

Die cGMP-vermittelte Protektion gegen den myokardialen Reperfusionsschaden und die besondere Rolle von Urodilatin

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors der
Medizin des Fachbereiches Humanmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von
aus

Yaser Abdallah
Jabalia-Gazastreifen

Gießen 2003

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

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 2003

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 2003

© 2003 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Wetttenberg
Printed in Germany

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
édition scientifique

GLEIBERGER WEG 4, D-35435 WETTENBERG
Tel: 06406-4413 Fax: 06406-72757
Email: VVB-IPS@T-ONLINE.DE
www.vvb-ips.de

Die cGMP-vermittelte Protektion
gegen den myokardialen Reperfusionsschaden
und die besondere Rolle von Urodilatin

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

Vorgelegt von Abdallah, Yaser
aus Jabalia-Gazastreifen
Gießen (2003)

Aus dem Physiologischen Institut

Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. Dr. phil. H. M. Piper
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

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

Gutachter: PD Dr. S. Kanse

Tag der Disputation: 10.07.2003

*Meinen Eltern Fatma und Foaad,
meiner Frau Stéphanie und
meiner Tochter Jade
gewidmet*

INHALTSVERZEICHNIS

1 EINLEITUNG	1
1.1 Ionenhomöostase und Zellschädigung der Myokardzellen unter Ischämie-Reperfusion-Bedingungen	1
1.2 cGMP-abhängige Protektion gegen den myokardialen Reperfusionsschaden	4
1.3 Ziel der Arbeit	5
2 MATERIAL	6
2.1 Chemikalien	6
2.2 Häufig verwendete Puffer und Medien	7
2.2.1 Zellkulturmedien	7
2.2.2 Perfusionsmedien	8
2.3 Geräte und Laborbedarf	9
3 METHODEN	11
3.1 Isolierung von Herzmuskelzellen	11
3.1.1 Versuchstiere	11
3.1.2 Präparation von Herzmuskelzellen adulter Ratten	11
3.2 Zellkultur	12
3.3 Fluoreszenzmikroskopische Messungen zur Ermittlung der intrazellulären Ionenkonzentration von Ca^{2+} , H^+ und Mg^{2+}	13
3.3.1 Apparative Voraussetzungen	13
3.3.2 Ermittlung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration mittels des Fluoreszenzfarbstoffes Fura-2-AM	14
3.3.3 Ermittlung des intrazellulären pH-Wertes mittels des Fluoreszenzfarbstoffes BCECF	15
3.3.4 Ermittlung der intrazellulären Mg^{2+} -Konzentration mittels des Fluoreszenzfarbstoffes Mg-Fura-2-AM	16
3.3.5 Kompartimentierung der Fluorochrome	16
3.4 Anoxie-Reoxygenationsexperimente	17
3.4.1 Apparative Voraussetzungen	17

3.4.2 Experimentelles Protokoll	17
3.4.2.1 Die Mangan-Quench-Experimente	18
3.4.2.2 Natrium–Entzugsexperimente unter normoxische Bedingungen	18
3.4.2.3 Untersuchungen des Einflusses von 8-Br-cGMP auf die Hyperkontraktur neigung der Kardiomyozyten	19
3.4.2.4 Bestimmung des cGMP-Spiegels	19
3.5 Messparameter	20
3.6 Statistik	21
4 ERGEBNISSE	22
4.1 Veränderung der Kationenhomöostase und der Zelllänge unter simulierter Ischämie (Anoxie) und Reperfusion (Reoxygenation) im Modell adulter Kardiomyocyten	22
4.1.1 ATP-Abbau und Entwicklung der Rigorkontraktur während Anoxie	22
4.1.2 Änderung des zytosolischen pH-Wertes	23
4.1.3 Veränderung des zytosolischen Calcium und der Zelllänge während Anoxie und Reoxygenation	24
4.2 Einfluss von 8-Bromo-cGMP auf die reoxygenationsinduzierte Hyperkontraktur, die zytosolische Calciumhomöostase und den pH_i -Wert	26
4.2.1 Beeinflussung der reoxygenationsinduzierten Hyperkontraktur	26
4.2.2 Einfluss von 8-Bromo-cGMP auf die zytosolische Calciumhomöostase und den pH_i -Wert	27
4.2.2.1 Beeinflussung der Oszillationsfrequenz	27
4.2.2.2 Einfluss von 8-BromocGMP auf den Verlauf des zytosolischen Calciums	28
4.2.2.3 Beeinflussung des Calcium-Influx	29
4.2.2.4 Einfluss von 8-Br-cGMP auf den „reverse mode“ und den „forward mode“ des Natrium-Calcium-Austauschers	30
4.2.3 Einfluss von 8-Br-cGMP auf die zytosolische pH_i -Erholung	31
4.2.4 Einfluss von 8-Br-cGMP auf die Hyperkontraktur neigung reoxygenierter Kardiomyozyten	32
4.3 Vergleichender Einfluss von zellpermeablen cGMP-Analoga und Urodilatin auf die Entwicklung der Hyperkontraktur, die Calciumhomöostase und den zytosolischen pH-Wert	33

4.3.1 Einfluss von Urodilatin (1µM) auf den zytosolischen cGMP-Spiegel	33
4.3.2 Beeinflussung der Hyperkontraktur mit 8-Br-cGMP, 8-pCPT-cGMP und Urodilatin	34
4.3.3 Beeinflussung der zytosolischen Calciumoszillationen mit 8-Br-cGMP, 8-pCPT-cGMP und Urodilatin	35
4.3.4 Beeinflussung der Geschwindigkeit der zytosolischen Calciumerholung mit 8-Br-cGMP, 8-pCPT-cGMP und Urodilatin	36
4.3.5 Einfluss von 8-Br-cGMP, 8-pCPT-cGMP und Urodilatin auf den zytosolischen pH-Wert während der Reoxygenation	37
5 DISKUSSION	38
5.1 Mechanismus der cGMP-abhängigen Protektion gegen den myokardialen Reperfusionsschaden	38
6 ZUSAMMENFASSUNG	42
7 SUMMARY	43
8 LITERATUR	44
9 ERKLÄRUNG	50
10 DANKSAGUNG	51
11 LEBENS LAUF	52

1 EINLEITUNG

1.1 Ionenhomöostase und Zellschädigung der Myokardzellen unter Ischämie-Reperfusion-Bedingungen

Eine deutliche Einschränkung oder völlige Unterbrechung der koronaren Durchblutung führt dazu, dass der myokardiale Energiebedarf nicht mehr durch oxidative Energieproduktion gedeckt werden kann. Das Missverhältnis von Sauerstoffangebot und Sauerstoffbedarf bezeichnet man als Ischämie. Die biochemischen und funktionellen zellulären Veränderungen sind in der Regel nicht stabil, sondern entwickeln sich progredient in Richtung einer immer geringeren Erholungsfähigkeit und zunehmender struktureller Schädigung. Wenn nun aufgrund eines O_2 -Mangels die mitochondriale Atmung ausfällt, wird der Energiebedarf zunächst anaerob gedeckt. Dies führt zur Aktivierung des glykolytischen Abbaus von Glukose. Die Nettohydrolyse von ATP (Dennis et al., 1991) und die Bildung von Milchsäure führen zur Ansäuerung des ischämischen Myokards (Schäfer et al., 1995; Owens et al., 1996). Aufgrund fortschreitender Azidifizierung und gestörter O_2 -Versorgung wird schließlich auch der anaerobe Weg der ATP-Produktion gehemmt. Es entsteht ein manifestes Energiedefizit.

Dieses Energiedefizit führt zur Verlangsamung bzw. zum Stillstand wichtiger metabolischer Funktionen. Die Aktivität der Na^+/K^+ -ATPase wird eingeschränkt und das über die sarkolemmalen Mechanismen (Na^+/H^+ - Austauscher, Na^+/HCO_3^- -Austauscher, Na^+/Ca^{2+} -Austauscher, Na^+ -Kanäle) einströmende Na^+ kann nicht mehr entfernt werden (Clarke et al., 1993). Na^+ akkumuliert im Zytosol (Pike et al., 1993; Ladilov et al., 1995; Anderson et al. 1990), und der transsarkolemmale Na^+ -Gradient wird dadurch reduziert. Verursacht durch die Reduktion des Na^+ -Gradienten und durch ischämisch bedingte Depolarisierung (Cordeiro et al., 1994) der Zellen kommt es über den „reverse mode“ des Na^+ - Ca^{2+} -Austauschers zu einer Ca^{2+} -Überladung des Zytosols (Steenbergen et al., 1990; Haigney et al., 1992; Ladilov et al., 1999). Die zytosolische Ca^{2+} -Überladung während der Ischämie ist pathophysiologisch von Bedeutung, da dadurch strukturschädigende Mechanismen aktiviert werden, die eine dauerhafte Funktionseinschränkung zur Folge haben.

Die einsetzende Reperfusion, also die Wiederversorgung mit O₂ und Substraten führt zur Reenergetisierung des zuvor ischämischen Myokards. Die Reenergetisierung der Zellen bei erhöhtem zytosolischen Ca²⁺ und ansteigendem intrazellulären pH-Wert führt über Bindung des Ca²⁺ an Troponin C (Fabiato & Fabiato, 1978; Orchard & Kentish, 1990) zu einer anhaltenden und überschießenden Aktivierung der Kraftentwicklung an den Myofibrillen. Dies führten am Model der isolierten Kardiomyozyten zur mechanischen Schädigung und irreversiblen Zellverkürzung (Siegmund et al., 1990; 1992; Ladilov et al., 1995; 1997; 1998). Dieser Vorgang wird als Hyperkontraktur bezeichnet und verläuft in der Regel irreversibel. Die Entwicklung der Hyperkontraktur ist charakteristisch für den Reperfusionsschaden - ein Schaden, der erst durch eine Ursachenkonstellation in der Reperfusionsphase entsteht und in der Reperfusion grundsätzlich noch verhindert werden kann (Siegmund et al., 1991). Im Gewebe führt die Hyperkontraktur einander benachbarter Zellen zu Rupturen von Zellmembranen und damit unmittelbar zur Nekrose (Barrabes et al., 1996; Ganote et al., 1983)). Die Nekrose von Myokardgewebe führt im ischämisch-reperfundierten Herzen zu einer Verminderung möglicher Erholung der Pumpfunktion.

