast.

2.6.2 Messparameter

Für jedes Experiment wurde zu Beginn ein Gesichtsfeld mit 4-15 stäbchenförmigen Kardiomyozyten für die Messung eingestellt. Das zytosolische Kalzium und die Zelllänge wurden während des gesamten Experiments simultan gemessen. Die Nekrosedetektion wird unter 2.6.4 beschrieben.

Die Tabelle 1 listet die Messparameter auf, die in dieser Arbeit bestimmt worden sind.

Parameter	Einheit	Messmethode
Zellverkürzung (Rigor-, Hyperkontraktur)	Zelllänge in % der Ausgangslänge zu Beginn des Experiments (normoxische Zelllänge)	Zelllängenmessung
Nekrosedetektion	In % zur Gesamtzellzahl	Propidiumiodidfärbung
Zytosolische Kalzium-Konzentration während Hypoxie und Reoxygenation	Relative Einheiten (r.E.) der Fura-2 Ratio	Fura-2, AM
Zytosolische Kalzium-Oszillationen	Anzahl der Oszillationen pro Minute	Fura-2, AM
Amplitude der zytosolischen Kalzium-Oszillationen	Relative Einheiten (r.E.) der Fura-2 Ratio	Maximum minus Minimum der Fura-2, AM Oszillationen

Tab.1: Messparameter

Die Tabelle zeigt die in dieser Arbeit erhobenen Messparameter mit der jeweiligen Einheit und der Messmethode.

2.6.3 Messung der zytosolischen Kalzium-Konzentration

Die Kardiomyozyten wurden mit dem Farbstoff Fura-2, AM (5 $\mu\text{mol/l}$) beladen und für 20 min im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für zehn min mit CCT-Medium bei 37 °C gewaschen. Fura-2, AM ist ein Acetoxymethyl (AM) Ester, der innerhalb der Zelle von Esterasen gespalten wird und die Zelle danach aufgrund der Ladung nicht mehr verlassen kann. Die Zellmembran kann nicht mehr passiert werden. Innerhalb der Zelle bildet Fura-2, AM dann Chelatkomplexe mit Kalzium-Kationen (Grynkiewicz et al. 1985). Die Anregung des Farbstoffes erfolgte unter den Wellenlängen 340 nm und 380 nm. Das Emissionsmaximum von Fura-2, AM lag bei 510 nm. Für die Auswertung wurde der Quotient (Ratio, 340 nm/380 nm) berechnet, der, wie in den Abbildungen 2.3a und 2.3b dargestellt, mit dem intrazellulären Kalziumspiegel korreliert (Grynkiewicz et al. 1985; Kong und Lee 1995). Diese Methode wird bei der Messung des zytosolischen Kalziums angewendet (Abdallah et al. 2011; Shahzad et al. 2013).

Im Hypoxie-Protokoll wurde der Farbstoff Fura-2, AM alle sechs Sekunden angeregt. Im Reoxygenations-Protokoll fand die Anregung des Farbstoffes alle 500 ms statt, um Kalzium-Oszillationen im Zytosol aufzeichnen zu können.

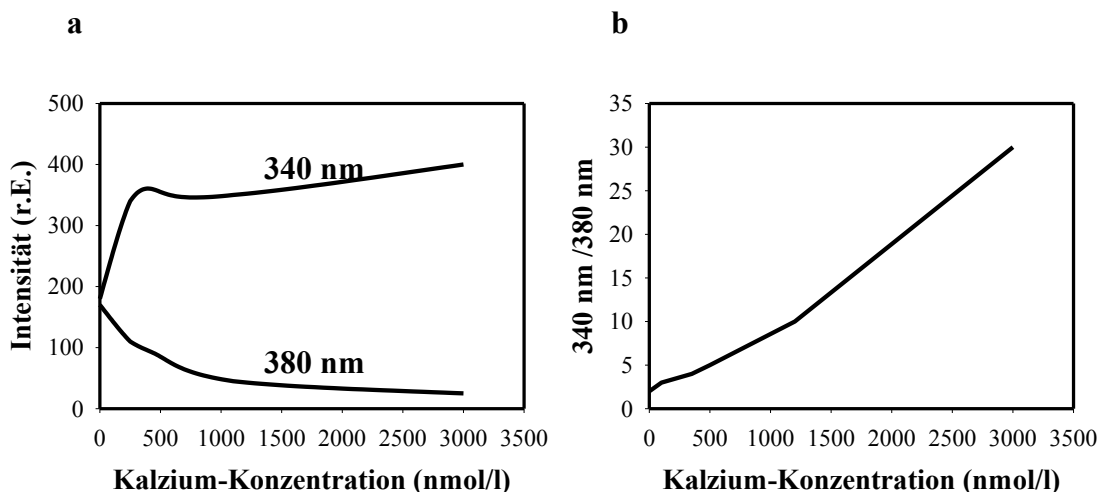


Abb. 2.3a, b: Der Farbstoff Fura-2, AM (Abbildungen modifiziert nach Kong und Lee 1995) Die Abbildungen zeigen die Korrelation der Fluoreszenzintensität des Farbstoffes Fura-2, AM mit der intrazellulären (zytosolischen) Kalzium-Konzentration. Während die Intensität bei 380 nm mit steigender Kalzium-Konzentration abnimmt, nimmt die Intensität bei 340 nm zu (2.3a). Bildet man den Quotienten 340 nm/380 nm so wird deutlich, dass eine nahezu lineare Proportionalität besteht (2.3b). r.E.: relative Einheiten Die Messwerte wurden der Arbeit von Kong und Lee entnommen (Kong und Lee 1995).

2.6.4 Detektion der nekrotischen Zellen

Nach der Reoxygenation wurden die Kardiomyozyten 15 min mit Propidiumiodid in CCT-Medium inkubiert (37 °C). Propidiumiodid kann die Membran vitaler Zellen nicht permeieren und färbt nur die Nukleinsäuren in nekrotischen Zellen an. Propidiumiodid bindet an das Nukleotid-Paar Guanin und Cytosin. Deshalb werden sowohl die Desoxyribonukleinsäure (DNS) als auch die Ribonukleinsäure (RNS) angefärbt (Suzuki et al. 1997; Crowley et al. 2016). In der Fluoreszenzmikroskopie war die DNS in den Zellkernen der nekrotischen Zellen rötlich angefärbt (Anregung mit 530 nm). Die vitalen Zellen waren hingegen nicht gefärbt. Es wurden mindestens vier Gesichtsfelder ausgezählt.

2.6.5 Statistik

Die Daten sind als Mittelwert \pm standard error of the mean (SEM) von n verschiedenen Kardiomyozyten oder n verschiedenen Experimenten angegeben. Die Zellen für jede Bedingung stammten aus $n \geq$ fünf unterschiedlichen Präparationen. Statistische Vergleiche wurden mit dem Zweistichproben T-Test oder dem Mann-Whitney-U-Test durchgeführt, falls die Daten keine Normalverteilung aufwiesen. Unterschiede mit $p < 0,05$ wurden als statistisch signifikant angegeben. Für die Auswertung wurde das Programm SigmaPlot 13 für Windows der Firma Systat Software benutzt.

3. Ergebnisse

3.1 Veränderung der Zellmorphologie während Hypoxie und Reoxygenation

Im Folgenden wird die Gruppe **2-3 % Sauerstoff-Sättigung** als **2-3 %**, die Gruppe **0,1-1 % Sauerstoff-Sättigung** als **0,1-1 %** und die Gruppe **metabolische Inhibierung** als **metab. Inhib.** bezeichnet.

Die Abbildung 3.1 verdeutlicht noch einmal den Unterschied der Zellmorphologie von Rigor- und Hyperkontraktur. Eine Hyperkontraktur, die irreversibel ist und zum nekrotischen Zelltod führt, kann sowohl während der Hypoxie als auch während der Reoxygenation auftreten. Unsere Arbeit zeigt demnach, dass einer Hyperkontraktur nicht zwangsläufig eine Rigorkontraktur vorangehen muss.

Die Tabelle 2 gibt eine Übersicht über die Zellmorphologie in der Hypoxie in den einzelnen Versuchsgruppen. Außerdem wird der Anteil an nekrotischen Zellen nach der Reoxygenation dargestellt. Dabei handelt es sich vor allem um hyperkontrahierte Zellen. Als Rigorkontraktur wurde eine Zellverkürzung auf $< 85\%$ und $> 50\%$ der normoxischen Länge während der Hypoxie angesehen, wobei die stäbchenförmige Morphologie beibehalten werden musste. Als Hyperkontraktur wurde die Verkürzung des Kardiomyozyten auf $< 50\%$ der normoxischen Länge mit Verlust der stäbchenförmigen Morphologie definiert.

In der simulierten Ischämie wurde zwischen Zellen unterschieden, die eine Rigorkontraktur, eine Hyperkontraktur und keine Änderung der Zelllänge entwickelten (*siehe Abb. 3.2*). Der Anteil an Zellen, die eine Rigorkontraktur entwickelte, war während der metabolischen Inhibierung am größten ($94,4 \pm 5,6\%$). In der Gruppe 2-3 % war der Anteil der Zellen, die bereits während der Hypoxie eine Hyperkontraktur entwickelte, mit $25,7 \pm 13,3\%$ am größten. Während metabolischer Inhibierung trat hingegen keine Hyperkontraktur auf.

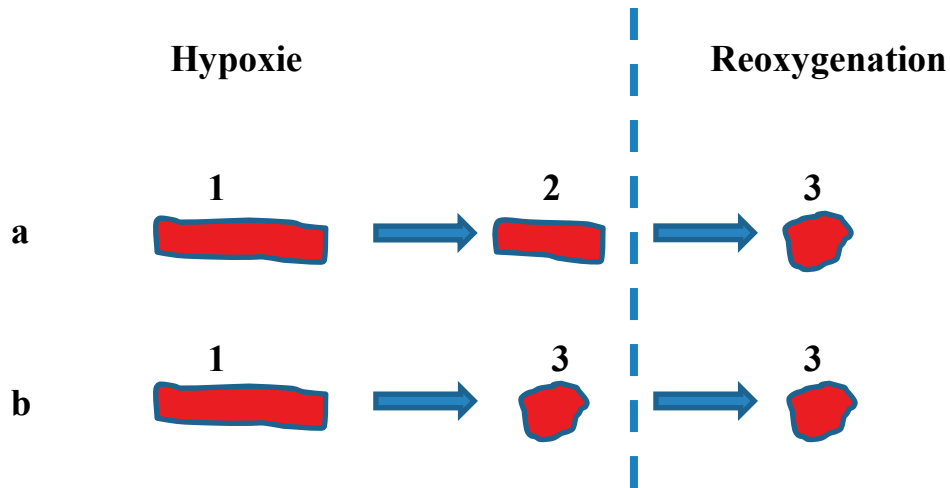


Abb. 3.1: Möglichkeiten der zeitlichen Entwicklung der Hyperkontraktur

Exemplarische Darstellung der Zellmorphologie im Verlauf von Hypoxie und Reoxygenation. Erkennbar ist der Unterschied zwischen Rigorkontraktur und Hyperkontraktur. Eine Hyperkontraktur kann sich sowohl während der Reoxygenation (a) als auch während der Hypoxie entwickeln (b). 1 = Ausgangslänge, 2 = Rigorkontraktur, 3 = Hyperkontraktur

3.1.1 Nekroseentwicklung nach Hypoxie und Reoxygenation

Die Abbildung 3.3 stellt die nekrotischen und hyperkontrahierten Zellen nach Hypoxie und Reoxygenation dar. In der Gruppe 0,1-1 % und nach metabolischer Inhibierung traten $75,6 \pm 9,6$ bzw. $76,6 \pm 4,4$ nekrotische Zellen in Prozent zur Gesamtzellzahl auf. Signifikant weniger nekrotische Kardiomyozyten waren in der Gruppe 2-3 % erkennbar ($46,0 \pm 8,7$ %; siehe Abb. 3.3). Das Ausmaß an nekrotischen Zellen unter Raumluft-Bedingungen (Normoxie) determiniert die präparationsbedingten Nekrosen. Dabei wurden vorherige Daten unserer Arbeitsgruppe miteinbezogen (Johnson 2015). Es zeigten sich signifikante Unterschiede zu den Gruppen 2-3 %, 0,1-1 % und der metabolischen Inhibierung.

	Normoxie (Raumluft- Konditionen)	2-3 % Sättigung	0,1-1 % Sättigung	metab. Inhib.
Rigor- kontraktur in der Hypoxie	-----	22,3 ± 11,3 %	76,0 ± 8,1 %	94,4 ± 5,6 %
<i>Statistik</i>		<i>p < 0,001 vs. metab. Inhib.</i>	<i>p < 0,001 vs. 2-3 % p = 0,075 vs. metab. Inhib.</i>	
Nekrose (Hyper- kontraktur) in der Hypoxie	-----	25,7 ± 13,3 %	10,9 ± 4,4 %	0,0 ± 0,0 %
<i>Statistik</i>		<i>p = 0,095 vs. metab. Inhib.</i>	<i>p = 0,877 vs. 2-3 % p = 0,045 vs. metab. Inhib.</i>	
Keine Änderung der Zelllänge in der Hypoxie	82,8 ± 1,9	52,0 ± 13,3 %	13,2 ± 7,7 %	5,6 ± 5,6 %
<i>Statistik</i>		<i>p = 0,007 vs. metab. Inhib. p = 0,424 vs. Normoxie</i>	<i>p = 0,005 vs. 2-3 % p = 0,626 vs. metab. Inhib. p = 0,001 vs. Normoxie</i>	<i>p = 0,001 vs. Normoxie</i>
Gesamt Nekrose (Hyper- kontraktur) nach Hypoxie und Reoxygenation	18,0 ± 1,8 % (Präpara- tionsbedingte Nekrosen)	46,0 ± 8,7 %	75,6 ± 9,6 %	76,6 ± 4,4 %
<i>Statistik</i>		<i>p = 0,024 vs. metab. Inhib. p = 0,002 vs. Normoxie</i>	<i>p = 0,038 vs. 2-3 % p = 0,435 vs. metab. Inhib. p = 0,030 vs. Normoxie</i>	<i>p < 0,001 vs. Normoxie</i>

Tab. 2: Die Entwicklung der Nekrose während Hypoxie und Reoxygenation

Die Tabelle zeigt den Anteil in % zur Gesamtzahl der untersuchten Zellen, der eine Rigorkontraktur, eine Hyperkontraktur und keine Änderung der Zelllänge in der Hypoxie entwickelt hat. Außerdem wird der Anteil der Zellen gezeigt, der eine Nekrose nach Hypoxie und Reoxygenation entwickelt hat (Gesamt Nekrose). Zum Vergleich sind Daten unter Normoxie (Raumluft)-Konditionen dargestellt. Die Hypoxie wurde unter den Sauerstoff-Sättigungen 2-3 % und 0,1-1 % simuliert. Die metabolische Inhibierung wurde mit Natriumcyanid (2 mmol/l) induziert. Darstellung als Mittelwert ± SEM. Normoxie: n = 5 Experimente 2-3 %: n = 10 (8) Experimente; 0,1-1 %: n = 16 (8) Experimente; metab. Inhib.: n = 9 (5) Experimente. In Klammern sind die Experimente zur Nekrosedetektion nach der Reoxygenation angegeben.