In der vorliegenden Arbeit wurde am Einzelzellmodell adulter ventrikulärer Rattenkardiomyozyten die in vivo-Situation von Ischämie und Reperfusion simuliert und die Ursachen für den entstehenden Reperfusionsschaden analysiert.

Für die Analyse von Ionenhomeostase und Zellschädigung ist der Gebrauch dieses Modells von Vorteil, da es erlaubt Veränderungen im Stoffwechsel und der zytosolischen Ionenkonzentration in der frühen Reoxygenationsphase direkt auf zelluläre Ebene zu analysieren und mit der Entwicklung der reoxygenationsinduzierten Hyperkontraktur in kausalen Zusammenhang zu zusetzen. Das Elementargeschehen in der Reperfusion kann in diesem Modell auch deshalb besonders gut untersucht werden, da die Kardiomyozyten während der Hyperkontraktur keinen Zugkräften von benachbarten Zellen ausgesetzt sind und damit ihre sarkolemmale Integrität während dieses Vorgangs erhalten bleibt (Siegmund et al., 1992).

Um eine *in vivo*-Situation von Ischämie und Reperfusion zu simulieren, wurden die Kardiomyozyten mit saurem Perfusionsmedium ($\text{pH}_a = 6,4$) anoxisch inkubiert (simulierte Ischämie) und anschließend mit einem Perfusionsmedium, dessen pH-Wert auf 7,4 eingestellt war, reoxygeniert (simulierte Reperfusion). Aus früheren Studien sind für dieses experimentelle Modell bereits folgende Tatsachen bekannt:

1. Der zytosolische pH-Wert in den Kardiomyozyten sinkt bei Inkubation in saurem Medium während der simulierten Ischämie auf einen endanoxischen Wert von 6,4 ab, und sie entwickeln eine ausgeprägte zytosolische Na^+ - und Ca^{2+} -Überladung. Nach ca. 20-minütiger anoxischer Inkubation verkürzen sich die Kardiomyozyten auf 70% ihrer Ausgangslänge (Rigor) und verharren in diesem Zustand bis zum Beginn der Reoxygenation.

2. Während der Reoxygenation werden, einhergehend mit der Reenergetisierung der Zellen und dem Wiederaufbau des Na^+ -Gradienten über das Sarkolemm, die normoxischen H^+ -, Na^+ - und Ca^{2+} -Konzentrationen wiederhergestellt. Die Erholung der Kardiomyozyten von der zytosolischen Ca^{2+} -Überladung kann in drei Phasen untergliedert werden: 1. Eine Phase der schnellen Abnahme der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration, bedingt durch Sequestrierung von Ca^{2+} in das sarkoplasmatische Retikulum (Phase 1). 2. Eine Phase von Ca^{2+} -Oszillationen, die auf einer Verschiebung des Ca^{2+} vom Zytosol in das sarkoplasmatische Retikulum und die Freisetzung von Ca^{2+} aus dem sarkoplasmatischen Retikulum in das Zytosol zurückzuführen sind (Phase 2). 3. Wiederherstellung der normoxischen Ca^{2+} -Konzentration im Zytosol (Phase 3), aufgrund der Entfernung des zytosolischen Ca^{2+} über den „forward mode“ (FM) des Natrium-Calcium-Austauschers (Siegmond et al., 1992, 1994).

Das Auftreten der Ca^{2+} -Oszillationen in Phase 2 führt zur temporären Erhöhung der zytosolischen Calciumkonzentration. Zusammen mit der Restitution von ATP und intrazellulärem pH-Wert lösen die Ca^{2+} -Oszillationen die reoxygenationsinduzierte Hyperkontraktion aus (Verkürzung der Zellen auf 30-40% ihrer Ausgangslänge), die zu massiver Schädigung der Kardiomyozyten führt (Ladilov et al., 1995).

1.2 cGMP-abhängige Protektion gegen den myokardialen Reperfusionsschaden

Es gibt eine Reihe von Studien am reperfundierten Herzen bzw. an reoxygenierten Kardiomyozyten, die zu verschiedenen Ansätzen für protektive Maßnahmen während der Reperfusion geführt haben. Es konnte beispielsweise bereits gezeigt werden, dass eine Erhöhung des myokardialen bzw. zytosolischen cGMP-Spiegels (Schlüter et al., 1994; Schlack et al., 1994; Hempel et al., 1997; Amrani et al. 1997; Agullò et al., 1999; Inserte et al., 2000; Ferran et al., 2000) gegen den myokardialen Reperfusionsschaden bzw. die reoxygenationsinduzierte Hyperkontraktur schützen kann. Eine Erhöhung des cGMP-Spiegels im Myokard kann sowohl durch Aktivierung der partikulären Guanylylzyklase mit Rezeptoragonisten wie ANP und Urodilatin oder durch Aktivierung der löslichen Guanylylzyklase mit NO-Donatoren oder Substraten der NO-Synthase (L-Arginin) erzielt werden (Saxenhofer et al., 1993; Foster et al., 1999). Von besonderem Interesse in diesem Zusammenhang ist die Erhöhung des cGMP-Spiegels im Myokard durch Aktivierung der partikulären Guanylylzyklase mit dem ANP-Rezeptor-Agonisten Urodilatin. Ferran et al. (2000) zeigten, dass die intravenöse Gabe von Urodilatin in einer sehr niedrigen Konzentration (50 nM) zu Beginn der Reperfusion zu einer signifikanten Reduktion der Infarktgröße am Schweine-Modell führt.

Urodilatin ist in Struktur und Wirkungsprofil dem im Herzen gebildeten ANP (Cardiodilatin) sehr ähnlich. Urodilatin wurde nach seinem physiologischen Bildungsort in den distalen Tubuli der Nieren und seiner relaxierenden Wirkung auf glatte Gefäßmuskelstreifen (dilatieren) benannt. Während ANP im Blutplasma zirkuliert, aber nicht renal ausgeschieden wird, ist Urodilatin physiologischerweise nur im Urin zu finden (Schulz-Knappe et al., 1988). Synthetisches Urodilatin lässt sich pharmakologisch applizieren. Im Gegensatz zu ANP oder NO-Donatoren werden bei Gabe von Urodilatin keine negativen hämodynamischen Nebenwirkungen beobachtet, demnach scheint Urodilatin besonders viel versprechend, um als therapeutische Maßnahme im akuten Ischämie-Reperfusion-Geschehen eingesetzt zu werden. Der eigentliche Mechanismus der cGMP-vermittelten Protektion gegen den myokardialen Reperfusionsschaden ist noch ungeklärt.

1.3 Ziel der Arbeit

Das Ziel dieser Studie ist zu untersuchen, auf welchen Mechanismus die cGMP-vermittelte Protektion gegen den myokardialen Reperfusionsschaden zurückzuführen ist. Hierbei soll die besondere Rolle von Urodilatin, als pharmakologisch applizierbare Substanz, untersucht werden.

Am Modell isolierter Kardiomyozyten wurde analysiert, ob Maßnahmen zu einer Erhöhung des zytosolischen cGMP-Spiegels während der Frühphase der Reoxygenation Einfluss haben auf

- i) die Entwicklung von Hyperkontraktur,
- ii) die zytosolische Calcium-Homöostase,
- iii) den zytosolischen pH-Wert, oder auf die
- iv) Ca^{2+} - Sensitivität des kontraktilen Apparates.

Membranpermeable c-GMP-Analoga und Urodilatin wurden verglichen.

2 MATERIAL

2.1 Chemikalien

Albumin (aus Rinderserum)	Roche Applied Science, Mannheim
2', 7'-bis-(2-carboxyethyl)-5-(and-6)- carboxyfluorescein, acetoxymethylester (BCECF, AM)	Molecular Probes, Leiden, Niederlande
Kollagenase; Typ CLS II, (322U/mg)	Biochrom KG, Berlin
Cystein	Sigma, Taufkirchen
EGTA	Sigma, Taufkirchen
Fura-2-AM	Molecular Probes, Leiden NL
Mg-Fura-AM	
Molecular Probes,	Leiden NL
HEPES	Roche Applied Science, Mannheim
Medium 199	Biochrom, Berlin
N ₂	Messer Griesheim, Krefeld
N-Methylglucamin	Sigma, Taufkirchen
Nigericin	Sigma, Taufkirchen
Resazurin	Sigma, Taufkirchen
Ryanodin	Calbiochem, Bad Soden
Thapsigargin	Calbiochem, Bad Soden
8-Bromo- guanosine 3': 5'- cyclic monophosphate (8-Br-cGMP)	Sigma, Taufkirchen
HOE 694	Hoechst AG, (Frankfurt am Main)
Ouabain	Sigma, Taufkirchen
Urodilatin	IPF-Parmaceutical-Hannover
8-(4-Chlorophenylthio) guanosine	Sigma, Taufkirchen

3': 5'-cyclic monophosphate (8-pCPT-cGMP)

Die übrigen verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Calbiochem, Sigma, Roche Applied Science, Invitrogen (Eggenstein), und VWR (Darmstadt) in der höchsten erhältlichen Qualität bezogen.

Alle verwendeten Chemikalien wurden nach Herstellerangaben gelöst und aufbewahrt.