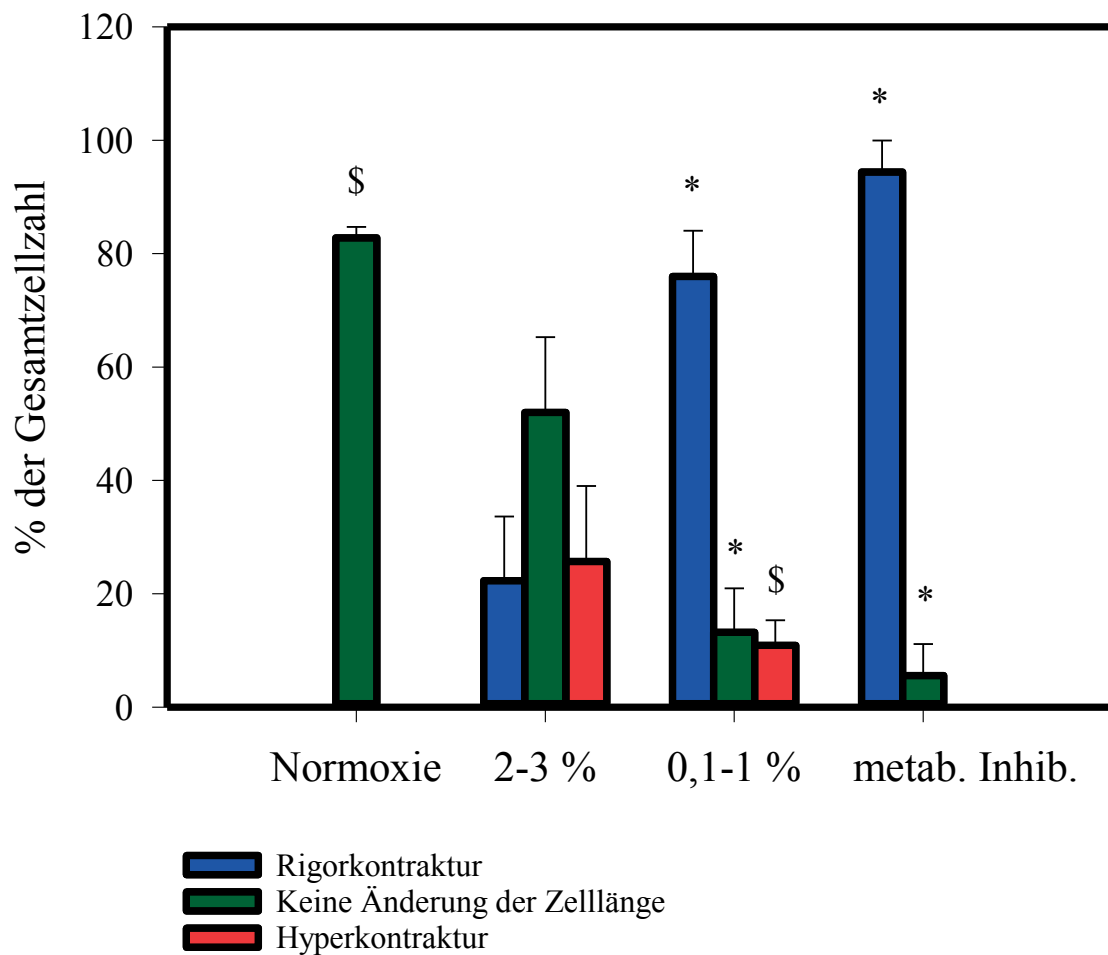


Abb. 3.2: Die Zellmorphologie in der Hypoxie

Die Abbildung zeigt den Anteil in % zur Gesamtzahl der untersuchten Zellen, der eine Rigorkontraktur, eine Hyperkontraktur und keine Änderung der Zelllänge in den Versuchsgruppen entwickelt hat. Zum Vergleich sind Daten unter Normoxie (Raumluft)-Konditionen dargestellt (stäbchenförmigen Zellen nach der Präparation). Die Hypoxie wurde unter den Sauerstoff-Sättigungen 2-3 % und 0,1-1 % simuliert. Die metabolische Inhibierung wurde mit Natriumcyanid (2 mmol/l) induziert. Darstellung als Mittelwert \pm SEM. Normoxie: n = 5 Experimente; 2-3 %: n = 10 Experimente; 0,1-1 %: n = 16 Experimente; metab. Inhib.: n = 9 Experimente.

* $p < 0,05$ vs. 2-3 % Sauerstoff-Sättigung; \$ $p < 0,05$ vs. metab. Inhib.

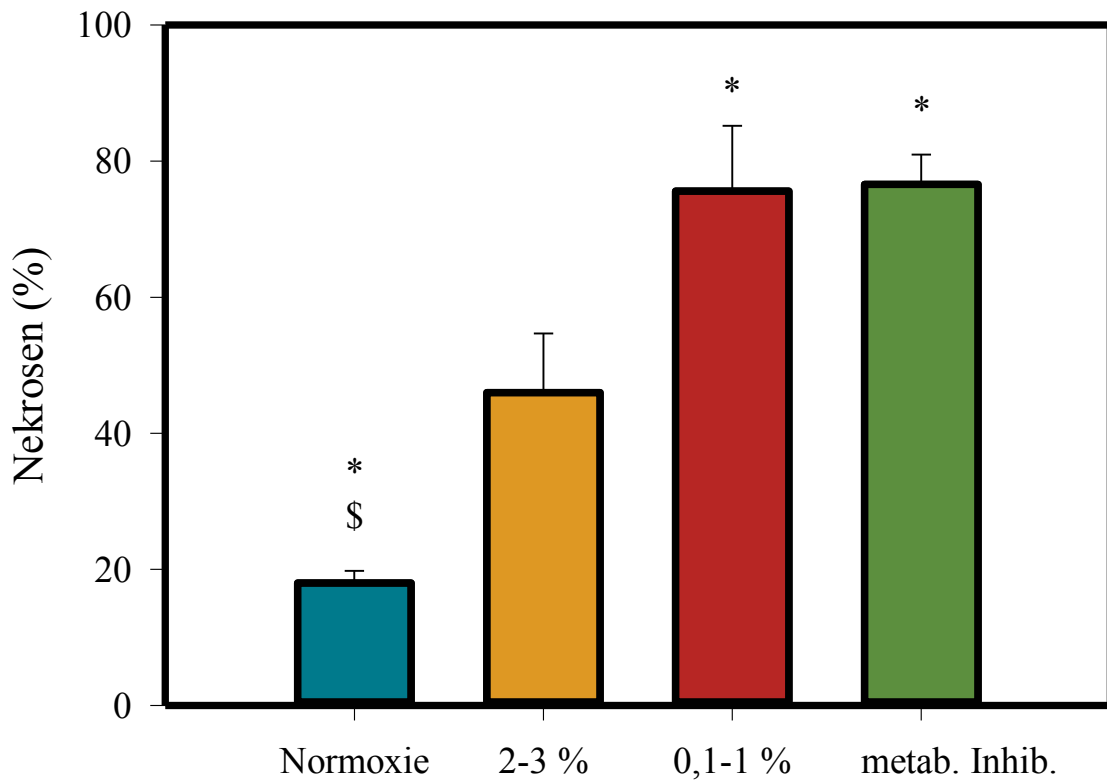


Abb. 3.3: Der Anteil der nekrotischen Zellen nach Hypoxie und Reoxygenation

Die Abbildung zeigt die nekrotischen Zellen in % zur Gesamtzellzahl nach Hypoxie und Reoxygenation. Zum Vergleich sind Daten unter Normoxie (Raumluft)-Konditionen dargestellt (präparationsbedingte Nekrosen). Die Hypoxie wurde unter den Sauerstoff-Sättigungen 2-3 % und 0,1-1 % simuliert. Die metabolische Inhibierung wurde mit Natriumcyanid (2 mmol/l) induziert. Darstellung als Mittelwert \pm SEM. Normoxie: n = 5 Experimente; 2-3 %: n = 8 Experimente; 0,1-1 %: n = 8 Experimente; metab. Inhib.: n = 5 Experimente.

* $p < 0,05$ vs. 2-3 % Sauerstoff-Sättigung; \$ $p < 0,05$ vs. metab. Inhib.

3.2 Zytosolisches Kalzium während Hypoxie und Reoxygenation

Der Anstieg des zytosolischen Kalziums während der Hypoxie zeigte signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen. Der Kalziumanstieg in der Gruppe 0,1-1 % und während metabolischer Inhibierung unterschied sich nicht signifikant ($828,3 \pm 51,2$ r.E. bzw. $738,4 \pm 42,0$ r.E. endhypoxisch). Der Anstieg fiel in der Gruppe 2-3 % geringer aus als in der Gruppe 0,1-1 % und während metabolischer Inhibierung (*siehe Abb. 3.5a*). Auch nach stattgehabter Reoxygenation zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen. In den drei Gruppen kam es zu einem deutlichen Abfall des zytosolischen Kalziums nach 13 min Reoxygenation. Nach der metabolischen Inhibierung zeigte sich darüber hinaus ein verzögerter Abfall des zytosolischen Kalziums in der Reoxygenationsphase im Vergleich zu den Gruppen 2-3 % und 0,1-1 % (*siehe Abb. 3.4*). Der größte Abfall des zytosolischen Kalziums fand in der Gruppe 0,1-1 % statt ($475,5 \pm 42,7$ r.E. in der 13. Minute der Reoxygenation; *siehe Abb. 3.5b*). Das Kalzium zu Versuchsbeginn (normoxisches Kalzium) wies keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen auf.

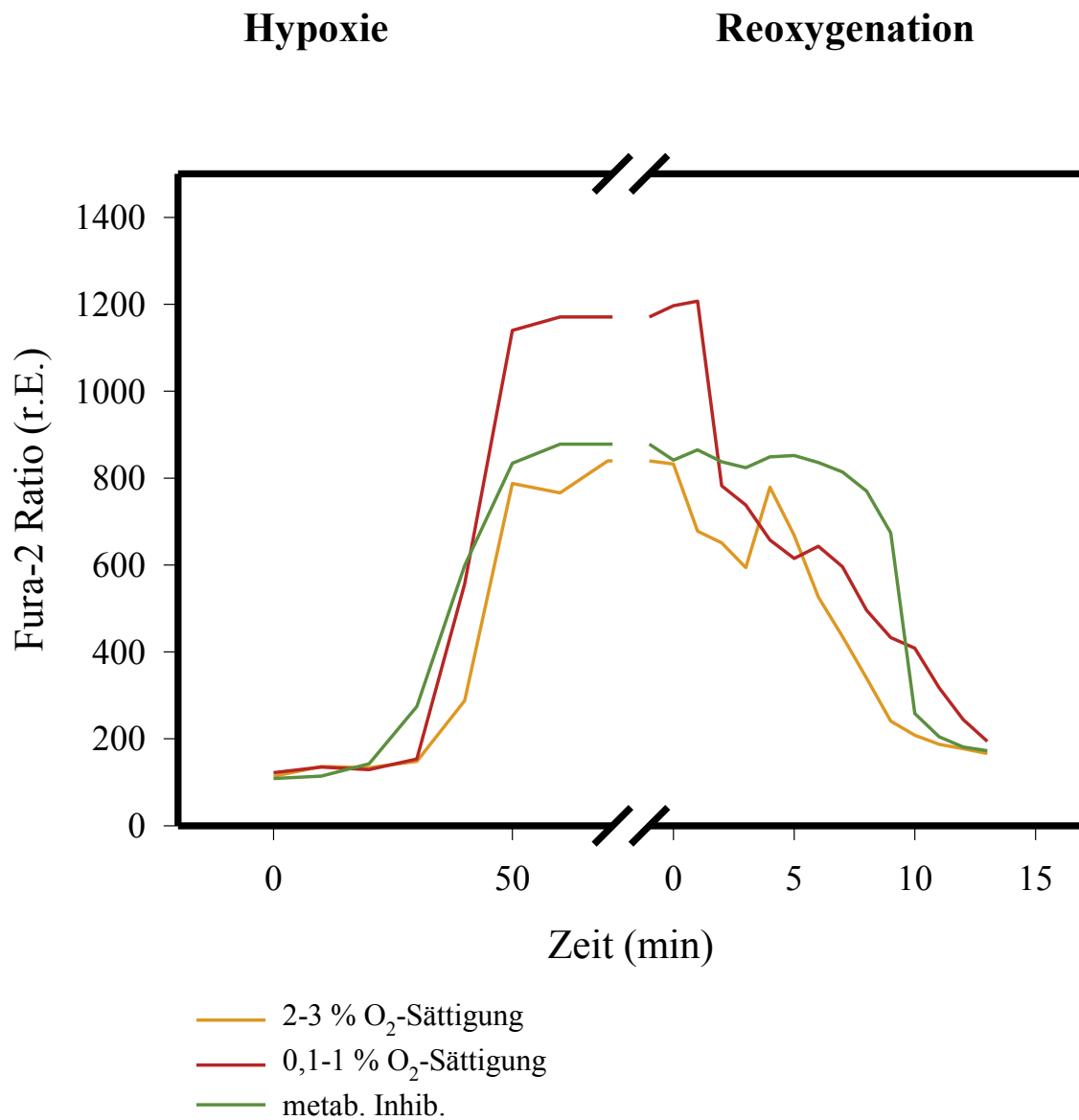


Abb. 3.4: Das zytosolische Kalzium während Hypoxie und Reoxygenation

Exemplarische Darstellung der zytosolischen Kalzium-Konzentration in einzelnen Zellen während der Hypoxie und der Reoxygenation. Gemessen als Fura-2 Ratio in relativen Einheiten (r.E.). Die Hypoxie wurde unter den Sauerstoff-Sättigungen 2-3 % und 0,1-1 % simuliert. Die metabolische Inhibierung wurde mit Natriumcyanid (2 mmol/l) induziert.

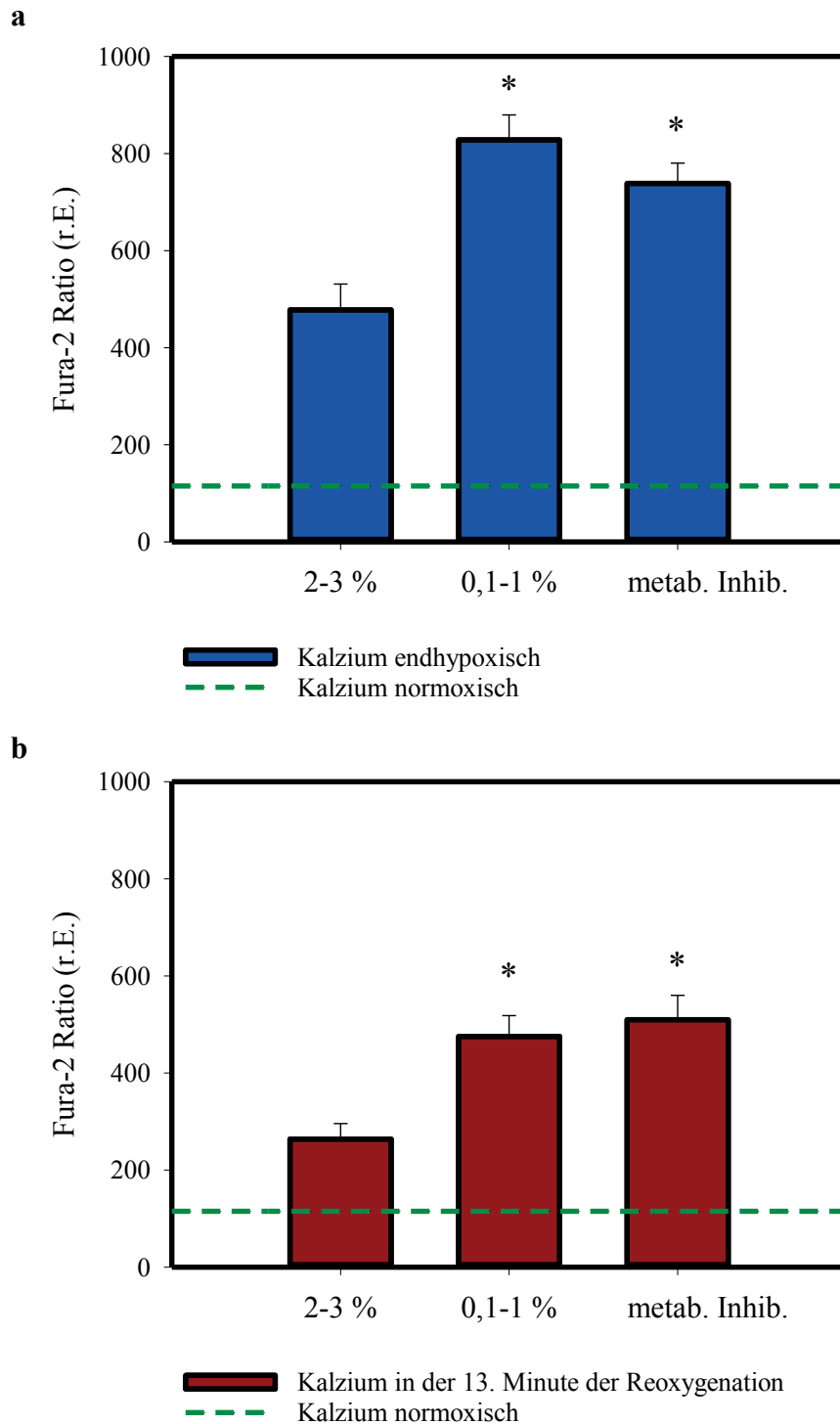


Abb. 3.5a, b: Das zytosolische Kalzium nach Hypoxie und Reoxygenation

Die Abbildung 3.5a zeigt die zytosolische Kalzium-Konzentration am Ende der Hypoxie (endhypoxisch). Gemessen als Fura-2 Ratio in relativen Einheiten (r.E.). Die Abbildung 3.5b zeigt die zytosolische Kalzium-Konzentration in der 13. Minute der Reoxygenation. Das normoxische Kalzium (= Kalzium zu Versuchsbeginn) wird ebenfalls dargestellt. Die Hypoxie wurde unter den Sauerstoff-Sättigungen 2-3 % und 0,1-1 % simuliert. Die metabolische Inhibierung wurde mit Natriumcyanid (2 mmol/l) induziert. Darstellung als Mittelwert \pm SEM. 2-3 %: n = 69 Zellen; 0,1-1 %: n = 98 Zellen; metab. Inhib.: n = 68 Zellen.

* $p < 0,05$ vs. 2-3 % Sauerstoff-Sättigung

3.3 Zytosolische Kalzium-Oszillationen während der Reoxygenation

Während der Reoxygenation sind zytosolische Kalzium-Oszillationen messbar, die vor allem durch die rasche Freisetzung und Wiederaufnahme von Kalzium aus dem Zytosol durch das sarkoplasmatische Retikulum entstehen. Die Anzahl der Kalzium-Oszillationen pro Minute, gemessen als Fura-2 Ratio, wurde in dieser Arbeit unter den genannten drei Konditionen untersucht. Die Kalzium-Oszillationen pro Minute betragen in der Gruppe 0,1-1 % in der 7. Reoxygenationsminute $10,3 \pm 1,2$. Nach der metabolischen Inhibierung begannen die Oszillationen etwas verzögert in der Reoxygenationsphase im Vergleich zur Gruppe 2-3 % und 0,1-1 % (*siehe Abb. 3.6*). In der 7. Reoxygenationsminute betrug die Anzahl der Kalzium-Oszillationen in der Gruppe metabolische Inhibierung $6,6 \pm 1,3$ pro Minute (*siehe Abb. 3.7*).

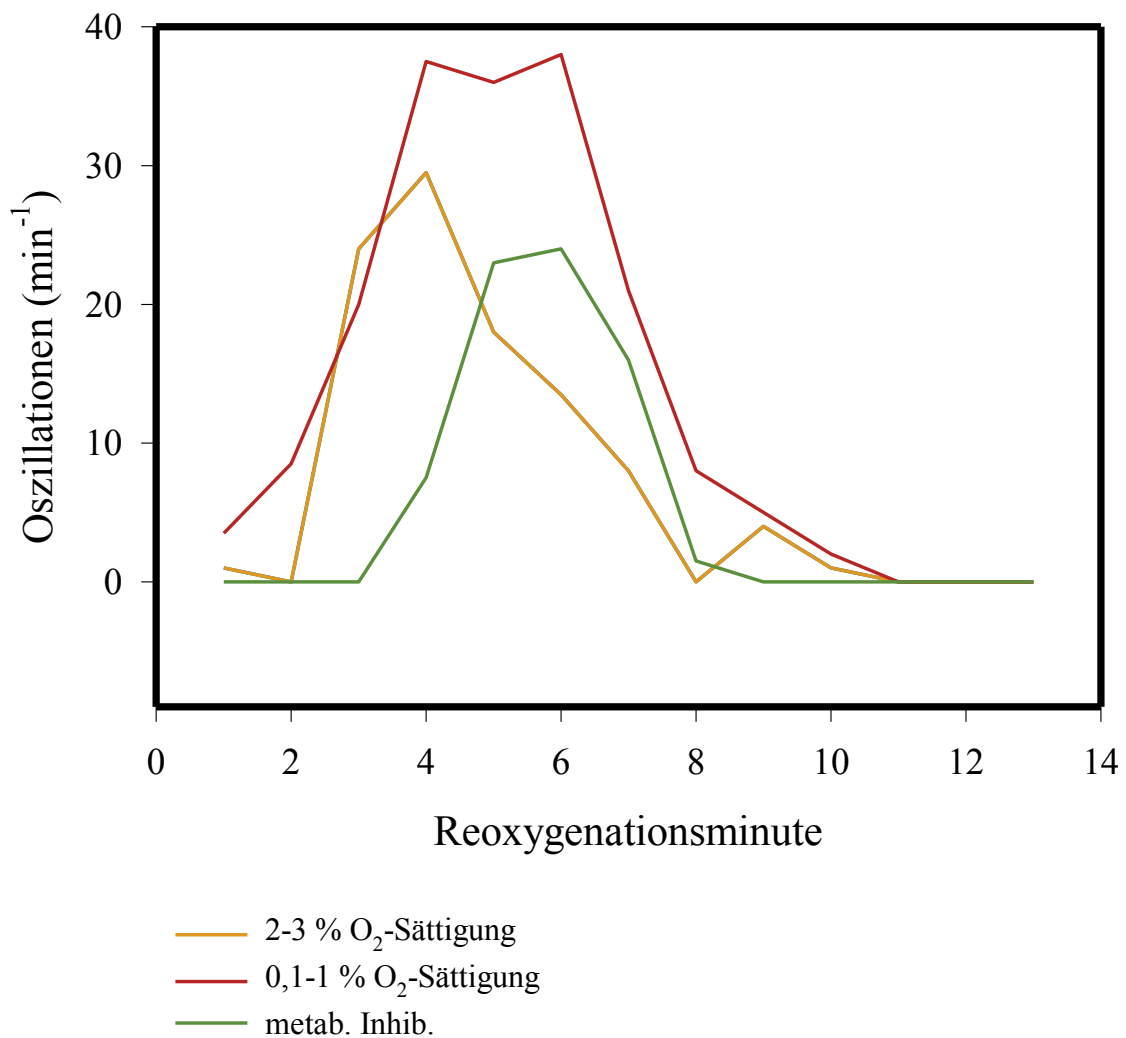


Abb. 3.6: Die Kalzium-Oszillationen während der Reoxygenation

Exemplarische Darstellung der Oszillationen pro Minute des zytosolischen Kalziums in einzelnen Zellen in der jeweiligen Reoxygenationsminute. Gemessen als Fura-2 Ratio in relativen Einheiten (r.E.). Die Hypoxie wurde unter den Sauerstoff-Sättigungen 2-3 % und 0,1-1 % simuliert. Die metabolische Inhibierung wurde mit Natriumcyanid (2 mmol/l) induziert.

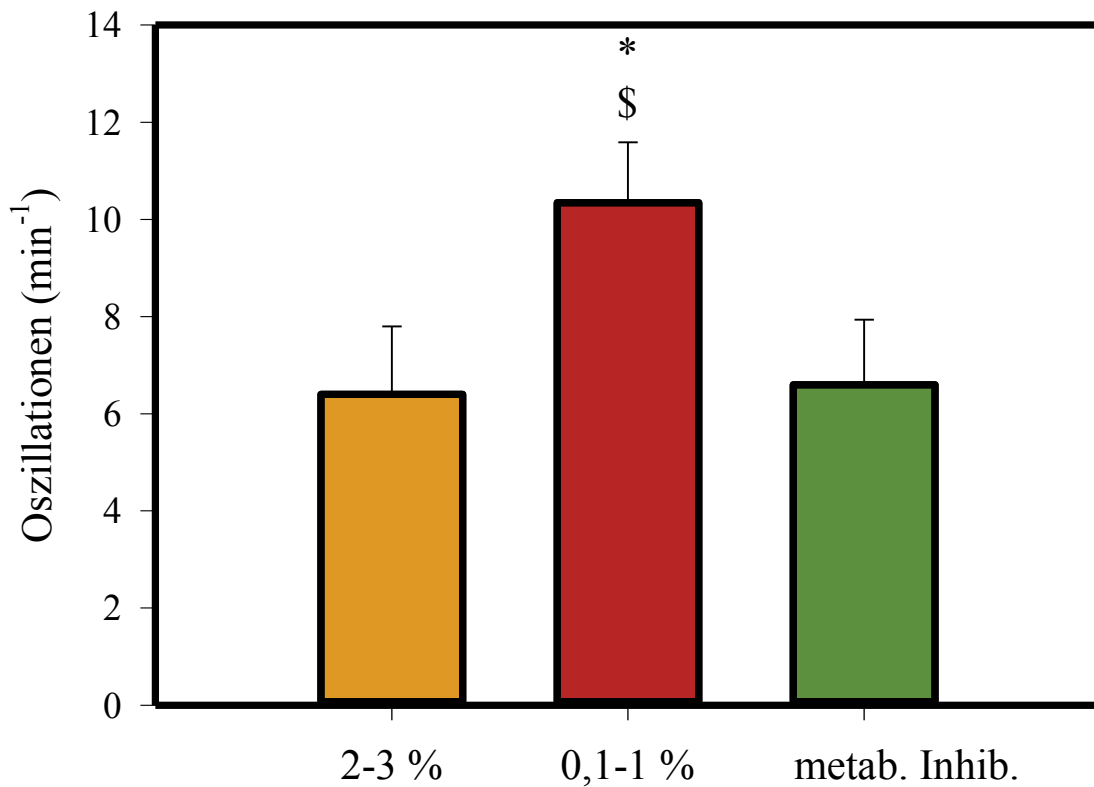


Abb. 3.7: Die Kalzium-Oszillationen in der 7. Minute der Reoxygenation

Die Abbildung zeigt die Oszillationen pro Minute des zytosolischen Kalziums in der 7. Reoxygenationsminute. Gemessen als Fura-2 Ratio in relativen Einheiten (r.E.). Die Hypoxie wurde unter den Sauerstoff-Sättigungen 2-3 % und 0,1-1 % simuliert. Die metabolische Inhibierung wurde mit Natriumcyanid (2 mmol/l) induziert. Darstellung als Mittelwert \pm SEM. 2-3 %: n = 69 Zellen; 0,1-1 %: n = 98 Zellen; metab. Inhib.: n = 68 Zellen.

* $p < 0,05$ vs. 2-3 % Sauerstoff-Sättigung; \$ $p < 0,05$ vs. metab. Inhib.

3.4 Amplitude der Kalzium-Oszillationen während der Reoxygenation

Die Amplitude der Kalzium-Oszillationen während der Reoxygenationsphase wurde aus der Differenz der höchsten (systolischen) und niedrigsten (diastolischen) Werte der zytosolischen Kalzium-Oszillationen bestimmt. Die Amplitude stieg in den Gruppen 2-3 % und 0,1-1 % früher an als in der Gruppe metabolische Inhibierung (*siehe Abb. 3.8*). Für die statistische Auswertung wurde der gleiche Zeitpunkt wie für die Kalzium-Oszillationen betrachtet. In der 7. Minute der Reoxygenation fiel die Höhe der Amplitude der Kalzium-Oszillationen in der Gruppe 0,1-1 % und der metabolischen Inhibierung höher als in der Gruppe 2-3 % aus. Dieser Unterschied war signifikant. Die Amplitude betrug zu diesem Zeitpunkt in der Gruppe 0,1-1 % $132,6 \pm 12,7$ r.E.; *siehe Abb. 3.9*.