2.2 Häufig verwendete Medien und Puffer

2.2.1 Zellkulturmedien

CCT / HEPES-Stammlösung:

Medium 199 / HEPES-Stammlösung	9,8 g/l
HEPES	36 g/l
Kreatin	5 mM
Karnitin	2 mM
Taurin	5 mM
auf pH-Wert 7,4 titriert	

Zusätze zu CCT / HEPES-Stammlösung:

FCS	4 % (vol/vol)
Penicillin	100 IU/ml
Streptomycin	100 µg/ml

Alle Medien wurden sterilisiert und bei 4°C aufbewahrt.

2.2.2 Perfusionsmedien

Für unsere Untersuchungen wurden verschiedene Perfusionsmedien benutzt, deren Zusammensetzung im folgenden beschrieben wird.

Normoxische HEPES-gepufferte Tyrode-Lösung:

Zusammensetzung (in mM): NaCl (125,0); KCl (2,6), KH₂PO₄ (1,2), MgSO₄ (1,2), CaCl₂ (1,0), HEPES (25,0); Glukose (2,5);
pH-Wert 7,4 bei 37 °C, titriert mit 1 N NaOH.

Anoxische HEPES-gepufferte Tyrode-Lösung:

Zusammensetzung (in mM): NaCl (125,0), KCl (2,6), KH₂PO₄ (1,2), MgSO₄ (1,2), CaCl₂ (1,0), HEPES (25,0); pH-Wert 6,4 bei 37 °C, titriert mit 1 N NaOH.

Das Medium wurde nach der von Allshire et al. (1987) beschriebenen Methode autoklaviert. Vor dem Autoklavieren wurde der Redoxindikator (Resazurin) (1 % vol/vol) und Cystein (5,0 mM) zugesetzt und so lange mit N₂ begast, bis ein Farbumschlag von lila nach rosa sichtbar wurde. Anschließend wurde die Tyrode-Lösung mittels dampfdrucktauglicher Gefäße für 40 min bei 2 bar und 120 °C autoklaviert.

Variante: Ca²⁺-freie Tyrode-Lösung:

Zusammensetzung (in mM): CaCl₂ (0,0), EGTA (0,5); pH-Wert 7,4
bei 37 °C, titriert mit 1 N NaOH.

Na⁺-freie HEPES-gepufferte Tyrode Lösung:

Zusammensetzung (in mM): N-Methylglucamin (140,0), KCl (2,6), KH₂PO₄ (1,2), MgSO₄ (1,2), CaCl₂ (1,0), Glukose (5,0), HEPES (25,0); pH-Wert 7,4 bei 37 C°, titriert mit 1 M HCl.

2.3 Geräte und Laborbedarf

Zellkultur:

Präparationsbesteck	Eickenmeyer, Tuttlingen
Langendorff-Apparatur	Eigenbau
Gewebehacker	Harvard Apparatus über Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten
Nylonnetz	NeoLab, Heidelberg
Sterilbank	Kendro, Hanau
Brutschrank	Kendro, Hanau
Mikroskop	TMS-F, Nikon, Japan
Deckgläser	Menzel, Braunschweig

Fluoreszenz Messung:

Inverses Mikroskop	Diaphot TMD, Nikon, Düßeldorf
AR-Cation Measurement System	Spex Industries, Grasbrun
Photomultiplier	Spex Industries, Grasbrun
IBM PC / AT-based data Analyse System	Spex Industries, Grasbrun
Modell DM3000CM	

Zell-Längen- Messung:

Videokamera	Sony, Frankfurt
Videoprinter	Sony, Frankfurt

Anoxie-Reoxygenationsexperimente:

Edelstahlkapillaren	Alltech, Unterhaching
Perfusionskammer	Eigenbau
Peristaltikpumpe	Gilson-Abimed, Langenfeld

Dampfdruckkochtopf
Druckstabile Glasgefäße mit
verschließbarem Deckel
Gasdichte Schläuche
Gasventile

All American, Canada
Bormioli Rocco, Italien

Kalensee, Gießen
Kalensee, Gießen

Sonstige Geräte:

Inkubator
Glasgeräte
Heizrührer
pH-Meter
Pipetten
Wasserbad
Zentrifugen
Wasserdemineralisierungsanlage
Perfusionsheizung

Kendro, Hanau
Schott, Mainz
Jahnke & Kunkel, Staufen
WTW, Weinheim
Eppendorf-Nethler-Hinz, Hamburg
Julabo, Seelbach
Heraeus, Hanau
Millipore, Eschborn
Eigenbau

Verbrauchsmaterialien:

Kulturschalen, Typ Falcon 3001
Pipettenspitzen

Becton Dickinson, Heidelberg
Eppendorf-Nethler-Hinz,
Hamburg

3 METHODEN

3.1 Isolierung von Herzmuskelzellen

3.1.1 Versuchstiere

Als Modell wurden ventrikuläre Herzmuskelzellen der adulten Ratte verwendet. Für die Experimente wurden die Zellen von männlichen 200 - 300 g schweren Wistar Ratten verwendet. Sie wurden im Tierstall des Physiologischen Institutes der Justus-Liebig Universität gezüchtet und hatten freien Zugang zu Nahrung (Standardfutter Altromin) und Wasser.

3.1.2 Präparation von Herzmuskelzellen adulter Ratten

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

Folgende Lösungen wurden verwendet :

Ca²⁺-Stammlösung: CaCl₂ (100,0 mM).

Powell - Medium: NaCl (110,0 mM), NaHCO₃ (25,0 mM), KCl (2,6 mM), KH₂PO₄ (1,2 mM), MgSO₄ (1,2 mM), Glukose (11,0 mM).

Kollagenasepuffer: Powell-Medium (50 ml), Kollagenase (20 mg), Ca²⁺-Stammlösung (12,5 µl).

Die Tiere wurden mit Ether narkotisiert und durch Genickbruch getötet. Dann wurde der Brustraum geöffnet, das Perikard entfernt, Herz und Lunge angehoben, mit einem Scherenschnitt vom Körper getrennt und sofort in eiskalte isotonische NaCl-Lösung gelegt. In dieser Lösung wurde das Herz von Geweberesten freipräpariert und anschließend mit der Aorta in eine Langendorff-Apparatur eingebunden. Zunächst wurde das Herz für ca. 2 min mit Powell - Medium (20 ml) perfundiert, um das verbliebene Blut aus den Koronarien zu entfernen. Anschließend erfolgte eine rezirkulierende Perfusion (2 - 3 ml/min) mit dem Kollagenasepuffer. Nach Beendigung der Rezirkulationsphase wurde das Herz unterhalb der Vorhöfe von der Langendorff-Apparatur abgeschitten und zunächst mechanisch mit einem

Gewebehacker, anschließend mit zwei Skalpellens manuell, zerkleinert. Danach schloss sich eine zehnmütige Inkubation des Gewebes in Rezirkulationspuffer (37°C) an. In dieser Lösung wurde die Vereinzelung der Herzmuskelzellen durch vorsichtiges Auf- und Absaugen mit einer 5 ml Pipette unterstützt. Als nächster Schritt folgte die Filtration der Zellsuspension durch ein Nylonnetz (0,2 mm Porengröße), um die verbliebenen Zellaggregate abzutrennen. Das Filtrat wurde bei 25 x g für 3 min zentrifugiert und das Pellet mit Powell-Medium, welches 200 µM CaCl₂ enthielt, aufgenommen. Nach erneuter Zentrifugation (25 x g für 2 min) erfolgte die Resuspension der Kardiomyozyten mit Powell-Medium, das 400 µM CaCl₂ enthielt. Die Suspension wurde entsprechend der Anzahl der präparierten Herzen auf Reagenzgläser, die zuvor mit einer ca. 10 ml hohen Flüssigkeitssäule aus Powell – Medium gefüllt wurden verteilt. Nach erneuter Zentrifugation (25 x g für 1 min) erhielt man eine Zellpopulation, die zu 70 - 80 % aus stäbchenförmigen Kardiomyozyten bestand.

3.2 Zellkultur

Um die Anheftung der Kardiomyozyten zu gewährleisten, wurden die Kulturschalen, die ein Glasdeckgläschen enthielten, über Nacht mit Vorplattierungsmedium (vgl. Kapitel 2.2.1) beschickt. Dieses Medium wurde unmittelbar vor dem Ausplattieren von den Schalen abgesaugt. Das nach dem letzten Präparationsschritt gewonnene Pellet wurde vorsichtig mit Ausplattierungsmedium (25 ml pro Herz) (vgl. Kapitel 2.2) aufgenommen und gleichmäßig auf die vorplattierten Schalen verteilt. Nach einer vierstündigen Anheftungsphase (37°C) wurden die Zellen mit Ausplattierungsmedium gewaschen, wobei abgerundete Zellen entfernt wurden, so dass die verbliebene Kultur zu etwa 90 % stäbchenförmige Kardiomyozyten enthielt.

3.3 Fluoreszenzmikroskopische Messungen zur Ermittlung der intrazellulären Ionenkonzentration von Ca^{2+} , H^+ und Mg^{2+}

3.3.1 Apparative Voraussetzungen

Die Messungen wurden mit Hilfe eines inversen Mikroskopes durchgeführt, welches an das AR-Cation Measurement System von Spex (Grasbrunn) gekoppelt war. Mit Hilfe von Monochromatoren konnte das Anregungslicht, das von einer UV-Lampe entsendet wurde, entsprechend dem Anregungsspektrum des verwendeten Fluoreszenzfarbstoffes eingestellt werden. Die selektierten Wellenlängen trafen dann über Dichroid-Spiegel im Strahlengang auf das Objekt und führten zur Anregung des Farbstoffes. Das emittierte Licht gelangte über den Dichroid-Spiegel zu dem Photomultiplier des Spex-Systems. Das eintreffende Signal wurde digitalisiert, aufgezeichnet und mit dem dazugehörigen Software-Programm ausgewertet.