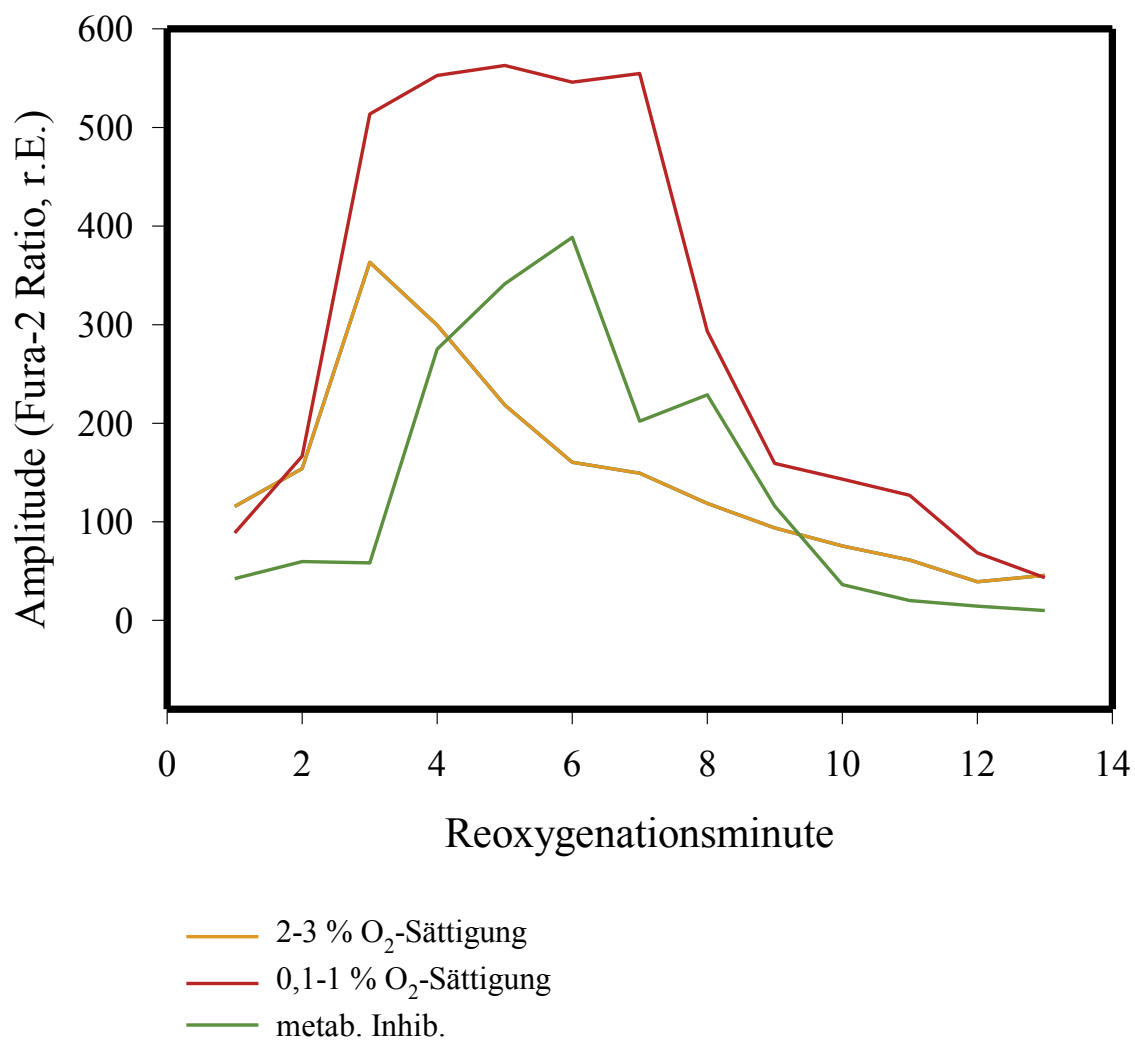


Abb. 3.8: Die Amplitude der Kalzium-Oszillationen während der Reoxygenation

Exemplarische Darstellung der Amplitude der Kalzium-Oszillationen in einzelnen Zellen in der jeweiligen Reoxygenationsminute. Gemessen als Fura-2 Ratio in relativen Einheiten (r.E.). Die Hypoxie wurde unter den Sauerstoff-Sättigungen 2-3 % und 0,1-1 % simuliert. Die metabolische Inhibierung wurde mit Natriumcyanid (2 mmol/l) induziert.

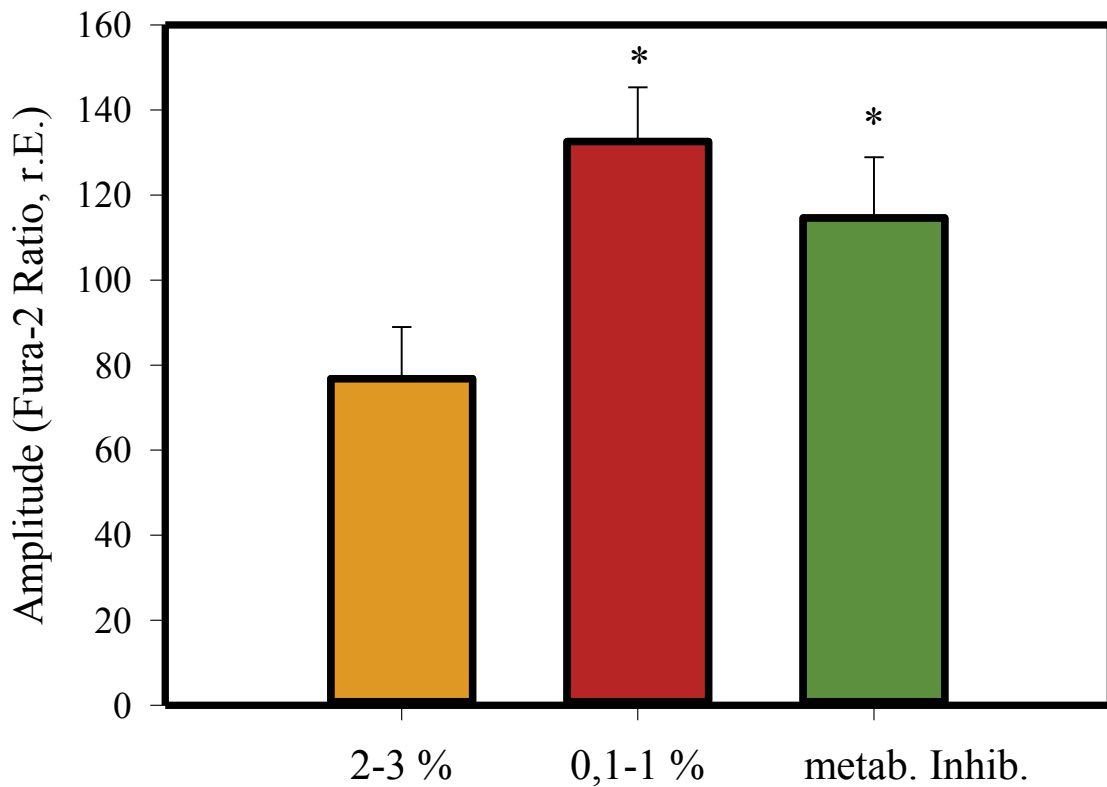


Abb. 3.9: Die Amplitude der Kalzium-Oszillationen in der 7. Minute der Reoxygenation
 Die Abbildung zeigt die Amplitude der Kalzium-Oszillationen in der 7. Reoxygenationsminute. Gemessen als Fura-2 Ratio in relativen Einheiten (r.E.). Die Hypoxie wurde unter den Sauerstoff-Sättigungen 2-3 % und 0,1-1 % simuliert. Die metabolische Inhibierung wurde mit Natriumcyanid (2 mmol/l) induziert. Darstellung als Mittelwert \pm SEM. 2-3 %: n = 69 Zellen; 0,1-1 %: n = 98 Zellen; metab. Inhib.: n = 68 Zellen.
 * $p < 0,05$ vs. 2-3 % Sauerstoff-Sättigung

4. Diskussion

4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse:

1. In dieser Arbeit sollte der Einfluss der Hypoxie-Intensität auf die Kontraktur- und Nekroseentwicklung im Hypoxie-/Reoxygenationsexperiment untersucht werden. Es zeigte sich, dass mit zunehmendem Energiedefizit die Entwicklung der Rigorkontraktur zunimmt. Die Entwicklung des nekrotischen Zellschadens in der Reoxygenation, vor allem in Form irreversibler Hyperkontrakturen, steigt ebenso mit der Intensität der vorangehenden Hypoxie.

Hyperkontrakturen können sowohl nach stattgehabter Rigorkontraktur in der Reoxygenation als auch spontan während milder Hypoxie auftreten. Zellen, die eine Rigorkontraktur in der simulierten Ischämie entwickelt haben, können durch rechtzeitige Reoxygenation vor der Hyperkontraktur respektive dem nekrotischen Zelltod bewahrt werden.

2. Es zeigte sich weiterhin, dass hohe endischämische zytosolische Kalzium-Konzentrationen eng mit der Entwicklung von irreversiblen Hyperkontrakturen in der Reoxygenation verknüpft sind.

3. Bezüglich des Ausmaßes der Nekrose und des zytosolischen Kalziumanstiegs ist die metabolische Inhibierung am ehesten mit einer Sauerstoff-Sättigung von 0,1-1 % vergleichbar. Allerdings sind bei maximal induziertem Energiedefizit keine spontanen irreversiblen Hyperkontrakturen erkennbar.

4.2 Die Entwicklung der Rigorkontraktur steigt mit sinkendem ATP-Angebot

Die vorliegende Arbeit verdeutlicht, dass die Hypoxie-Intensität entscheidenden Einfluss auf die Entwicklung der Rigorkontraktur hat. Die Anzahl der Zellen, die eine Rigorkontraktur entwickelt, steigt demnach mit sinkender Sauerstoff-Sättigung (*siehe Tab. 2*). Die Rigorkontraktur ist abhängig vom ATP-Gehalt in der Zelle (Nichols und Lederer 1990; Ventura-Clapier und Veksler 1994). Es kann also davon ausgegangen werden, dass das Angebot an ATP unter metabolische Inhibierung am geringsten war. Während metabolischer Inhibierung könnte eine zusätzliche mitochondriale ATP-Hydrolyse durch die ATP-Synthase in der Atmungskette stattfinden, was bei reiner Hypoxie nicht der Fall ist (Noll et al. 1992). Vor diesem Hintergrund wären auch die unterschiedlichen Ergebnisse der Gruppe 0,1-1 % und der Gruppe metabolische Inhibierung bezüglich der Rigorkontraktur erklärbar. Die ATP-Vorräte sind unter metabolischer Inhibierung, im Vergleich zur physiologischen Hypoxie, schneller aufgebraucht. Demnach ist die Wahrscheinlichkeit der Entwicklung einer Rigorkontraktur unter metabolischer Inhibierung am größten. Es scheinen dennoch nicht alle Zellen, die eine Rigorkontraktur vollziehen, auch eine Hyperkontraktur in der Reoxygenation zu entwickeln. So unterstreicht diese Arbeit, dass nicht jede Zelle, die eine Rigorkontraktur vollzieht, auch einen irreversiblen Schaden nehmen muss. Eine Erholung durch rechtzeitige Reoxygenation erscheint plausibel. In der Literatur finden sich ebenfalls Hinweise auf diesen Aspekt (Stern et al. 1985; Siegmund et al. 1993).

Einige Autoren gehen davon aus, dass eine ATP-abhängige Kontraktur auch nach der Reoxygenation auftreten kann, wenn eine langsame Wiederaufnahme der Energieproduktion stattfindet. Hier wird eine Abgrenzung zur kalziumvermittelten Kontraktur nach schneller Energiebereitstellung vorgenommen. Eine ATP-abhängige Kontraktur kann laut Ladilov et al. ohne zytosolische Kalziumüberladung in der Reperfusion stattfinden und ebenso wie die kalziumvermittelte Hyperkontraktur mit einer starken Zellverkürzung einhergehen (Piper et al. 2003; Ladilov et al. 2003). Ein Zustand der langsamen ATP-Bereitstellung in den Mitochondrien könnte unter der metabolischen Inhibierung induziert mit Natriumcyanid (2 mmol/l) stattgefunden haben. Allerdings war nach der metabolischen Inhibierung in der Regel das zytosolische Kalzium erhöht, sodass die kalziumvermittelte Hyperkontraktur in unserer Arbeit eher in Betrachtung kommt.

Die Rigorkontraktur wird von einigen Autoren als Schutzmechanismus für die ischämischen Zellen angesehen. So könnte der ischämischen Kontraktur eine Schutzfunktion für die Kardiomyozyten vor Überdehnung und konsekutiver Membranruptur zuteilwerden. Das gesamte Herz würde darüber hinaus vor einer Dilatation oder einer Aneurysmbildung (Aussackung der Herzwand) bewahrt (Ventura-Clapier und Veksler 1994).

4.3 Spontane Hyperkontrakturen treten bei kritischen Hypoxie-Zuständen auf

Eine interessante Beobachtung ist das Auftreten von Hyperkontrakturen, bereits während der Hypoxie. Hier trat die größte Anzahl in der Gruppe 2-3 % auf. Der im Vergleich zu den anderen Gruppen höhere Standardfehler in der Gruppe 2-3 % spiegelt das inhomogene Verhalten der Zellen unter diesen Bedingungen wider. Der Großteil der Zellen toleriert die milde Hypoxie, aber es entwickelt auch ca. ein Viertel der Myozyten eine spontane Hyperkontraktur. Der Energiemetabolismus ist unter 2-3 % Sauerstoffsättigung also in den jeweiligen Zellen unterschiedlich. Während metabolischer Inhibierung war hingegen keine Hyperkontraktur der Zellen erkennbar. Dies macht deutlich, dass für die Entwicklung der Hyperkontraktur ATP benötigt wird. Durch die metabolische Inhibierung befinden die Zellen sich in einem Zustand der maximalen Energieverarmung. Deshalb treten Hyperkontrakturen erst in der Reoxygenation auf (*siehe Tab. 2*).

Die Anzahl der nekrotischen Zellen nach der Reoxygenation steigt, je ausgeprägter die vorige Hypoxie-Intensität ist (*siehe Abb. 3.3*). Die metabolische Inhibierung kann ein Modell für den kompletten Verschluss eines Koronargefäßes darstellen. Im klinischen Alltag trifft das am ehesten auf den STEMI zu. Die Konditionen für die Gruppe 2-3 % stellen einen Teilverschluss des Gefäßes dar. Diese pathophysiologischen Rahmenbedingungen könnten bei einem NSTEMI auftreten (Grech und Ramsdale 2003; Amsterdam et al. 2014). Die Konditionen für die Gruppe 0,1-1 % könnten sowohl beim STEMI als auch beim NSTEMI vorkommen.

In vivo ist das Infarktgebiet allerdings in der Regel durch verschiedene Zonen mit unterschiedlich ausgeprägten Kollateralflüssen und differierendem Energiebedarf

gekennzeichnet (Dunn und Griggs, Jr. 1975; Bishop et al. 1976; Reimer et al. 1977). Das Infarktareal ist inhomogen und deshalb ist es gut vorstellbar, dass die Bedingungen für jede Gruppe auch zeitgleich im Myokard auftreten können.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass ein beachtlicher Anteil der Kardiomyozyten bereits in der Hypoxie eine Hyperkontraktur und damit den Zelltod entwickeln kann. Manöver, die erst mit Beginn der Reperfusion beginnen, sind somit wirkungslos auf diese Zellen. Zu nennen wären hier das Postconditioning oder die Gabe von Pharmaka wie CspA. Die groß angelegte und viel beachtete CIRCUS-Studie konnte keinen positiven Effekt von Ciclosporin auf die Überlebensrate und die Entwicklung der Herzinsuffizienz bei STEMI-Patienten, die mittels PCI behandelt wurden, zeigen (Cung et al. 2015). Ebenso zeigte die Anwendung eines Postconditioning-Protokolls in der klinischen Studie von Freixa et al. weder eine Reduktion der Infarktgröße noch eine verbesserte linksventrikuläre Pumpfunktion (Freixa et al. 2012). Die Autoren diskutieren als mögliche Gründe Komorbiditäten, die Zusammensetzung der verwendeten Pharmaka oder koronare Mikroembolien, die durch die mechanische Intervention ausgelöst wurden. Für den kardialen Ischämie-Reperfusionsschaden ist vor allem die Entwicklung sogenannter Kontraktionsbandnekrosen verantwortlich, die durch die Hyperkontraktur der Kardiomyozyten entstehen (Piper et al. 2004).

Die vorliegende Arbeit gibt nun Hinweise auf die Entstehung dieser Nekrosen unter Hypoxie-Bedingungen und könnte eine weitere Erklärung für die negativen Studienergebnisse darstellen. Manöver, die erst in der Reperfusion durchgeführt werden, können das irreversibel geschädigte Myokard nicht retten und zeigen demnach auch keine Wirkung.

Unsere Ergebnisse deuten auf kritische Sauerstoff-Konzentrationen hin, die in den Zellen eine Hyperkontraktur auslösen. Es ist außerdem vorstellbar, dass diese kritischen Sauerstoff-Konzentrationen während einer PCI auftreten, ausgelöst durch Mikroembolien. Analog zu dieser Arbeit, beobachteten Silverman et al. unter milder Hypoxie (pO_2 : 1-3 Torr) ebenfalls einen Strukturverlust einiger Kardiomyozyten, der unter Anoxie ($pO_2 < 0,02$ Torr) nicht auftrat (Silverman et al. 1992). 1 % Sauerstoffsättigung entspricht etwa 1,6 Torr, sodass unsere Beobachtungen mit denen von Silverman et al. nahezu kongruent sind. Die Autoren der genannten Arbeit halten einen spontanen Anstieg des Kalziums im sarkoplasmatischen Retikulum als ursächlich für die mechanischen Oszillationen, die schließlich zum Verlust der stäbchenförmigen

Morphologie führen. Aus unserer Studie sind die genauen Mechanismen, die zu einer Hyperkontraktur in der Hypoxie führen, nicht zu eruieren. In der Regel ging diese mit einem starken zytosolischen Kalziumanstieg in der Zelle einher.

4.4 Die Rolle der Kalziumhomöostase unter steigender Hypoxie-Intensität

Bezüglich des zytosolischen Kalziumanstiegs in der simulierten Ischämie wiesen die Gruppe 0,1-1 % und die Gruppe metabolische Inhibierung vergleichbare Werte auf. In der Gruppe 2-3 % erreichte das Kalzium einen kleineren Wert (*siehe Abb. 3.5a*).

Unsere Arbeit verdeutlicht, dass die Höhe der endhypoxischen Kalziumüberladung in Zusammenhang mit der Entwicklung von Hyperkontrakturen in der nachfolgenden Reoxygenation steht. Demnach steigt das Ausmaß an nekrotischen Zellen mit der Höhe der endischämischen Kalzium-Konzentration. Diese Beobachtung spricht für die These der kalziumvermittelten Hyperkontraktur (Piper et al. 2003).

Der zytosolische Kalziumanstieg entsteht durch den reverse-mode des Natrium/Kalzium-Austauschers, nachdem nicht mehr genug Energie für die Natrium/Kalium-ATPase zur Verfügung steht. Sind die Mitochondrien in der Ischämie nicht geschädigt worden, kann in der Reperfusion eine Erholung von der Kalziumüberladung stattfinden. Diese kann von der Hyperkontraktur des Kardiomyozyten begleitet werden (Piper et al. 2004; Garcia-Dorado et al. 2012).

In unseren Vorversuchen war bei höheren Sauerstoff-Sättigungen als 2-3 % keine Rigorkontraktur erkennbar. Hier könnten zelluläre Mechanismen wie die Verringerung von Sauerstoff-Gradienten zu einem Schutz der Kardiomyozyten beigetragen haben (Piper et al. 1994; Takahashi und Doi 1996).

Kurze Ischämieepisoden, vor der eigentlichen Ischämie, bezeichnet man als Preconditioning. Große klinische Studien konnten allerdings keinen positiven Effekt des (remote) Preconditionings für das Herz aufzeigen (Meybohm et al. 2015; Hausenloy et al. 2015).

Auf die Nierenfunktion hingegen, wie jüngst veröffentlichte Studienergebnisse zeigen, wirkt sich das (remote) Preconditioning protektiv im Vergleich zur Kontrollgruppe aus

(Zarbock et al. 2017). In letztgenannter Studie wurde, im Gegensatz zu den beiden erstgenannten, auf die Anwendung des Anästhetikums Propofol verzichtet.

Noll et al. führten an isolierten Kardiomyozyten der Wistar Ratte Experimente zum Energiestoffwechsel unter sinkenden Sauerstoffpartialdrücken durch und zeigten folgende Zusammenhänge: Die Sauerstoffaufnahme der Zellen ist im Bereich von 150-5 Torr nahezu konstant. Ab 5 Torr beginnt ein starker Abfall der Sauerstoffaufnahme (Noll et al. 1992). Diese kritische Grenze könnte in unserer Arbeit bei ca. 3 % Sauerstoff-Sättigung erreicht worden sein. Ab diesem Wert konnten eine Kalziumüberladung und die Entwicklung der Rigorkontraktur beobachtet werden.

In der Gruppe metabolische Inhibierung war der Abfall des zytosolischen Kalziums geringer als in der Gruppe 0,1-1 % (*siehe Abb. 3.5a, b*). Die Anzahl der Nekrosen in Gruppe 0,1-1 % und nach metabolischer Inhibierung war vergleichbar (*siehe Abb. 3.3*). Dies deutet darauf hin, dass die Zellen während metabolischer Inhibierung häufiger einen schweren Schaden entwickelt haben. Einen Erklärungsansatz für diesen Schaden könnte die oben beschriebene zusätzliche ATP-Hydrolyse unter metabolischer Inhibierung darstellen. Laut Ladilov et al. findet in den betroffenen Zellen während der Reoxygenation keine Energiebereitstellung und folglich keine Hyperkontraktur statt, da die Mitochondrien in der Ischämie bereits irreversibel geschädigt worden sind (Ladilov et al. 2003). Das zytosolische Kalzium bleibt während der Reperfusion in den betroffenen Kardiomyozyten ebenfalls unverändert hoch, was den geringeren Abfall der Kalzium-Konzentration nach metabolischer Inhibierung im Vergleich zur Gruppe 0,1-1 % erklärt. In der Literatur finden sich ebenfalls Hinweise auf diesen Aspekt (Siegmond et al. 1993). Das Absinken des zytosolischen Kalziums nach metabolischer Inhibierung zeigte eine zeitliche Verzögerung im Vergleich zu den Hypoxie-Gruppen (*siehe Abb. 3.4*). Es ist anzunehmen, dass das Natriumcyanid zu Beginn der Reoxygenation noch intrazellulär lokalisiert war. Erst nach zwei bis drei Minuten wurde das Cyanid ausgewaschen und die Mitochondrien konnten wieder Energieträger bereitstellen. Auf diesen Aspekt sollte in Reperfusionsexperimenten (Reoxygenationsexperimenten) nach metabolischer Inhibierung geachtet werden, um die Wirkung applizierter Pharmaka richtig interpretieren zu können.

4.5 Die Kalzium-Oszillationen als Korrelat für Herzrhythmusstörungen

Aktuelle klinische Studien zeigen das Auftreten von Rhythmusstörungen nach durchgeführter PCI. Diese können sowohl ventrikulären als auch supraventrikulären Ursprungs sein (Liang et al. 2016; Romanov et al. 2017). Diese Arrhythmien sprechen für einen Schaden, der durch die Reperfusion induziert wurde. In der vorliegenden Arbeit wurden die Kalzium-Oszillationen in der Reoxygenationsphase detektiert. Diese Oszillationen können das Korrelat auf Zellebene zu den Arrhythmien darstellen (Allshire et al. 1987; Thandroyen et al. 1988). Hier zeigte sich die größte Anzahl an Oszillationen in der Gruppe 0,1-1 %. In der Gruppe 2-3 % trat eine ähnliche Anzahl an Oszillationen wie nach metabolischer Inhibierung auf (*siehe Abb. 3.7*). Dieser Befund hebt die Bedeutung von Hypoxie für die Entwicklung von Rhythmusstörungen hervor. Überträgt man unsere Ergebnisse auf das Myokard, so scheint dieses tendenziell anfälliger für Arrhythmien nach einem NSTEMI im Vergleich zum STEMI zu sein. Analog zu der Entstehung der Hyperkontrakturen während der Hypoxie, zeigt sich anhand der Oszillationen die besondere Bedeutung von kritischen Hypoxie-Intensitäten für das Herz.

Erkenntnisse aus anderen Arbeiten demonstrieren die Bedeutung der Mitochondrien als Ort für die Entstehung von Herzrhythmusstörungen. Akar et al. zeigten in ihren Experimenten, dass postischämische Arrhythmien eng mit dem Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\Psi_m$) verknüpft sind (Akar et al. 2005). Auch neuere Studien spiegeln letztgenannten Aspekt wider und weisen auf Oszillationen des mitochondrialen Membranpotentials in der Reperfusion hin (Solhjoo und O'Rourke 2015). Durch das hohe zytosolische Kalzium und insbesondere durch die Kalzium-Oszillationen und die hohe Amplitude könnte es des Weiteren zu einer mitochondrialen Kalziumüberladung kommen. Diese ist, wie oben bereits erläutert, an der Öffnung der mPTP beteiligt und kann auf diesem Wege zu einer Aggravation des Reperfusionsschadens führen (Griffiths und Halestrap 1995; Crompton 1999). Die höchste Amplitude in der 7. Minute der Reoxygenation wiesen die Gruppen 0,1-1 % und die Gruppe metabolische Inhibierung auf (*siehe Abb. 3.9*). Die Daten zeigen die Bedeutung von hohen zytosolischen Kalzium-Spitzenkonzentrationen in Kombination mit Kalzium-Oszillationen für die Entwicklung der Hyperkontraktur in der Reoxygenation. Besondere Bedeutung für den mitochondrialen Kalziumanstieg und

somit konsekutiv für die Entwicklung des irreversiblen Zellschadens scheint unterdessen die Kalzium-Konzentration in Mikrodomänen zwischen dem sarkoplasmatischen Retikulum und dem Mitochondrium zu haben (Szalai et al. 2000; Kohlhaas und Maack 2013). Es lässt sich eine Verbindung zu früheren Arbeiten herstellen, in denen eine hohe Amplitude des zytosolischen Kalziums mit einem hohen Anteil an nekrotischen Zellen einherging (Abdallah et al. 2011; Johnson 2015).

4.6 Die Ausbreitung der Hyperkontraktur im Myokard

Bei der Betrachtung der nekrotischen Zellen nach stattgehabter Reoxygenation zeigte sich der größte Zellschaden in den Gruppen 0,1-1 % und der Gruppe metabolische Inhibierung. Weniger Nekrosen entwickelten sich in der Gruppe 2-3 % (*siehe Abb. 3.3*). Man kann aus diesen Daten also schließen, dass der myokardiale Ischämie-/Reperfusionsschaden abhängig von der Hypoxie-Intensität in der Ischämie ist. Der Anteil der nekrotischen, irreversibel hyperkontrahierten Zellen nach der Reoxygenation steigt mit sinkender Sauerstoff-Konzentration in der vorangehenden Ischämie.

In der vorliegenden Studie wurden isolierte Kardiomyozyten betrachtet. In vivo allerdings bilden die Zellen des Herzens ein funktionelles Synzytium. Die Zellen stehen in Kontakt und können Ionen untereinander austauschen. Ruiz-Meana et al. wiesen Ionenströme zwischen benachbarten Kardiomyozyten nach, die zur Hyperkontraktur der Nachbarzellen führen können (Ruiz-Meana et al. 1999). Darüber hinaus weisen Piper et al. darauf hin, dass hyperkontrahierende Zellen mechanische Kräfte auf andere Zellen im Zellverband ausüben. Dies stellt eine weitere Möglichkeit zur Entstehung des myokardialen Ischämie-/Reperfusionsschadens dar (Piper und García-Dorado 1999; Piper et al. 2003). Dieser Sachverhalt ist allerdings in dieser Arbeit aufgrund der Untersuchung von singulären Zellen nicht zu eruieren.

Wie bereits erwähnt, lassen sich im reperfundierten Herzmuskelgewebe, nach der histologischen Aufarbeitung, Kontraktionsbandnekrosen nachweisen (Ganote 1983). Diese sind auf der zellulären Ebene vereinbar mit den in dieser Arbeit ausgezählten nekrotischen, hyperkontrahierten Zellen. Diese Myozyten könnten des Weiteren durch die abrupte Freisetzung intrazellulärer Bestandteile zu einer Entzündungsreaktion

beitragen. Im reperfundierten Gewebe konnten bereits Entzündungszellen mit chemotaktischer Aktivität nachgewiesen werden (Dreyer et al. 1989; Albertine et al. 1994).

Wenn Kardiomyozyten, wie in dieser Arbeit gezeigt, bereits in der Ischämie eine Hyperkontraktur entwickeln, kann es durch die zuvor beschriebenen Zell-Zell Interaktionen zu großen Schäden im Myokard noch vor der eventuellen Reperfusion kommen (*siehe Abb. 4.1*). So kann eine Infarktnarbe durch die Weiterleitung mechanischer Kräfte während der Hyperkontraktur entstehen. Die vorliegende Arbeit verdeutlicht, dass unter kritischen Hypoxie-Zuständen eine Hyperkontraktur sowohl in der Ischämie als auch in der Reperfusion stattfindet. Kaul et al. beschreiben in einer aktuellen Studie eine höhere kumulative Inzidenz der Herzinsuffizienz bei Patienten nach einem NSTEMI, verglichen mit Patienten, die wegen eines STEMI vorstellig wurden (Kaul et al. 2013). Die eben vorgestellten Aspekte können das Korrelat auf zellulärer Ebene zur Entstehung der Herzinsuffizienz bei dem NSTEMI Patientenkollektiv darstellen. Es ist demnach vorstellbar, dass die besagten kritischen Hypoxie-Zustände bevorzugt beim NSTEMI auftreten.

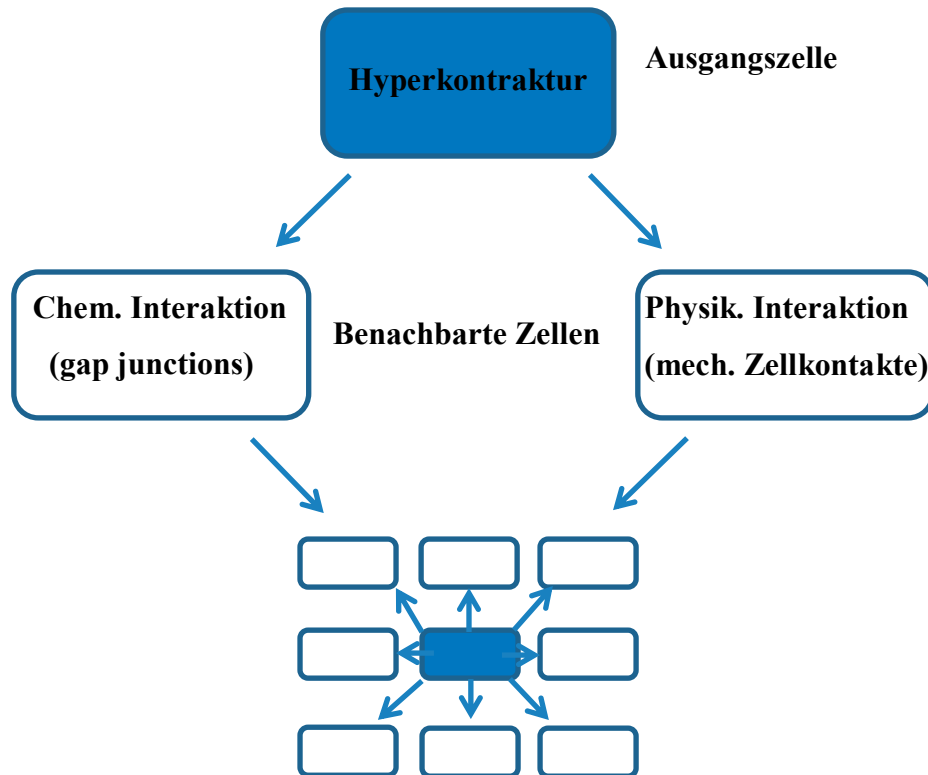


Abb. 4.1 Die Ausbreitung der Hyperkontraktur im Myokard (Abbildung modifiziert nach Piper und García-Dorado 1999)
 Die Abbildung zeigt schematisch Ausbreitungsmechanismen der Hyperkontraktur im Myokard. Einerseits kann die Ausbreitung über gap junctions (chemische Interaktion) stattfinden. Andererseits können mechanische Zellkontakte (physikalische Interaktion) die Ausbreitung der Hyperkontraktur begünstigen.