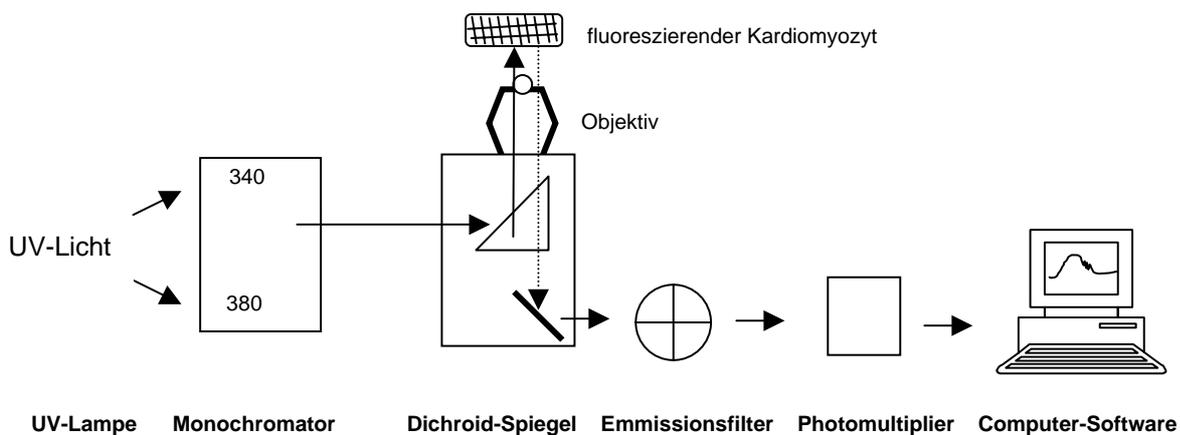


Abb. 3.3.1 Vereinfachte schematische Darstellung der Apparatur. Der Strahlengang des Anregungslichtes ist als durchgezogener Pfeil dargestellt, der Strahlengang des Fluoreszenzlichtes als gestrichelter Pfeil.

3.3.2 Ermittlung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration mittels des Fluoreszenzfarbstoffes Fura-2-AM und Kalibrierung des Fluoreszenzsignals

Um die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration zu bestimmen, wurden die Zellen für 30 min bei 37°C mit Fura-2-AM ($2,5 \mu\text{M}$) in Medium 199 beladen. Fura-2 gelangt als Acetoxymethylester in die Zellen, wird dort von intrazellulären Esterasen gespalten und kann als geladenes Molekül nicht mehr durch die Membran permeieren. Nach 30-minütiger Beladungszeit wurde das Medium gewechselt und es erfolgte eine 15-minütige Nachinkubation.

Die Anregung von Fura-2 erfolgte mit den Wellenlängen 340 und 380 nm, das Emissionsmaximum lag bei 510 nm. Die Daten der Fura-2-Messung werden als Ratio (340 nm / 380 nm) wiedergegeben. Die Kalibrierung wurde nach dem von Li et al. (1987) beschriebenen Protokoll modifiziert durchgeführt.

Es wurde folgende Lösung benutzt:

Kalibrierungslösung: NaCl (10 mM), KCl (125 mM), MgSO_4 (1 mM), HEPES (25 mM), Zusatz von: CaCl_2 (3 mM) oder EGTA (5 mM); Ionomycin ($5 \mu\text{M}$), Nigericin (10 mg/l), pH 7,4 bei 37°C , titriert mit 1 N KOH.

Zur Bestimmung des R_{max} -Wertes (maximales Ratio) wurde dem Perfusat 3 mM CaCl_2 , zur Bestimmung des R_{min} -Wertes (minimales Ratio) 5 mM EGTA zugesetzt. Die freie zytosolische Ca^{2+} -Konzentration wurde nach folgender Formel (Grynkiewicz et al., 1985) ermittelt: $[\text{Ca}^{2+}]_i = K_d \times b \times (R - R_{\text{min}}) / (R_{\text{max}} - R)$.

$[\text{Ca}^{2+}]_i$: Zytosolische Calciumkonzentration

R : Fura-2-Ratio (340 nm / 380 nm)

R_{max} : Maximales Ratio

R_{min} : Minimales Ratio

b: Quotient aus der Emissionsintensität der 380 nm Wellenlänge des R_{min} -Wertes und der Emissionsintensität der 380 nm Wellenlänge des R_{max} -Wertes.

K_d -Wert: Maß für die Affinität von Fura-2 zu freien zytosolischen Ca^{2+} -Ionen. Dieser Wert ist abhängig vom pH-Wert.

In vitro bestimmten Grynkiewicz et al. (1985) einen K_d -Wert für Fura-2 von 224 nmol/l.

In isolierten Kardiomyozyten konnten pH-abhängig folgende Werte ermittelt werden:

pH-Wert	7,15	6,5
K_d-Wert	312 ± 9 nmol/L	337 ± 4 nmol/L

(Nach Ladilov et al., 1997)

3.3.3 Ermittlung des intrazellulären pH-Wertes mittels des Fluoreszenzfarbstoffes BCECF-AM

Zur Ermittlung des intrazellulären pH-Wertes wurden die Kardiomyozyten für 15 min bei 37°C mit dem Fluoreszenzindikator BCECF (1,25 µM) inkubiert. BCECF gelangt als Acetoxymethylester in die Zellen und wird dort, aufgrund von Esterspaltung durch intrazelluläre Esterasen, in die geladene impermeable Form überführt. Nach der Beladung wurden die Zellen gewaschen und für 30 min nachinkubiert. Der Farbstoff BCECF wird mit den Wellängen 440 nm und 490 nm angeregt; das Emissionsmaximum liegt zwischen 520 und 560 nm. Änderungen des pH-Wertes wurden als Änderungen des BCECF-Ratios (490 nm / 440 nm) oder auch als kalibrierte Werte wiedergegeben. Die Kalibrierung wurde nach der von Koop et al. (1992) beschriebenen Methode durchgeführt. Die Kalibrierungslösung setzt sich wie folgt zusammen:

Kalibrierungslösung: NaCl (11,0 mM), KCl (124,0 mM), MgCl₂ (1,0 mM), TES (30,0 mM) bzw. MES (30,0 mM) bzw. HEPES (30,0 mM), Nigericin (10 µg/ml).

Die unterschiedlichen Puffersubstanzen wurden je nach einzustellendem pH-Wert ausgewählt (TES: pH 6,8 – pH 8,2; MES: pH 5,5 – pH 6,7; HEPES: pH 6,8 – pH 8,2). Der pH-Wert der Lösung wurde mit KOH bei 37°C eingestellt. Um den intrazellulären pH-Wert dem extrazellulären anzugleichen, wurde das Protonophor Nigericin (10 µg/ml) verwendet.

3.3.4 Ermittlung der intrazellulären Mg^{2+} -Konzentration mittels des Fluoreszenzfarbstoffes Mg-Fura-2-AM

Um Änderungen der intrazellulären ATP-Konzentration während Anoxie und Reoxygenation zu verfolgen, wurde die Mg^{2+} -Konzentration mittels des Fluoreszenzfarbstoffes Mg-Fura-2-AM ermittelt. Da bei der Hydrolyse von ATP Mg^{2+} freigesetzt wird, spiegelt ein Anstieg der Mg^{2+} -Konzentration einen Abfall der ATP-Konzentration wieder (Leysens et al., 1996). Die Kardiomyozyten wurden für 30 min bei 37°C mit Mg-Fura-2-AM (2,5 μ M) in Medium 199 beladen. Mg^{2+} -Fura-2 gelangt als Acetoxymethylester in die Zellen, wird dort von intrazellulären Esterasen gespalten und kann als geladenes Molekül nicht mehr durch die Membran permeieren. Die Anregung von Mg^{2+} -Fura-2 erfolgt mit den Wellenlängen 340 und 380 nm, das Emissionsmaximum liegt bei 510 nm. Die Daten der Mg^{2+} -Fura-2-Messung werden als Ratio (340 nm / 380 nm) wiedergegeben.

3.3.5 Kompartimentierung der Fluorochrome

Um das Ausmaß der intrazellulären Kompartimentierung des Fluoreszenzfarbstoffes bestimmen zu können, wurden die Zellen mit Digitonin (2,5 μ M) behandelt. Digitonin permeabilisiert die Zellmembran ohne die Membranen der Organellen zu zerstören (Borzak et al., 1990). Folgende Lösung wurde zur Bestimmung der Kompartimentierung verwendet:

Kompartimentierungslösung: KCl (135,0 mM), NaCl (5,0 mM), HEPES (5,0 mM), EGTA (1,0 mM), KCN (1,0 mM), Digitonin (2,5 μ M) pH-Wert 7,2 bei 37°C.

Nach Diffusion der Fluorochrome aus dem Zytosol wurde die verbliebene Fluoreszenz, die sich aus Organell- und Hintergrundfluoreszenz summierte, gemessen. Um diese Parameter voneinander unterscheiden zu können, wurde $MnCl_2$ (1 mM) und Ionomycin (5 μ M) zur Perfusionslösung zugesetzt. Dadurch wurde die durch das Fluorochrom verursachte Fluoreszenz der Organellen ausgelöscht und die verbliebene Hintergrundfluoreszenz konnte gemessen werden.

Mit Hilfe dieser Methode wurden folgende Kompartimentierungswerte (prozentualer Anteil der Fluoreszenz der Organellen bezogen auf die Gesamtfluoreszenz) bestimmt:

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

3.4 Anoxie-Reoxygenationsexperimente

3.4.1 Apparative Voraussetzungen

Zur Durchführung der Anoxie-Reoxygenationsexperimente ist es notwendig, daß das Perfusionssystem gasdicht verschlossen ist. Die autoklavierten Medien wurden mittels Edelstahlkapillaren mit der Perfusionskammer verbunden. In diese wurden die Deckgläschen mit den darauf angehefteten Zellen eingebaut. Anschließend wurde die Kammer fest verschraubt. An die Kammer wurde eine Peristaltikpumpe angeschlossen, die das Medium mit einer Geschwindigkeit von 0,5 ml / min durch das Perfusionssystem pumpt. Das Medium wurde während des Anoxie-Experimentes mit N₂ (100 %) begast. Die Temperatur in der Perfusionskammer betrug 37°C.

3.4.2 Experimentelles Protokoll

Um Ischämie und Reperfusion zu simulieren, wurden die Kardiomyozyten 60-80 Minuten anoxisch mit einer Hepes-gepufferten Tyrode-Lösung bei einem pH-Wert von 6,4 inkubiert und anschließend 15 Minuten bei pH-Wert von 7,4 reoxygeniert. Vor Beginn der Reoxygenation (10 Minuten) wurden verschiedene Aktivatoren sowie Inhibitoren eingesetzt. Die nachfolgende Tabelle gibt einen Überblick über die Eigenschaften der verwendeten Substanzen und die eingesetzten Konzentrationen.

Substanz	[C]	Lösungsmittel	Eigenschaften
Urodilatin	1 µM	H ₂ O	- Rezeptoragonist von ANP-Rezeptoren (Typ A und B)

			- aktiviert die partikuläre Guanylylcyclase und führt zur Erhöhung des cGMP-Spiegels
8-Br-cGMP	1 mM	H ₂ O	- Membrangängiges cGMP-Analogen - erhöht den intrazellulären cGMP-Spiegel
8-pCPT-cGMP	10 µM	DMSO	- Spezifischer Aktivator der Proteinkinase G
Thapsigargin	150 nM	DMSO	- Hemmung der Ca ²⁺ -ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums
Ryanodin	10 µM	DMSO	- hemmt Ca ²⁺ -Freisetzungskanäle des sarkoplasmatischen Retikulums

3.4.2.1 Mangan-Quench-Experimente

Um den Einfluss vom cGMP auf den Influx vom Calcium zu untersuchen, wurde die Mangan-Quench-Methode angewandt. Das Prinzip dieser Methode basiert darauf, daß Mangan als bivalentes Kation die gleichen Eintrittsrouten wie Calcium ins Zytosol besitzt und die Fura-2-Fluoreszenz zu löschen vermag. Um eine calciumabhängige Beeinflussung des Quench-Signals zu vermeiden, wird die Fura-2-Fluoreszenz bei der isosbestischen Wellenlänge gemessen. Als Maß für den Calciuminflux wird die Quenchrage analysiert, die sich aus der Fluoreszenzreduktion pro Zeiteinheit ergibt. Mangan wird als MnCl₂ (200 µM) zur Beginn der Reperfusion dem Inkubationsmedium zugesetzt.

3.4.2.2 Natrium-Entzugsexperimente unter normoxischen Bedingungen

Um den Einfluss von cGMP auf den „reverse mode“ und den „forward mode“ des Na⁺-Ca²⁺-Austauschers zu untersuchen, wurden die Kardiomyozyten nach 10-minütiger Vorperfusion mit Na⁺-haltigem Medium mit Na⁺-freiem Medium perfundiert. Dieser Na⁺-Entzug im Perfusionsmedium führt zur Aktivierung des „reverse mode“ des Na⁺-Ca²⁺-Austauschers und zur Ca²⁺-Überladung der Kardiomyozyten (Siegmond et al. 1994).

Anschließend wurden die Kardiomyozyten mit einem Na^+ -haltigen Medium reperfundiert. Dies führt zur Aktivierung des „forward mode“ des Na^+ - Ca^{2+} -Austauschers und somit zur Erholung der Zelle von der zytosolischen Ca^{2+} -Überladung. Um unter diesen experimentellen Bedingungen eine Beteiligung des sarkoplasmatischen Retikulums an der zytosolischen Ca^{2+} -Homöostase ausschließen zu können, wurden die Kardiomyozyten mit Thapsigargin (100 nM, 30 min) und Ryanodin (3 μM , 5 min) vorinkubiert. Um die transsarkolemmale Natriumverschiebung durch die Na^+ - K^+ -ATPase oder den NHE zu vermeiden, wurden diese mit Ouabain (300 μM) bzw. mit HOE 694 (3 μM) gehemmt. 8-Br-cGMP (1 mM) wurde mit Beginn des Experimentes eingesetzt.

3.4.2.3 Untersuchungen des Einflusses von 8-Br-cGMP auf die Hyperkontraktorneigung der Kardiomyozyten

In diesen Experimenten wurde der Einfluss eines erhöhten zytosolischen cGMP-Spiegels auf die Hyperkontraktorneigung der Kardiomyozyten untersucht. Die Ischämie-Reperfusions-Experimente wurden wie unter 3.4.2 in Anwesenheit oder Abwesenheit des c-GMP-Analogons 8-Bromo-cGMP durchgeführt. Um eine Hyperkontraktur zu vermeiden, wurden die Kardiomyozyten bei einem pH-Wert von 6,4 reoxygeniert. Um einen kontrollierten zytosolischen Calciumanstieg zu erzielen, wurde nach einer 15-minütigen Reoxygenation die extrazelluläre Calciumkonzentration auf 5 mM erhöht und die Kardiomyocyten mit 1 Hz, 3 Hz und 5 Hz stufenweise elektrisch stimuliert, bis sie eine Hyperkontraktur entwickelt hatten. In der Auswertung wurde der Calciumwert ermittelt bei dem die Kardiomyozyten eine Hyperkontraktur entwickelten.

3.4.2.4 Bestimmung des cGMP-Spiegel

Während der Anoxie-Reoxygenationsexperimenten wurde die Erhöhung des cGMP-Spiegels durch Urodilatin untersucht. Dabei wurden zu den Zeitpunkten (0, 45, 60 min) der Anoxie und (0,2,5,10,15 min) der Reoxygenation jeweils 5 ml Perfusatsproben entnommen und sofort eingefroren. Der Gehalt des cGMP im

Perfusat wurde mittels Radioimmunassay in Zusammenarbeit mit IPF-Pharmaceuticals, Hannover (Arbeitsgruppe Prof. Forssmann) bestimmt.

3.5 Messparameter

In der folgenden Tabelle sind die in den Experimenten gemessenen Parameter zusammengestellt und charakterisiert.

Parameter	Einheit	Methode
Zytosolischer Ca^{2+} -Gehalt	In „arbitrary units“ (a.u.) der Fura-2-Ratio oder als Absolutwerte	Fura-2
Diastolischer bzw. systolischer Ca^{2+} -Wert	Maximum bzw. Minimum einer Oszillation; wiedergegeben in „arbitrary units“ (a.u.) der Fura-2-Ratio	Fura-2
Ca^{2+} -Oszillationen	Frequenz (Anzahl der Oszillationen pro Minute)	Fura-2
Zytosolischer pH-Wert	In „arbitrary units“ (a.u.) der BCECF-Ratio oder als Absolutwerte	BCECF
Endischämische Zelllänge (Rigorlänge)	Zelllänge (in %) am Ende der simulierten Ischämie bezogen auf die Ausgangslänge	Zellängenmessung
Reoxygenations-bedingte Zellängenverkürzung (Hyperkontraktur)	% der Zelllänge bezogen auf Ausgangslänge- bzw. endischämische Länge	Zellängenmessung
Zeitpunkt des Rigoreintritts (Rigorzeitpunkt)	Zeitdifferenz (min) zwischen Anoxiebeginn und Rigoreintritt	Zeitdifferenzermittlung

3.6 Statistik

Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM von n verschiedenen Experimenten wiedergegeben. Bei Einzelzellmessungen wurden bis zu 12 Zellen zur Mittelwertbildung herangezogen; wurden mehrere Zellen simultan pro Experiment gemessen, erfolgte die Bildung des Mittelwertes aus 20 - 60 Zellen.

Statistische Vergleiche wurden durch einfache Varianzanalyse unter Nutzung des Student-Newman-Keuls-Tests für post-hoc Analysen durchgeführt (Ludbrook, 1994). Unterschiede mit $p < 0,05$ wurden als statistisch signifikant angesehen.

4 ERGEBNISSE

4.1 Veränderung der Kationenhomöostase und der Zelllänge unter simulierter Ischämie (Anoxie) und Reperfusion (Reoxygenation) im Modell adulter Kardiomyozyten

4.1.1 ATP-Abbau und Entwicklung der Rigorkontraktur während Anoxie

Um die pathophysiologische Situation von Ischämie und Reperfusion zu simulieren, wurden isolierte Kardiomyozyten anoxisch bei einem extrazellulären pH-Wert von 6,4 perfundiert und anschließend bei einem pH-Wert von 7,4 reoxygeniert. 15-20 min nach anoxischer Perfusion entwickeln die Kardiomyocyten eine Rigorkontraktur (Verkürzung der Zellen von 100 auf ca. 70% ihrer Ausgangslänge). Das Eintreten der Rigorkontraktur korreliert mit dem Abbau energiereicher Phosphate wie ATP und Phosphokreatin (Siegmund et al., 1990). Mittels der Mg-Fura-2-Methode (Bowers et al., 1992) kann man den ATP-Abbau ermitteln (Budinger et al., 1998) und mit dem Eintreten der Rigorkontraktur korrelieren. Mit dieser Methode wird das beim ATP-Abbau freigesetzte Mg^{2+} gemessen. Abbildung 4.1.1.1 zeigt den gleichzeitigen Eintritt von Rigorkontraktur und den schnellen Anstieg der Mg-Fura-2-Ratio.