4.7 Ausblick

Mit unserem Modell ist es möglich, die Sauerstoff-Sättigung im Perfusionsmedium zu modifizieren. Somit können differierende Hypoxie-Intensitäten simuliert werden, die jeweils verschiedene Infarktgebiete darstellen können. Dadurch wird der Inhomogenität des infarzierten Myokards Rechnung getragen. So konnten wir unter anderem die sehr interessante Feststellung machen, dass kritische Sauerstoff-Konzentrationen existieren, die eine spontane Hyperkontraktur in den Kardiomyozyten auslösen und damit zum Infarktschaden beitragen. Als nächstes müssen nun die pathophysiologischen Mechanismen untersucht werden, die eine spontane Hyperkontraktur in den Myozyten herbeiführen. Die Messung des intrazellulären ATP könnte hilfreich sein. Eventuell spielt auch die Bildung von ROS im Sinne einer mitochondrialen Dysfunktion eine wichtige Rolle.

Somit liefert diese Arbeit einen weiteren, bisher wenig beachteten, Erklärungsansatz für das Scheitern großer klinischer Studien zum Ischämie-Reperfusionsschaden.

Darüber hinaus zeigt diese Arbeit, dass der Schaden bei einem NSTEMI, bedingt durch kritische Hypoxie-Zustände, beträchtlich ausfallen kann. Laut aktuellen Leitlinien kann bis zu 72 Stunden bei NSTEMI Patienten vor Durchführung einer PCI gewartet werden (Hamm et al. 2011). Beim STEMI hingegen wird die Intervention in der Regel schnellst möglich angestrebt (Steg et al. 2012). Unsere Ergebnisse zu Hypoxie und Reoxygenation implizieren nun auch eine frühere PCI bei NSTEMI Patienten, damit die beschriebenen kritischen Hypoxie-Zustände vermieden werden. Eventuell kann dadurch einer Herzinsuffizienz entgegengewirkt werden.

Unsere Arbeit verdeutlicht die Komplexität der Entstehung des Ischämie-/Reperfusionsschadens. Die Therapiemöglichkeiten kardiovaskulärer Erkrankungen, mittels PCI oder operativ, haben in den letzten Jahren stetig zugenommen. In diesem Zusammenhang stellt die adäquate Protektion vor dem Ischämie-/Reperfusionsschaden eine große Herausforderung dar.

5. Zusammenfassung

Ziel dieser Studie war es, den Effekt verschiedener Hypoxie-Intensitäten auf die Entstehung der Kontraktur, die Kalzium-Homöostase und die Entwicklung von Nekrosen während Ischämie und Reperfusion in Kardiomyozyten zu untersuchen.

Um die kardiale Ischämie zu simulieren, wurden isolierte Kardiomyozyten männlicher Wistar Ratten mit einem HEPES-Puffer (pH 6.4, keine Glukose) unterschiedlicher Sauerstoff-Sättigungen (2-3 %; 0,1-1 %) perfundiert. Um ein maximales Energiedefizit zu erzielen, fanden Experimente mit Natriumcyanid (2 mmol/l) statt. Um die Reperfusion zu simulieren, reoxygenierten wir die Zellen mit einem HEPES-Puffer (pH 7.4, Glucose). Für die Messung wurde ein Fluoreszenz-Mikroskopie-System verwendet.

Es zeigte sich, dass eine Sauerstoff-Sättigung von 0,1-1 % am ehesten mit einer metabolischen Inhibierung vergleichbar ist. In beiden Gruppen entsteht die Nekrose hauptsächlich durch die Hyperkontraktur in der Reoxygenation. Es traten dennoch signifikante Unterschiede in der Anzahl der zytosolischen Kalzium-Oszillationen auf. Besonders unter 2-3 % Sauerstoff-Sättigung zeigten sich spontane Hyperkontrakturen bereits in der Ischämie.

Darüber hinaus deutet unsere Arbeit darauf hin, dass die Rigorkontraktur, bei rechtzeitiger Reoxygenation, reversibel ist.

Die Daten dieser Arbeit zeigen, dass der myokardiale Reperfusionsschaden abhängig vom Schweregrad der vorangehenden Hypoxie ist. Je stärker die Hypoxie ausgeprägt ist, desto größer fällt der Schaden aus. Oszillationen des zytosolischen Kalziums treten sowohl nach metabolischer Inhibierung als auch nach milder Hypoxie auf. Diese können das Korrelat für das Auftreten von Arrhythmien nach einem mittels PCI behandelten STEMI/NSTEMI darstellen. Spontane Hyperkontrakturen treten bei kritischen Hypoxie-Zuständen auf.

6. Summary

The aim of this study was to examine the effect of different levels of hypoxia on cell contracture, calcium homeostasis and development of necrosis during ischaemia and reperfusion in cardiac myocytes.

To simulate myocardial ischemia, isolated cardiac myocytes from adult male Wistar rats were perfused with a HEPES buffer (pH 6.4, no glucose) and with different oxygen saturation (2-3 %; 0.1-1 %). To induce total energy deficit sodium cyanide (2 mmol/l) was added to the buffer. To simulate reperfusion cells were reoxygenated with a HEPES buffer (pH 7.4, glucose). For live cell imaging we used a fluorescence-microscopy system.

An oxygen saturation of 0.1-1 % was nearly comparable with metabolic inhibition. In both groups necrotic cell death develops during reoxygenation by hypercontracture. There were significant differences in the amount of cytosolic calcium oscillations during reoxygenation. Especially in the group of 2-3 % oxygen saturation spontaneous hypercontracture developed during simulated ischaemia.

This work also suggests that rigorcontracture is reversible.

The current work shows that injury of cardiac myocytes and necrosis depend on the severity of hypoxia. Cardiac myocytes show cytosolic calcium oscillations not only after metabolic inhibition but also after mild hypoxia. These calcium oscillations may serve as a crucial source for arrhythmogenic events during myocardial ischaemia and reperfusion. In a clinical setting this would refer to malignant arrhythmia after PCI in myocardial infarction. Spontaneous hypercontracture could occur during critical hypoxia levels.

7. Abkürzungsverzeichnis

ACS	Acute coronary syndrome
AM	Acetoxymethyl
ATP	Adenosintriphosphat
BDM	2,3-Butanedione monoxime
Ca ²⁺	Kalzium
CABG	Coronary artery bypass graft
CaCl ₂	Kalziumchlorid
CCD	Charge-coupled device
cGMP	Cyclisches Guanosinmonophosphat
CspA	Ciclosporin A
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
FCS	Fetal calf serum
g	Gramm
HEPES	Hydroxyethyl-1-piperazinen-thansulfonsäure
K ⁺	Kalium
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
l	Liter
LDH	Laktatdehydrogenase
m	Meter
MCU	Mitochondrial Calcium Uniporter
mg	Milligramm
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
MgSO ₄ 7 H ₂ O	Magnesiumsulfat-Heptahydrat
min	Minuten
Mito	Mitochondrium
ml	Milliliter
mm	Millimeter

mmol	Millimol
mPTP	Mitochondriale Permeabilitäts-Transitions-Pore
ms	Millisekunden
mV	Millivolt
N ₂	Stickstoff
Na ⁺	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
NCE	Natrium/Calcium exchanger
NaCN	Natriumcyanid
NaOH	Natriumhydroxid
nm	Nanometer
NSTEMI	Non-ST-elevation myocardial infarction
O ₂	Sauerstoff
PCI	Percutaneous coronary intervention
pO ₂	Sauerstoff-Partialdruck
r.E.	Relative Einheiten
RNS	Ribonukleinsäure
ROS	Reactive oxygen species
RyR	Ryanodin-Rezeptor
s	Sekunde
SEM	Standard error of the mean
SERCA	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
STEMI	ST-elevation myocardial infarction
UV	Ultraviolett
μl	Mikroliter
μmol	Mikromol
°C	Grad Celcius

8. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1.1	Die Veränderungen der Zellmorphologie	8
Abbildung 1.2	Die zellulären Mechanismen	9
Abbildung 2.1	Der allgemeine Versuchsaufbau	24
Abbildung 2.2	Der spezielle Versuchsaufbau	25
Tabelle 1	Messparameter	27
Abbildung 2.3a, b	Der Farbstoff Fura-2, AM	28
Abbildung 3.1	Möglichkeiten der zeitlichen Entwicklung der Hyperkontraktur	31
Tabelle 2	Die Entwicklung der Nekrose während Hypoxie und Reoxygenation	32
Abbildung 3.2	Die Zellmorphologie in der Hypoxie	33
Abbildung 3.3	Der Anteil der nekrotischen Zellen nach Hypoxie und Reoxygenation	34
Abbildung 3.4	Das zytosolische Kalzium während Hypoxie und Reoxygenation	36
Abbildung 3.5a, b	Das zytosolische Kalzium nach Hypoxie und Reoxygenation	37
Abbildung 3.6	Die Kalzium-Oszillationen während der Reoxygenation	39

Abbildung 3.7	Die Kalzium-Oszillationen in der 7. Minute der Reoxygenation	40
Abbildung 3.8	Die Amplitude der Kalzium-Oszillationen während der Reoxygenation	42
Abbildung 3.9	Die Amplitude der Kalzium-Oszillationen in der 7. Minute der Reoxygenation	43
Abbildung 4.1	Die Ausbreitung der Hyperkontraktur im Myokard	53

9. Literaturverzeichnis

1. Abdallah, Y.; Gkatzoflia, A.; Gligorievski, D.; Kasseckert, S.; Euler, G.; Schlüter, K.-D. et al. (2006): Insulin protects cardiomyocytes against reoxygenation-induced hypercontracture by a survival pathway targeting SR Ca²⁺ storage. In: *Cardiovascular research* 70 (2), S. 346–353. DOI: 10.1016/j.cardiores.2006.02.020.
2. Abdallah, Y.; Gkatzoflia, A.; Pieper, H.; Zoga, E.; Walther, S.; Kasseckert, S. et al. (2005): Mechanism of cGMP-mediated protection in a cellular model of myocardial reperfusion injury. In: *Cardiovascular research* 66 (1), S. 123–131. DOI: 10.1016/j.cardiores.2005.01.007.
3. Abdallah, Y.; Kasseckert, S. A.; Iraqi, W.; Said, M.; Shahzad, T.; Erdogan, A. et al. (2011): Interplay between Ca²⁺ cycling and mitochondrial permeability transition pores promotes reperfusion-induced injury of cardiac myocytes. In: *Journal of cellular and molecular medicine* 15 (11), S. 2478–2485. DOI: 10.1111/j.1582-4934.2010.01249.x.
4. Akar, F. G.; Aon, M. A.; Tomaselli, G. F.; O'Rourke, B. (2005): The mitochondrial origin of postischemic arrhythmias. In: *The Journal of clinical investigation* 115 (12), S. 3527–3535. DOI: 10.1172/JCI25371.
5. Albertine, K. H.; Weyrich, A. S.; Ma, X. L.; Lefer, D. J.; Becker, L. C.; Lefer, A. M. (1994): Quantification of neutrophil migration following myocardial ischemia and reperfusion in cats and dogs. In: *Journal of leukocyte biology* 55 (5), S. 557–566.
6. Allshire, A.; Piper, H. M.; Cuthbertson, K. S.; Cobbold, P. H. (1987): Cytosolic free Ca²⁺ in single rat heart cells during anoxia and reoxygenation. In: *The Biochemical journal* 244 (2), S. 381–385.
7. Allue, I.; Gandelman, O.; Dementieva, E.; Ugarova, N.; Cobbold, P. H. (1996): Evidence for rapid consumption of millimolar concentrations of cytoplasmic ATP during rigor-contracture of metabolically compromised single cardiomyocytes. In: *The Biochemical journal* 319 (Pt 2) (2), S. 463–469. DOI: 10.1042/bj3190463.

8. Amsterdam, E. A.; Wenger, N. K.; Brindis, R. G.; Casey, D. E., Jr.; Ganiats, T. G.; Holmes, D. R. [Jr.] et al. (2014): 2014 AHA/ACC guideline for the management of patients with non-ST-elevation acute coronary syndromes. A report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. In: *Circulation* 130 (25), e344-426. DOI: 10.1161/CIR.000000000000134.
9. Antonini, E.; Brunori, M.; Greenwood, C.; Malmstrom, B. G.; Rotilio, G. C. (1971): The interaction of cyanide with cytochrome oxidase. In: *European journal of biochemistry* 23 (2), S. 396–400. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1971.tb01633.x.
10. Bers, D. M. (2002): Cardiac excitation-contraction coupling. In: *Nature* 415 (6868), S. 198–205. DOI: 10.1038/415198a.
11. Bishop, S. P.; White, F. C.; Bloor, C. M. (1976): Regional myocardial blood flow during acute myocardial infarction in the conscious dog. In: *Circulation research* 38 (5), S. 429–438.
12. Braunschweig, F.; Cowie, M. R.; Auricchio, A. (2011): What are the costs of heart failure? In: *Europace : European pacing, arrhythmias, and cardiac electrophysiology : journal of the working groups on cardiac pacing, arrhythmias, and cardiac cellular electrophysiology of the European Society of Cardiology* 13 Suppl 2, ii13-7. DOI: 10.1093/europace/eur081.
13. Braunwald, E.; Kloner, R. A. (1985): Myocardial reperfusion: a double-edged sword? In: *The Journal of clinical investigation* 76 (5), S. 1713–1719. DOI: 10.1172/JCI112160.
14. Crompton, M. (1999): The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. In: *The Biochemical journal* 341 (Pt 2) (2), S. 233–249. DOI: 10.1042/0264-6021:3410233.
15. Crompton, M.; Ellinger, H.; Costi, A. (1988): Inhibition by cyclosporin A of a Ca²⁺-dependent pore in heart mitochondria activated by inorganic phosphate and oxidative stress. In: *The Biochemical journal* 255 (1), S. 357–360.

16. Crowley, L. C.; Marfell, B. J.; Scott, A. P.; Waterhouse, N. J. (2016): Quantitation of Apoptosis and Necrosis by Annexin V Binding, Propidium Iodide Uptake, and Flow Cytometry. In: *Cold Spring Harbor protocols* 2016 (11), pdb.prot087288. DOI: 10.1101/pdb.prot087288.
17. Csordás, G.; Renken, C.; Varnai, P.; Walter, L.; Weaver, D.; Buttle, K. F. et al. (2006): Structural and functional features and significance of the physical linkage between ER and mitochondria. In: *The Journal of cell biology* 174 (7), S. 915–921. DOI: 10.1083/jcb.200604016.
18. Cung, T.-T.; Morel, O.; Cayla, G.; Rioufol, G.; Garcia-Dorado, D.; Angoulvant, D. et al. (2015): Cyclosporine before PCI in Patients with Acute Myocardial Infarction. In: *The New England journal of medicine* 373 (11), S. 1021–1031. DOI: 10.1056/NEJMoa1505489.
19. Dreyer, W. J.; Smith, C. W.; Michael, L. H.; Rossen, R. D.; Hughes, B. J.; Entman, M. L.; Anderson, D. C. (1989): Canine neutrophil activation by cardiac lymph obtained during reperfusion of ischemic myocardium. In: *Circulation research* 65 (6), S. 1751–1762.
20. Duchen, M. R.; McGuinness, O.; Brown, L. A.; Crompton, M. (1993): On the involvement of a cyclosporin A sensitive mitochondrial pore in myocardial reperfusion injury. In: *Cardiovascular research* 27 (10), S. 1790–1794.
21. Dunn, R. B.; Griggs, D. M., Jr. (1975): Transmural gradients in ventricular tissue metabolites produced by stopping coronary blood flow in the dog. In: *Circulation research* 37 (4), S. 438–445.
22. Eisen, A.; Giugliano, R. P.; Braunwald, E. (2016): Updates on Acute Coronary Syndrome: A Review. In: *JAMA cardiology* 1 (6), S. 718–730. DOI: 10.1001/jamacardio.2016.2049.
23. Engler, R. L.; Schmid-Schonbein, G. W.; Pavelec, R. S. (1983): Leukocyte capillary plugging in myocardial ischemia and reperfusion in the dog. In: *The American journal of pathology* 111 (1), S. 98–111.

24. Ertl, G.; Brenner, S.; Angermann, C. E. (2017): Kardiales Remodelling nach Myokardinfarkt. Update für die klinische Praxis. In: *Herz* 42 (1), S. 107–120. DOI: 10.1007/s00059-016-4530-5.
25. Ferrari, R. (1995): Metabolic disturbances during myocardial ischemia and reperfusion. In: *The American journal of cardiology* 76 (6), 17B-24B. DOI: 10.1016/0002-9149(95)90059-4.
26. Fink, S. L.; Cookson, B. T. (2005): Apoptosis, pyroptosis, and necrosis. Mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. In: *Infection and immunity* 73 (4), S. 1907–1916. DOI: 10.1128/IAI.73.4.1907-1916.2005.
27. Freixa, X.; Bellera, N.; Ortiz-Perez, J. T.; Jimenez, M.; Pare, C.; Bosch, X. et al. (2012): Ischaemic postconditioning revisited: lack of effects on infarct size following primary percutaneous coronary intervention. In: *European heart journal* 33 (1), S. 103–112. DOI: 10.1093/eurheartj/ehr297.
28. Ganote, C. E. (1983): Contraction band necrosis and irreversible myocardial injury. In: *Journal of molecular and cellular cardiology* 15 (2), S. 67–73.
29. Garcia-Dorado, D.; Ruiz-Meana, M.; Inserte, J.; Rodriguez-Sinovas, A.; Piper, H. M. (2012): Calcium-mediated cell death during myocardial reperfusion. In: *Cardiovascular research* 94 (2), S. 168–180. DOI: 10.1093/cvr/cvs116.
30. García-Dorado, D. (2004): Myocardial reperfusion injury: a new view. In: *Cardiovascular research* 61 (3), S. 363–364. DOI: 10.1016/j.cardiores.2003.12.020.
31. Gedik, N.; Heusch, G.; Skyschally, A. (2013): Infarct size reduction by cyclosporine A at reperfusion involves inhibition of the mitochondrial permeability transition pore but does not improve mitochondrial respiration. In: *Archives of medical science : AMS* 9 (6), S. 968–975. DOI: 10.5114/aoms.2013.38175.
32. Grech, E. D.; Ramsdale, D. R. (2003): Acute coronary syndrome. Unstable angina and non-ST segment elevation myocardial infarction. In: *BMJ (Clinical research ed.)* 326 (7401), S. 1259–1261. DOI: 10.1136/bmj.326.7401.1259.

33. Griffiths, E. J.; Halestrap, A. P. (1995): Mitochondrial non-specific pores remain closed during cardiac ischaemia, but open upon reperfusion. In: *The Biochemical journal* 307 (Pt 1) (1), S. 93–98. DOI: 10.1042/bj3070093.
34. Griffiths, E. J.; Ocampo, C. J.; Savage, J. S.; Rutter, G. A.; Hansford, R. G.; Stern, M. D.; Silverman, H. S. (1998): Mitochondrial calcium transporting pathways during hypoxia and reoxygenation in single rat cardiomyocytes. In: *Cardiovascular research* 39 (2), S. 423–433. DOI: 10.1016/S0008-6363(98)00104-7.
35. Griffiths, E. J.; Ocampo, C. J.; Savage, J. S.; Stern, M. D.; Silverman, H. S. (2000): Protective effects of low and high doses of cyclosporin A against reoxygenation injury in isolated rat cardiomyocytes are associated with differential effects on mitochondrial calcium levels. In: *Cell Calcium* 27 (2), S. 87–95. DOI: 10.1054/ceca.1999.0094.
36. Grynkiewicz, G.; Poenie, M.; Tsien, R. Y. (1985): A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. In: *The Journal of biological chemistry* 260 (6), S. 3440–3450.
37. Guha, K.; McDonagh, T. (2013): Heart failure epidemiology. European perspective. In: *Current cardiology reviews* 9 (2), S. 123–127.
38. Halestrap, A. P.; Clarke, S. J.; Javadov, S. A. (2004): Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion--a target for cardioprotection. In: *Cardiovascular research* 61 (3), S. 372–385. DOI: 10.1016/S0008-6363(03)00533-9.
39. Halestrap, A. P.; Connern, C. P.; Griffiths, E. J.; Kerr, P. M. (1997): Cyclosporin A binding to mitochondrial cyclophilin inhibits the permeability transition pore and protects hearts from ischaemia/reperfusion injury. In: F. N. Gellerich und S. Zierz (Hg.): *Detection of Mitochondrial Diseases*, Bd. 174. Boston, MA: Springer US, S. 167–172.
40. Hamm, C. W.; Bassand, J.-P.; Agewall, S.; Bax, J.; Boersma, E.; Bueno, H. et al. (2011): ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation: The Task Force for the management of acute coronary syndromes (ACS) in patients presenting without persistent ST-segment elevation of the European Society of Cardiology (ESC). In: *European heart journal* 32 (23), S. 2999–3054. DOI: 10.1093/eurheartj/ehr236.

41. Hausenloy, D. J.; Candilio, L.; Evans, R.; Ariti, Cono; Jenkins, D. P.; Kolvekar, S. et al. (2015): Remote Ischemic Preconditioning and Outcomes of Cardiac Surgery. In: *The New England journal of medicine* 373 (15), S. 1408–1417. DOI: 10.1056/NEJMoa1413534.
42. Hausenloy, D. J.; Mwamure, P. K.; Venugopal, V.; Harris, J.; Barnard, M.; Grundy, E. et al. (2007): Effect of remote ischaemic preconditioning on myocardial injury in patients undergoing coronary artery bypass graft surgery: a randomised controlled trial. A randomised controlled trial. In: *Lancet (London, England)* 370 (9587), S. 575–579. DOI: 10.1016/S0140-6736(07)61296-3.
43. Hearse, D. J.; Bolli, R. (1992): Reperfusion induced injury: manifestations, mechanisms, and clinical relevance. In: *Cardiovascular research* 26 (2), S. 101–108.
44. Heyndrickx, G. R.; Millard, R. W.; McRitchie, R. J.; Maroko, P. R.; Vatner, S. F. (1975): Regional myocardial functional and electrophysiological alterations after brief coronary artery occlusion in conscious dogs. In: *The Journal of clinical investigation* 56 (4), S. 978–985. DOI: 10.1172/JCI108178.
45. Inserte, J.; Barba, I.; Hernando, V.; Abellan, A.; Ruiz-Meana, M.; Rodriguez-Sinovas, A.; Garcia-Dorado, D. (2008): Effect of acidic reperfusion on prolongation of intracellular acidosis and myocardial salvage. In: *Cardiovascular research* 77 (4), S. 782–790. DOI: 10.1093/cvr/cvm082.
46. Jhund, P. S.; Macintyre, K.; Simpson, C. R.; Lewsey, J. D.; Stewart, S.; Redpath, A. et al. (2009): Long-term trends in first hospitalization for heart failure and subsequent survival between 1986 and 2003. A population study of 5.1 million people. In: *Circulation* 119 (4), S. 515–523. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.108.812172.
47. Johnson, V. L. G. (2015): Die Rolle des mitochondrialen Benzodiazepinrezeptors beim akuten myokardialen Reperfusionsschaden. Gießen, Justus-Liebig-Universität, Diss., 2014. Gießen: Universitätsbibliothek (Edition scientifique). Online verfügbar unter <http://nbn-resolving.de/urn:nbn:de:hebis:26-opus-113701>.

48. Jugdutt, B. I. (2003): Ventricular remodeling after infarction and the extracellular collagen matrix. When is enough enough? In: *Circulation* 108 (11), S. 1395–1403. DOI: 10.1161/01.CIR.0000085658.98621.49.
49. Kaul, P.; Ezekowitz, J. A.; Armstrong, P. W.; Leung, B. K.; Savu, A.; Welsh, R. C. et al. (2013): Incidence of heart failure and mortality after acute coronary syndromes. In: *American heart journal* 165 (3), 379-85.e2. DOI: 10.1016/j.ahj.2012.12.005.
50. Kennedy, F. G.; Jones, D. P. (1986): Oxygen dependence of mitochondrial function in isolated rat cardiac myocytes. In: *The American journal of physiology* 250 (3 Pt 1), C374-83.
51. Kohlhaas, M.; Maack, C. (2013): Calcium release microdomains and mitochondria. In: *Cardiovascular research* 98 (2), S. 259–268. DOI: 10.1093/cvr/cvt032.
52. Kong, S. L.; Lee, C. Y. (1995): The use of fura 2 for measurement of free calcium concentration. In: *Biochemical Education* 23 (2), S. 97–98.
53. Ladilov, Y.; Efe, Ö.; Schäfer, C.; Rother, B.; Kasseckert, S.; Abdallah, Y. et al. (2003): Reoxygenation-induced rigor-type contracture. In: *Journal of molecular and cellular cardiology* 35 (12), S. 1481–1490. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2003.09.016.
54. Ladilov, Y. V.; Siegmund, B.; Balsler, C.; Piper, H. M. (1997): Simulated ischemia increases the susceptibility of rat cardiomyocytes to hypercontracture. In: *Circulation research* 80 (1), S. 69–75.
55. Ladilov, Y. V.; Siegmund, B.; Piper, H. M. (1995): Protection of reoxygenated cardiomyocytes against hypercontracture by inhibition of Na⁺/H⁺ exchange. In: *The American journal of physiology* 268 (4 Pt 2), H1531-9.
56. Lemasters, J. J. (1999): The mitochondrial permeability transition and the calcium, oxygen and pH paradoxes: one paradox after another. In: *Cardiovascular research* 44 (3), S. 470–473.

57. Liang, J. J.; Fender, E. A.; Cha, Y.-M.; Lennon, R. J.; Prasad, A.; Barsness, G. W. (2016): Long-Term Outcomes in Survivors of Early Ventricular Arrhythmias After Acute ST-Elevation and Non-ST-Elevation Myocardial Infarction Treated With Percutaneous Coronary Intervention. In: *The American journal of cardiology* 117 (5), S. 709–713. DOI: 10.1016/j.amjcard.2015.12.002.
58. Liu, J.; Farmer, J. D.; Lane, W. S.; Friedman, J.; Weissman, I.; Schreiber, S. L. (1991): Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. In: *Cell* 66 (4), S. 807–815.
59. Meybohm, P.; Bein, B.; Brosteanu, O.; Cremer, J.; Gruenewald, M.; Stoppe, C. et al. (2015): A Multicenter Trial of Remote Ischemic Preconditioning for Heart Surgery. In: *The New England journal of medicine* 373 (15), S. 1397–1407. DOI: 10.1056/NEJMoa1413579.
60. Micoogullari, M. (2014): Mechanismus der Proteinkinase A-vermittelten Protektion gegen den myokardialen Reperfusionsschaden in isolierten Herzmuskelzellen. Gießen, Justus-Liebig-Universität, Diss., 2014. Gießen: Universitätsbibliothek.
61. Murray, C. J.; Lopez, A. D. (1997): Alternative projections of mortality and disability by cause 1990-2020: Global Burden of Disease Study. Global Burden of Disease Study. In: *Lancet (London, England)* 349 (9064), S. 1498–1504. DOI: 10.1016/S0140-6736(96)07492-2.
62. Ni, Y. G.; Wang, N.; Cao, D. J.; Sachan, N.; Morris, D. J.; Gerard, R. D. et al. (2007): FoxO transcription factors activate Akt and attenuate insulin signaling in heart by inhibiting protein phosphatases. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (51), S. 20517–20522. DOI: 10.1073/pnas.0610290104.
63. Nichols, C. G.; Lederer, W. J. (1990): The role of ATP in energy-deprivation contractures in unloaded rat ventricular myocytes. In: *Canadian journal of physiology and pharmacology* 68 (2), S. 183–194.

64. Noll, T.; Koop, A.; Piper, H. M. (1992): Mitochondrial ATP-synthase activity in cardiomyocytes after aerobic-anaerobic metabolic transition. In: *The American journal of physiology* 262 (5 Pt 1), C1297-303.
65. Olthof, P. B.; van Golen, R. F.; Meijer, B.; van Beek, A. A.; Bennink, R. J.; Verheij, J. et al. (2017): Warm ischemia time-dependent variation in liver damage, inflammation, and function in hepatic ischemia/reperfusion injury. In: *Biochimica et biophysica acta* 1863 (2), S. 375–385. DOI: 10.1016/j.bbadis.2016.10.022.
66. Orchard, C. H.; Kentish, J. C. (1990): Effects of changes of pH on the contractile function of cardiac muscle. In: *The American journal of physiology* 258 (6 Pt 1), C967-81.
67. Philipson, K. D.; Bersohn, M. M.; Nishimoto, A. Y. (1982): Effects of pH on Na⁺-Ca²⁺ exchange in canine cardiac sarcolemmal vesicles. In: *Circulation research* 50 (2), S. 287–293.
68. Piot, C.; Croisille, P.; Staat, P.; Thibault, H.; Rioufol, G.; Mewton, N. et al. (2008): Effect of cyclosporine on reperfusion injury in acute myocardial infarction. In: *The New England journal of medicine* 359 (5), S. 473–481. DOI: 10.1056/NEJMoa071142.
69. Piper, H. M.; Abdallah, Y.; Kasseckert, S.; Schlüter, K.-D. (2008): Sarcoplasmic reticulum-mitochondrial interaction in the mechanism of acute reperfusion injury. Viewpoint. In: *Cardiovascular research* 77 (2), S. 234–236. DOI: 10.1093/cvr/cvm066.
70. Piper, H. M.; Abdallah, Y.; Schäfer, C. (2004): The first minutes of reperfusion: a window of opportunity for cardioprotection. In: *Cardiovascular research* 61 (3), S. 365–371. DOI: 10.1016/j.cardiores.2003.12.012.
71. Piper, H. M.; García-Dorado, D. (1999): Prime causes of rapid cardiomyocyte death during reperfusion. In: *Ann Thorac Surg* 68 (5), S. 1913–1919. DOI: 10.1016/S0003-4975(99)01025-5.
72. Piper, H. M.; Meuter, K.; Schäfer, C. (2003): Cellular mechanisms of ischemia-reperfusion injury. In: *The Annals of Thoracic Surgery* 75 (2), S644-8.