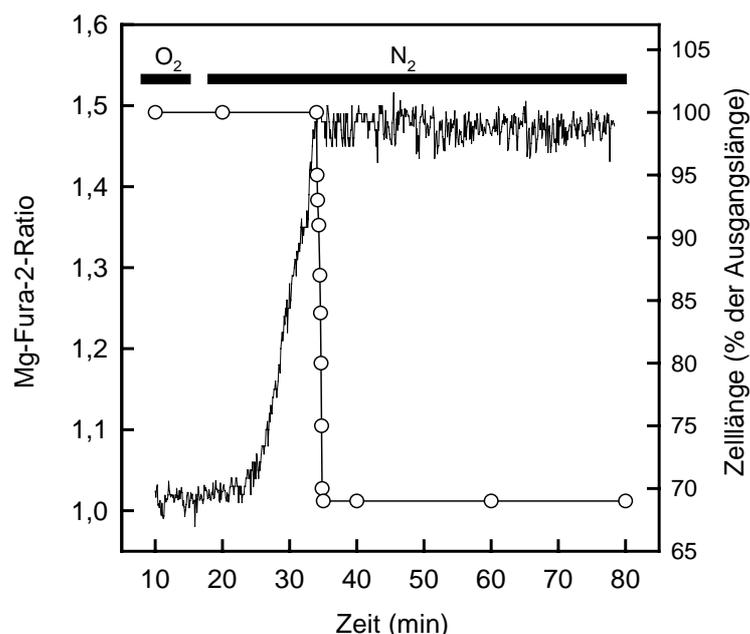


Abb. 4.1.1.1 Änderung der Mg-Fura-2-Ratio (—) und der Zelllänge (○—○) während simulierter Ischämie (exemplarischer Verlauf).

4.1.2 Änderung des zytosolischen pH-Wertes

Unter normoxischen Bedingungen ($\text{pH}_a = 7,4$) besitzen die Kardiomyozyten einen intrazellulären pH-Wert von $7.12 \pm 0,04$ ($n = 12$). Dieser pH_i -Wert entspricht einer BCECF-Ratio von $4,15 \pm 0,05$ ($n = 12$). Simulierte Ischämie führt zur intrazellulären Ansäuerung der Zellen. Nach 60 min ist der pH_i $6,4 \pm 0,03$ ($n = 12$), die BCECF-Ratio $2,9 \pm 0,1$ ($n = 12$). Der Verlauf der Ansäuerung kann in drei Phasen unterteilt werden: 1. eine schnelle Azidifizierung, 2. eine transiente Alkalisierung, 3. eine geringfügige weitere Azidifizierung. Während der simulierten Reperfusion (Reoxygenation bei $\text{pH} = 7,4$) realkalisierte das Zytosol innerhalb von 10 min auf den normoxischen Ausgangswert. Abbildung 4.1.2.1 zeigt den zeitlichen Verlauf des pH_i während Anoxie und Reoxygenation.

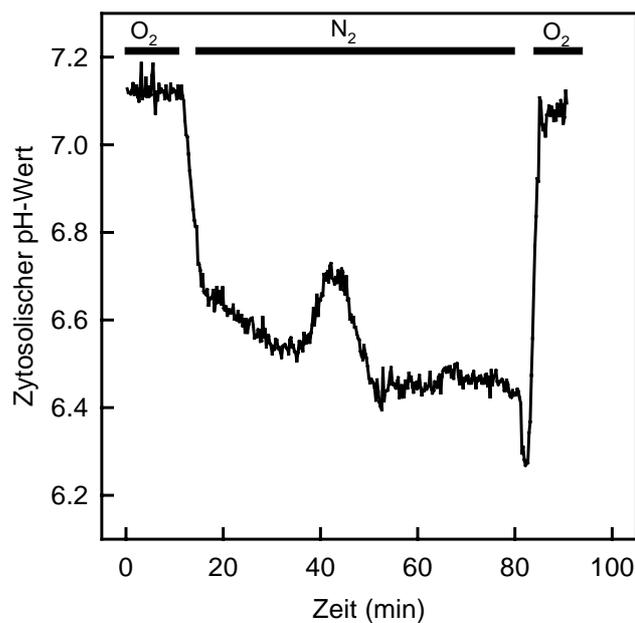
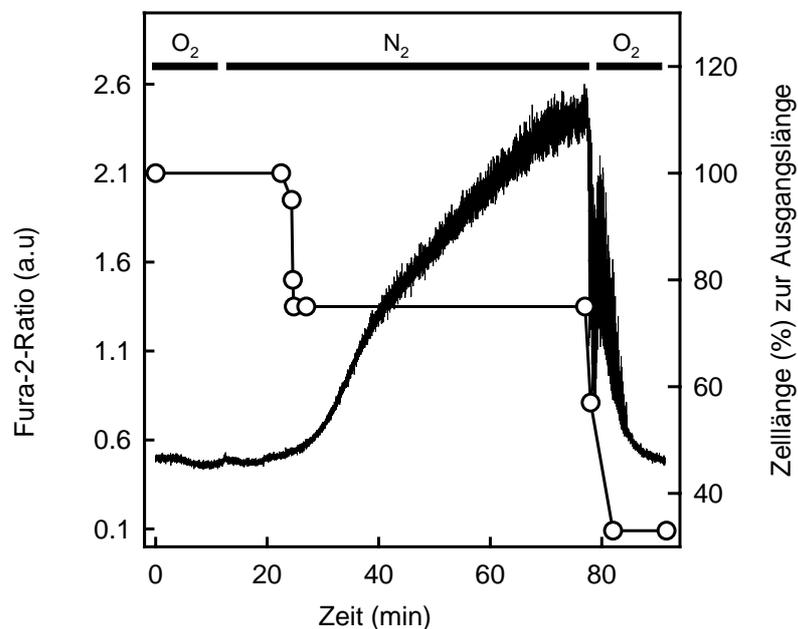


Abb. 4.1.2.1 Verlauf des zytosolischen pH-Wertes während simulierter Ischämie (Anoxie; $\text{pH}_a = 6,4$) und Reoxygenation ($\text{pH}_a = 7,4$).

4.1.3 Veränderung des zytosolischen Calciums und der Zelllänge

Während Anoxie entwickeln die Kardiomyozyten eine intrazelluläre Ca^{2+} -Überladung. Nach dem Rigoreintritt (Zelllängenverkürzung auf ca. 70 % der Ausgangslänge) steigt die Fura-2-Ratio bis auf einen Wert von $2,55 \pm 0,4$ a.u. ($n = 12$) an. Dies entspricht einer zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration von $1,88 \pm 0,05 \mu\text{M}$ ($n = 12$). Während der Reoxygenation fällt die Fura-2-Ratio wieder auf den normoxischen Wert ab. Die Zellen entwickeln dabei eine Hyperkontraktur (Verkürzung der Zelllänge auf 30% ihrer Ausgangslänge).



4.1.3.1 Exemplarischer Verlauf der Fura-2-Ratio und der Zelllänge während Anoxie und Reoxygenation. Die Abbildung zeigt den Verlauf des zytosolischen Ca^{2+} (Fura-2-Ratio) (—) und der Zelllänge (○—○) (% der Ausgangslänge) während 60-minütiger Anoxie und 15-minütiger Reoxygenation.

Die zytosolische Calciumerholung verläuft während der Reoxygenation in drei Phasen. In der ersten Phase kommt es zu einer schnellen Abnahme, bedingt durch die Aufnahme ins sarkoplasmatische Retikulum. In der zweiten Phase treten hochfrequente Oszillationen, die temporäre Ca^{2+} -Überladungen des Zytosols darstellen, auf. In der dritten Phase nehmen die Oszillationen an Frequenz und Amplitude ab und das zytosolische Calcium stellt sich langsam auf normoxischen Wert ein. Während der zweiten Phase, die mit dem Auftreten der Oszillationen einhergeht, verkürzen sich die Zellen um weitere 30 – 40 %. Abbildung 4.1.3.2 zeigt den Verlauf der Fura-2-Ratio und die Zellverkürzung während Anoxie und Reoxygenation.

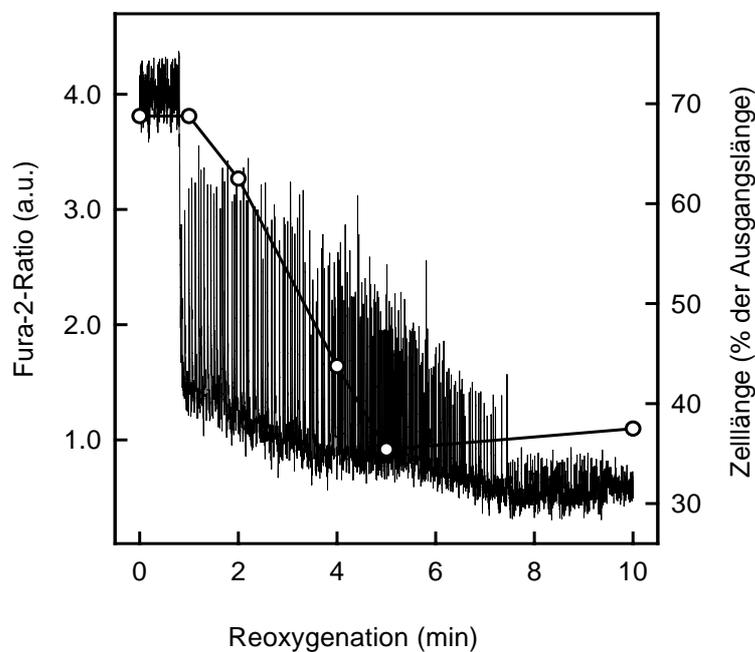


Abbildung 4.1.3.2 Exemplarischer Verlauf der Fura-2-Ratio (—) und der Zelllänge (○—○) während der Reoxygenationsphase.

4.2 Einfluss von 8-Br-cGMP auf die reoxygenationsinduzierte Hyperkontraktur, die zytosolische Calciumhomöostase und den pH_i-Wert

4.2.1. Beeinflussung der reoxygenationsinduzierten Hyperkontraktur

In einer Reihe von Experimenten wurde der Einfluss des membrangängigen cGMP-Analogons (8-Br-cGMP) auf die Ionenhomöostase und die reoxygenationsinduzierte Hyperkontraktur untersucht. Die folgende Abbildung zeigt den Verlauf der Zellverkürzung während der Reoxygenationsphase. Unter Kontrollbedingungen entwickeln die Kardiomyozyten eine massive Hyperkontraktur, die in Gegenwart erhöhter cGMP-Spiegel signifikant reduziert wird.

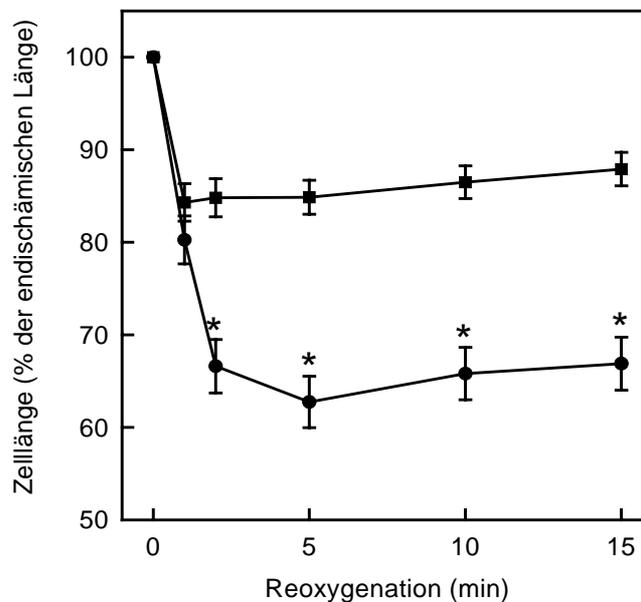


Abbildung 4.2.1.1 Zellverkürzung während der Reoxygenation unter Kontrollbedingungen (●) und in Gegenwart von 8-Br-cGMP (1 mM) (■). Daten sind dargestellt als Mittelwerte ± SEM (n = 40 ; * p < 0.05 versus Kontrolle).

4.2.2 Einfluss von 8-Br-cGMP auf die zytosolische Calciumhomöostase und den pH_i -Wert

4.2.2.1 Beeinflussung der Oszillationsfrequenz

In unseren Experimenten wurde neben der Reduktion der Hyperkontraktur in Anwesenheit von 8-Br-cGMP eine signifikante Reduktion der Oszillationsfrequenz des zytosolischen Calciums beobachtet. Die stärkste Reduktion der Oszillationsfrequenz zeigte sich in Anwesenheit von 8-Br-cGMP während der zweiten Minute der Reoxygenation ($15\text{-}20\text{ min}^{-1}$, im Vergleich zur Kontrolle $40\text{-}50\text{ min}^{-1}$).

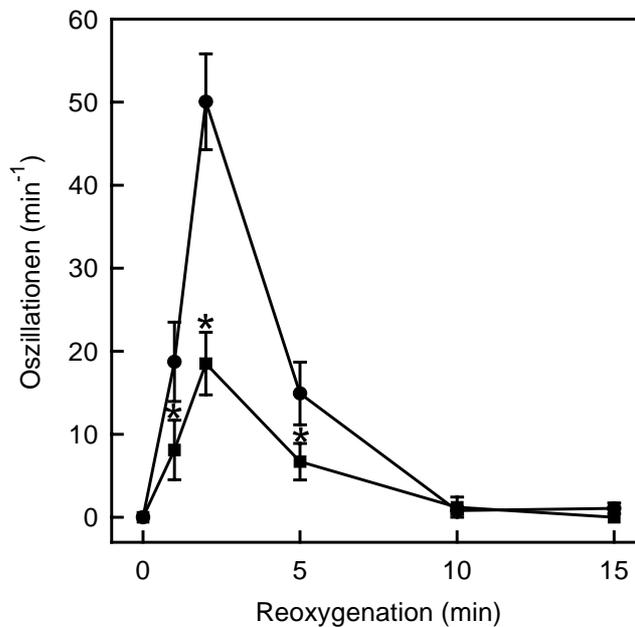


Abbildung 4.2.2.1.1 Verlauf der Oszillationsfrequenz (min^{-1}) während der Reoxygenation unter Kontrollbedingungen (●) und in Anwesenheit von 8-Br-cGMP (1mM) (■). Daten sind dargestellt als Mittelwerte \pm SEM ($n = 43$; * $p < 0.05$ versus Kontrolle).

4.2.2.2 Einfluss von 8-Br-cGMP auf den Verlauf des zytosolischen Calciums

Die Reduktion der Ca^{2+} -Oszillationen in Gegenwart von 8-Bromo-cGMP geht mit einer beschleunigten Calcium-Erholung während der Reoxygenation einher. Wie der obere Teil der Abbildung zeigt, führt 8-Br-cGMP zu einer beschleunigten Abnahme des zytosolischen Calciums während der Reoxygenation. Um zu untersuchen, ob die beschleunigte Calciumabnahme auf einer verstärkten Zurückspeicherung ins sarkoplasmatische Retikulum beruht, haben wir die Calcium-ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums mit Thapsigargin gehemmt und den Einfluss von 8-Bromo-cGMP auf die Calciumkinetik unter diesen Bedingungen untersucht.

Wie Abbildung 4.2.2.2.1 zeigt, verläuft die zytosolische Calciumerholung während der Reoxygenation mit gleicher Geschwindigkeit in Anwesenheit oder Abwesenheit von 8-Br-cGMP, wenn die sarkoplasmatische Calcium-ATPase gehemmt wurde.

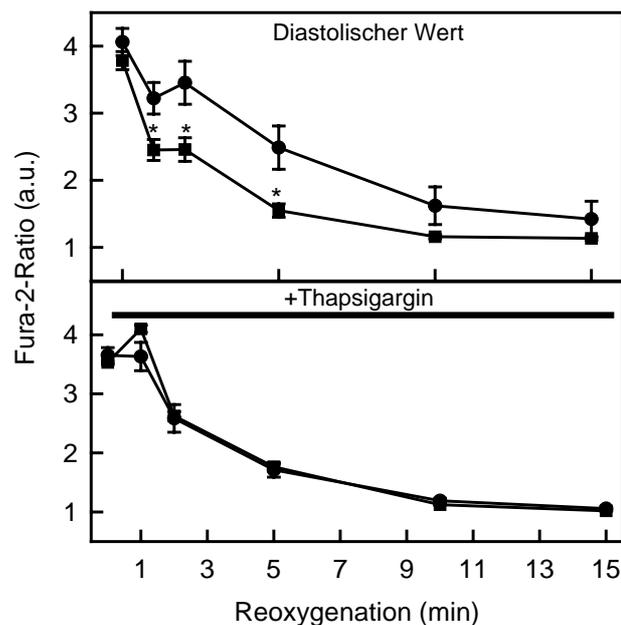


Abbildung 4.2.2.2.1 Die obere Abbildung zeigt die zytosolische Calciumerholung während der Reoxygenation in Anwesenheit von 8-Br-cGMP (1mM) (■) und unter Kontrollbedingungen (●). Die untere Abbildung zeigt ebenfalls die Calciumkinetik in Anwesenheit oder Abwesenheit von 8-Br-cGMP (1mM) bei gleichzeitiger Hemmung der sarkoplasmatischen Calcium-ATPase mit Thapsigargin (150 nM). Daten sind dargestellt als Mittelwerte \pm SEM (n = 40; * p < 0.05 versus Kontrolle).

4.2.2.3 Beeinflussung des Calcium-Influx

Um zu überprüfen, ob 8-Br-cGMP den Calciuminflux während der Reoxygenation beeinflusst, wurde die Mangan-Quench-Methode (s. Methoden) angewandt. Die Quenchrage, die sich durch die Abnahme des Fura-2-Signals bei 360 nm pro Minute ermittelt, dient als Maß für den Calciuminflux über das Sarkolemm. Abbildung 4.2.2.3.1 zeigt keinen signifikanten Unterschied bezüglich der Quenchrage zwischen den mit 8-Br-cGMP-behandelten Zellen und den unbehandelten Zellen. Daraus folgt, dass 8-Br-cGMP den Calciuminflux nicht beeinflusst.