73. Piper, H. M.; Noll, T.; Siegmund, B. (1994): Mitochondrial function in the oxygen depleted and reoxygenated myocardial cell. In: *Cardiovascular research* 28 (1), S. 1–15. DOI: 10.1093/cvr/28.1.1.
74. Piper, H. M.; Probst, I.; Schwartz, P.; Hutter, F. J.; Spieckermann, P. G. (1982): Culturing of calcium stable adult cardiac myocytes. In: *Journal of molecular and cellular cardiology* 14 (7), S. 397–412.
75. Piper, H. M.; Siegmund, B.; Ladilov, Y. V.; Schlüter, K.-D. (1993): Calcium and sodium control in hypoxic-reoxygenated cardiomyocytes. In: *Basic Res Cardiol* 88 (5), S. 471–482. DOI: 10.1007/BF00795413.
76. Rapizzi, E.; Pinton, P.; Szabadkai, G.; Wieckowski, M. R.; Vandecasteele, G.; Baird, G. et al. (2002): Recombinant expression of the voltage-dependent anion channel enhances the transfer of Ca²⁺ microdomains to mitochondria. In: *The Journal of cell biology* 159 (4), S. 613–624. DOI: 10.1083/jcb.200205091.
77. Reimer, K. A.; Jennings, R. B.; Tatum, A. H. (1983): Pathobiology of acute myocardial ischemia. Metabolic, functional and ultrastructural studies. In: *The American journal of cardiology* 52 (2), 72A-81A.
78. Reimer, K. A.; Lowe, J. E.; Rasmussen, M. M.; Jennings, R. B. (1977): The wavefront phenomenon of ischemic cell death. 1. Myocardial infarct size vs duration of coronary occlusion in dogs. In: *Circulation* 56 (5), S. 786–794.
79. Rodrigo, G. C.; Standen, N. B. (2005): Role of mitochondrial re-energization and Ca²⁺ influx in reperfusion injury of metabolically inhibited cardiac myocytes. In: *Cardiovascular research* 67 (2), S. 291–300. DOI: 10.1016/j.cardiores.2005.03.015.
80. Romanov, A.; Martinek, M.; Purerfellner, H.; Chen, S.; Melis, M. de; Grazhdankin, I. et al. (2017): Incidence of atrial fibrillation detected by continuous rhythm monitoring after acute myocardial infarction in patients with preserved left ventricular ejection fraction: results of the ARREST study. In: *Europace : European pacing, arrhythmias, and cardiac electrophysiology : journal of the working groups on cardiac pacing, arrhythmias, and cardiac cellular electrophysiology of the European Society of Cardiology*. DOI: 10.1093/europace/euw344.

81. Ruiz-Meana, M.; Abellán, A.; Miró-Casas, E.; Agulló, E.; Garcia-Dorado, D. (2009): Role of sarcoplasmic reticulum in mitochondrial permeability transition and cardiomyocyte death during reperfusion. In: *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 297 (4), S. 9. DOI: 10.1152/ajpheart.00435.2009.
82. Ruiz-Meana, M.; Garcia-Dorado, D.; Hofstaetter, B.; Piper, H. M.; Soler Soler, J. (1999): Propagation of cardiomyocyte hypercontracture by passage of Na⁽⁺⁾ through gap junctions. In: *Circulation research* 85 (3), S. 280–287.
83. Ruiz-Meana, M.; Garcia-Dorado, D.; Miro-Casas, E.; Abellan, A.; Soler Soler, J. (2006): Mitochondrial Ca²⁺ uptake during simulated ischemia does not affect permeability transition pore opening upon simulated reperfusion. In: *Cardiovascular research* 71 (4), S. 715–724. DOI: 10.1016/j.cardiores.2006.06.019.
84. Schäfer, C.; Ladilov, Y.; Inserte, J.; Schäfer, M.; Haffner, S.; Garcia-Dorado, D.; Piper, H. M. (2001): Role of the reverse mode of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger in reoxygenation-induced cardiomyocyte injury. In: *Cardiovascular research* 51 (2), S. 241–250. DOI: 10.1016/S0008-6363(01)00282-6.
85. Schünke, M.; Schulte, E.; Schumacher, U.; Voll, M.; Wesker, K. (2009): Innere Organe. 118 Tabellen. 2., überarb. und erw. Aufl. Stuttgart: Thieme (Prometheus, LernAtlas der Anatomie / Michael Schünke; Erik Schulte; Udo Schumacher. Ill. von Markus Voll; Karl Wesker).
86. Shah, A. M.; Spurgeon, H. A.; Sollott, S. J.; Talo, A.; Lakatta, E. G. (1994): 8-bromo-cGMP reduces the myofilament response to Ca²⁺ in intact cardiac myocytes. In: *Circulation research* 74 (5), S. 970–978.
87. Shahzad, T.; Kasseckert, S. A.; Iraqi, W.; Johnson, V.; Schulz, R.; Schlüter, K.-D. et al. (2013): Mechanisms involved in postconditioning protection of cardiomyocytes against acute reperfusion injury. In: *Journal of molecular and cellular cardiology* 58, S. 209–216. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2013.01.003.
88. Siegmund, B.; Klietz, T.; Schwartz, P.; Piper, H. M. (1991): Temporary contractile blockade prevents hypercontracture in anoxic-reoxygenated cardiomyocytes. In: *The American journal of physiology* 260 (2 Pt 2), H426-35.

89. Siegmund, B.; Schlack, W.; Ladilov, Y. V.; Balsler, C.; Piper, H. M. (1997): Halothane protects cardiomyocytes against reoxygenation-induced hypercontracture. In: *Circulation* 96 (12), S. 4372–4379.
90. Siegmund, B.; Schlüter, K.-D.; Piper, H. M. (1993): Calcium and the oxygen paradox. In: *Cardiovascular research* 27 (10), S. 1778–1783.
91. Silverman, H. S.; Stern, M. D.; Lakatta, E. G. (1992): Contrasting effects of anoxia and graded hypoxia on single cardiac myocyte function. In: *The American journal of cardiovascular pathology* 4 (3), S. 256–264.
92. Smith, G. L.; Donoso, P.; Bauer, C. J.; Eisner, D. A. (1993): Relationship between intracellular pH and metabolite concentrations during metabolic inhibition in isolated ferret heart. In: *The Journal of physiology* 472, S. 11–22.
93. Solhjoo, S.; O'Rourke, B. (2015): Mitochondrial instability during regional ischemia-reperfusion underlies arrhythmias in monolayers of cardiomyocytes. In: *Journal of molecular and cellular cardiology* 78, S. 90–99. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2014.09.024.
94. Staat, P.; Rioufol, G.; Piot, C.; Cottin, Y.; Cung, T. T.; L'Huillier, I. et al. (2005): Postconditioning the human heart. In: *Circulation* 112 (14), S. 2143–2148. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.105.558122.
95. Stary, H. C.; Chandler, A. B.; Glagov, S.; Guyton, J. R.; Insull, W., Jr.; Rosenfeld, M. E. et al. (1994): A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. In: *Arteriosclerosis and thrombosis : a journal of vascular biology* 14 (5), S. 840–856.
96. Steg, P. G.; James, S. K.; Atar, D.; Badano, L. P.; Blomstrom-Lundqvist, C.; Borger, M. A. et al. (2012): ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation. In: *European heart journal* 33 (20), S. 2569–2619. DOI: 10.1093/eurheartj/ehs215.

97. Stern, M. D.; Chien, A. M.; Capogrossi, M. C.; Pelto, D. J.; Lakatta, E. G. (1985): Direct observation of the "oxygen paradox" in single rat ventricular myocytes. In: *Circulation research* 56 (6), S. 899–903.
98. Suzuki, T.; Fujikura, K.; Higashiyama, T.; Takata, K. (1997): DNA staining for fluorescence and laser confocal microscopy. In: *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 45 (1), S. 49–53. DOI: 10.1177/002215549704500107.
99. Szalai, G.; Csordás, G.; Hantash, B. M.; Thomas, A. P.; Hajnóczky, G. (2000): Calcium signal transmission between ryanodine receptors and mitochondria. In: *J. Biol. Chem.* 275 (20), S. 15305–15313. DOI: 10.1074/jbc.275.20.15305.
100. Takahashi, E.; Doi, K. (1996): Regulation of oxygen diffusion in hypoxic isolated cardiac myocytes. In: *The American journal of physiology* 271 (5 Pt 2), H1734-8.
101. Tatham, K. C.; O'Dea, K. P.; Romano, R.; Donaldson, H. E.; Wakabayashi, K.; Patel, B. V. et al. (2017): Intravascular donor monocytes play a central role in lung transplant ischaemia-reperfusion injury. In: *Thorax*. DOI: 10.1136/thoraxjnl-2016-208977.
102. Terkelsen, C. J.; Lassen, J. F.; Norgaard, B. L.; Gerdes, J. C.; Jensen, T.; Gotzsche, L. B.-H. et al. (2005): Mortality rates in patients with ST-elevation vs. non-ST-elevation acute myocardial infarction: observations from an unselected cohort. In: *European heart journal* 26 (1), S. 18–26. DOI: 10.1093/eurheartj/ehi002.
103. Thandroyen, F. T.; McCarthy, J.; Burton, K. P.; Opie, L. H. (1988): Ryanodine and caffeine prevent ventricular arrhythmias during acute myocardial ischemia and reperfusion in rat heart. In: *Circulation research* 62 (2), S. 306–314.
104. Thygesen, K.; Alpert, J. S.; White, H. D. (2007): Universal definition of myocardial infarction. In: *Journal of the American College of Cardiology* 50 (22), S. 2173–2195. DOI: 10.1016/j.jacc.2007.09.011.

105. Truesdale, G. A.; Downing, A. L. (1954): Solubility of Oxygen in Water. In: *Nature* 173 (4417), S. 1236.
106. Veksler, V. I.; Lechene, P.; Matrougui, K.; Ventura-Clapier, R. (1997): Rigor tension in single skinned rat cardiac cell. Role of myofibrillar creatine kinase. In: *Cardiovascular research* 36 (3), S. 354–362.
107. Ventura-Clapier, R.; Veksler, V. (1994): Myocardial ischemic contracture. Metabolites affect rigor tension development and stiffness. In: *Circulation research* 74 (5), S. 920–929.
108. Verma, S.; Fedak, P. W. M.; Weisel, R. D.; Butany, J.; Rao, V.; Maitland, A. et al. (2002): Fundamentals of reperfusion injury for the clinical cardiologist. In: *Circulation* 105 (20), S. 2332–2336. DOI: 10.1161/01.CIR.0000016602.96363.36.
109. Walklate, J.; Ujfalusi, Z.; Geeves, M. A. (2016): Myosin isoforms and the mechanochemical cross-bridge cycle. In: *The Journal of experimental biology* 219 (Pt 2), S. 168–174. DOI: 10.1242/jeb.124594.
110. Zarbock, A.; Kellum, J. A.; van Aken, H.; Schmidt, C.; Küllmar, M.; Rosenberger, P. et al. (2017): Long-term Effects of Remote Ischemic Preconditioning on Kidney Function in High-risk Cardiac Surgery Patients. Follow-up Results from the RenalRIP Trial. Quincy MA: National Fire Protection Assoc (126).
111. Zhao, Z.-Q.; Corvera, J. S.; Halkos, M. E.; Kerendi, F.; Wang, N.-P.; Guyton, R. A.; Vinten-Johansen, J. (2003): Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. In: *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 285 (2), H579-88. DOI: 10.1152/ajpheart.01064.2002.

10. Publikationsverzeichnis

Poster

1. J. B. Laubrock, V. Johnson, L. Rinaldi, D. Erkapic, J. Schmitt, C. W. Hamm, C. Troidl, Y. Abdallah

„Effect of different levels of hypoxia and anoxia on the intracellular Ca²⁺ concentration of cardiomyocytes in an ischaemia/reperfusion model“

(Poster, Deutsche Gesellschaft für Kardiologie, Herztage 2016, 06-08. Oktober 2016, Berlin)

2. V. Johnson, J. B. Laubrock, L. Rinaldi, J. Schmitt, D. Erkapic, C. Troidl, C. W. Hamm, Y. Abdallah

„Reoxygenation-induced sarcoplasmic calcium leakage in cardiac myocytes and its modulation by protein kinase A and Ca²⁺-calmodulin kinase II“

(Poster, Deutsche Gesellschaft für Kardiologie, Herztage 2016, 06-08. Oktober 2016, Berlin)

11. Erklärung zur Dissertation

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort, Datum

Unterschrift

12. Danksagung

Herrn Priv.-Doz. Dr. Yaser Abdallah danke ich für die Bereitstellung des Themas, des Arbeitsplatzes im Labor, die gute Betreuung und die sehr hilfreiche Kritik, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Besonderer Dank gilt Frau Dr. Victoria Johnson für die Einarbeitung im Labor, die sehr engagierte Betreuung und für wertvolle Anregungen.

Herrn Dr. Tayyab Shahzad danke ich für Einweisungen im Labor.

Darüber hinaus bedanke ich mich herzlich bei Frau Dr. Laura Rinaldi für die Hilfestellung im Labor und die gute Zusammenarbeit.

Für die ausgezeichnete technische Unterstützung möchte ich mich bei Frau Antje Weber, Frau Behnoush Parviz und Frau Daniela Schreiber bedanken.
Hier gilt mein Dank auch Herrn Priv.-Doz. Dr. Muhammad Aslam.

Des Weiteren möchte ich mich bei den Mitarbeitern des physiologischen Instituts und der Abteilung für experimentelle Kardiologie für das freundliche Arbeitsklima und die stetige Hilfsbereitschaft bedanken.

Bei den Mitarbeitern der Werkstatt des physiologischen Instituts bedanke ich mich ebenfalls für ihre Hilfe.

Für die Bereitstellung der Laborräume danke ich Herrn Prof. Dr. Rainer Schulz und Herrn Prof. Dr. Christian Hamm.

Ganz herzlich möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, die mich jederzeit unterstützt hat.

13. Lebenslauf



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6679-6



9 783835 966796