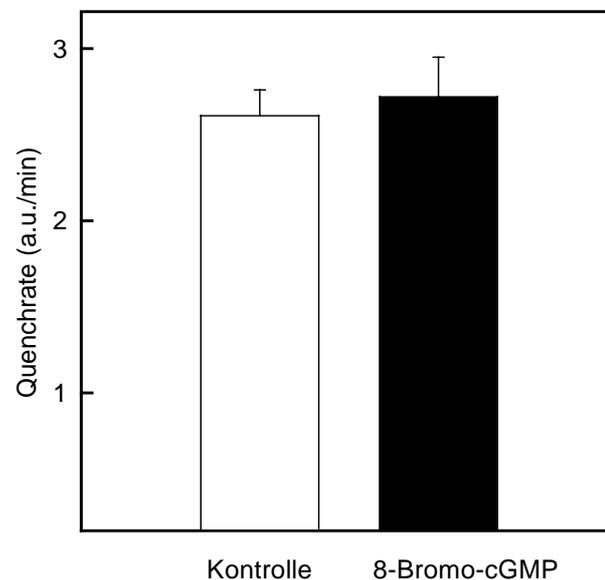


Abbildung 4.2.2.3.1 zeigt die Quenchrage (Abnahme des Fura-2-Signals bei 360 nm pro Minute) während der Reoxygenation in Anwesenheit von 8-Br-cGMP (1 mM) und unter Kontrollbedingungen. Die Daten sind dargestellt als Mittelwerte \pm SEM (n = 25)

4.2.2.4 Einfluss von 8-Br-cGMP auf den „reverse mode“ und den „forward mode“ des Natrium-Calcium-Austauschers

Der Einfluss von 8-Br-cGMP auf den „reverse mode“ und den „forward mode“ des Natrium-Calcium-Austauschers wurde in Natriumzugsexperimenten untersucht. Während des Natriumzuges wird eine schnelle zytosolische Ca^{2+} -Überladung via „reverse mode“ des Natrium-Calcium-Austauschers induziert. Wenn die Kardiomyozyten anschließend mit natriumhaltigen Medium reperfundiert werden, kommt zu einer Erholung des Zytosols von dieser Ca^{2+} -Überladung. Dies geschieht durch die Reaktivierung des „forward mode“ des Natrium-Calcium-Austauschers. Wie Abbildung 4.2.2.4.1 zeigt, hat 8-Br-cGMP keinen signifikanten Einfluss auf die Calciumkinetik in diesen Experimenten. Dies bedeutet, dass weder der „reverse mode“ noch der „forward mode“ des Natrium-Calcium-Austauschers durch 8-Br-cGMP beeinflusst werden.

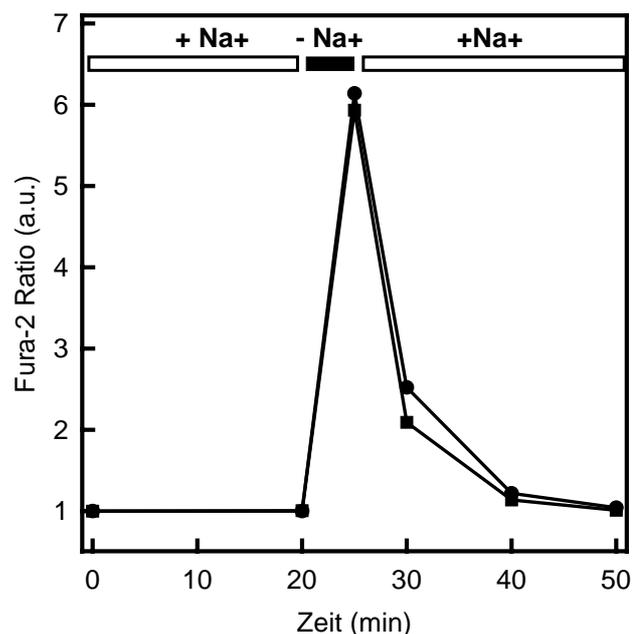


Abbildung 4.2.2.4.1 zeigt die Calciumkinetik (Fura-2-Ratio) während des Natriumzuges und anschließende Perfusion mit Natrium in Anwesenheit von 8-Br-cGMP (1mM) (■) und unter Kontrollbedingungen (●). Daten sind dargestellt als Mittelwerte \pm SEM (n = 22).

4.2.3 Einfluss von 8-Br-cGMP auf die zytosolische pH-Erholung

Wie frühere Arbeiten unsere Arbeitsgruppe (Ladilov et al. 1995, Schäfer et al. 2000) gezeigt haben, kann einer Reduktion der Oszillationsfrequenz eine Hemmung der zytosolischen pH-Erholung zugrunde liegen. Um dies zu überprüfen, wurde der Verlauf des pH_i in der Reoxygenationsphase unter Kontrollbedingungen und in Gegenwart von 8-Br-cGMP gemessen. Die folgende Abbildung zeigt, daß 8-Br-cGMP den Verlauf des pH_i -Wertes während der Reoxygenation nicht beeinflusst. Unter normoxischen Bedingungen ist der pH_i 7,3. Der endanoxische pH_i -Wert ist 6,4. Während der Reoxygenation erholt sich der pH_i innerhalb von 15 Minuten und kehrt zum initialen normoxischen Wert von 7,3 zurück. Abbildung 4.2.3.1 zeigt, dass 8-Br-cGMP keinen Einfluss auf den pH_i -Verlauf während der Reoxygenationsphase hat.

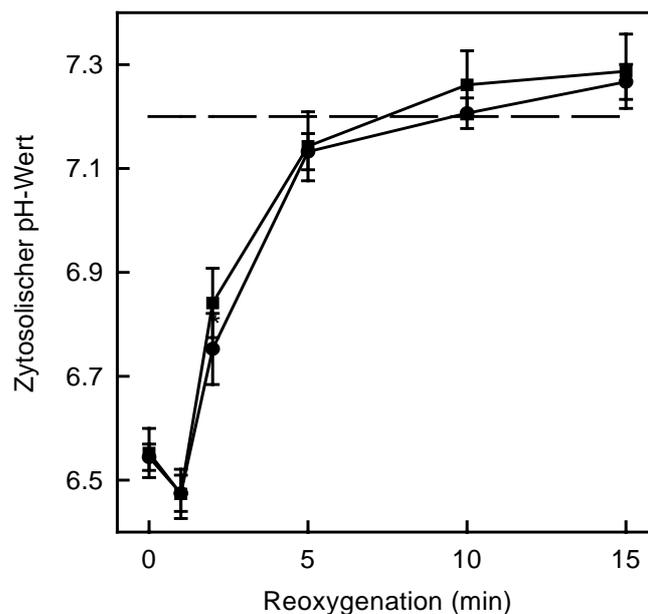


Abbildung 4.2.3.1 zeigt den Verlauf des zytosolischen pH-Wertes während der Reoxygenation in Anwesenheit von 8-Br-cGMP (1mM) (■) und unter Kontrollbedingungen (●). Daten sind dargestellt als Mittelwerte \pm SEM (n = 18).

4.2.4 Einfluss von 8-Br-cGMP auf die Hyperkontraktorneigung reoxygenerter Kardiomyozyten

Die Hyperkontraktorneigung in reoxygenierten Kardiomyozyten wurde geprüft, indem die zytosolische Ca^{2+} -Überladung (Fura-2-Ratio) variiert wurde und diese zur Zelllänge in Beziehung gesetzt wurde (Abbildung 4.2.4.1). Die Ergebnisse zeigen, dass in Anwesenheit von 8-Br-cGMP die Zellverkürzung bei gegebener Ca^{2+} -Überladung nur geringfügig schwächer ausgeprägt ist als ohne 8-Br-cGMP.

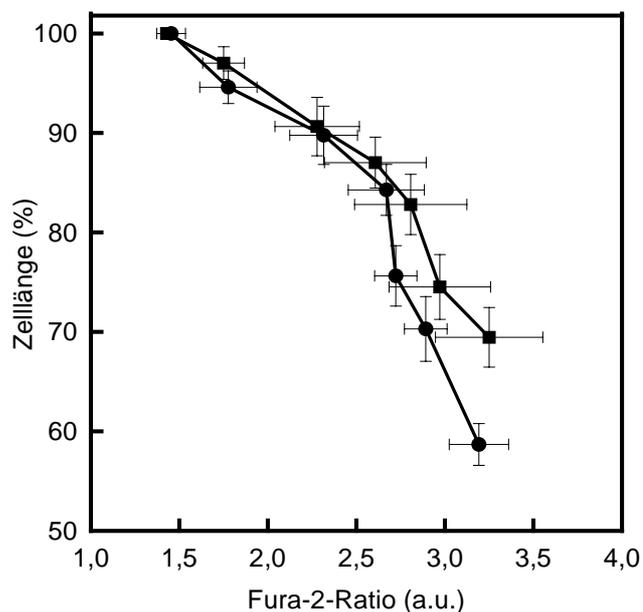


Abbildung 4.2.4.1 Die Verkürzung der Kardiomyozyten bei den jeweiligen zytosolischen Calciumkonzentrationen (Fura-2-Ratio) in Anwesenheit (■) oder Abwesenheit von 8-Br-cGMP (1mM) (●). Daten sind dargestellt als Mittelwerte \pm SEM (n = 20).

4.3 Vergleichender Einfluss von zellpermeablen cGMP-Analoga und Urodilatin auf die Entwicklung der Hyperkontraktur, die Calciumhomoöstase und den zytosolischen pH-Wert

4.3.1 Einfluss von Urodilatin (1 μ M) auf den zytosolischen cGMP-Spiegel

Die rezeptorvermittelte Stimulation der partikulären Guanylylzyklase durch Urodilatin oder ANP führt zu einer Erhöhung des zytosolischen cGMP-Spiegel. Diese zytosolische Erhöhung des cGMP-Spiegels kann auch extrazellulär nachgewiesen und gemessen werden. In diesen Experimenten wurde der Einfluss von Urodilatin auf die Bildung von cGMP untersucht. Dabei wurden Anoxie-Reoxygenations-Experimente wie unter (3.4.2) beschrieben durchgeführt. Urodilatin wurde 10 Minuten vor Ende der Anoxie dem Inkubationsmedium zugesetzt. Im Verlauf der Experimente wurden jeweils 5 ml Perfusatsproben zu den verschiedenen Zeitpunkten der Anoxie-Reoxygenation in Anwesenheit von Urodilatin und unter Kontrollbedingungen gesammelt, eingefroren und später auf ihren cGMP-Gehalt mittels Radioimmunassay analysiert. Die Abbildung 4.3.1.1 zeigt einen deutlichen Anstieg des cGMP-Spiegel nach Applikation von Urodilatin in den ersten Minuten der Reoxygenation.

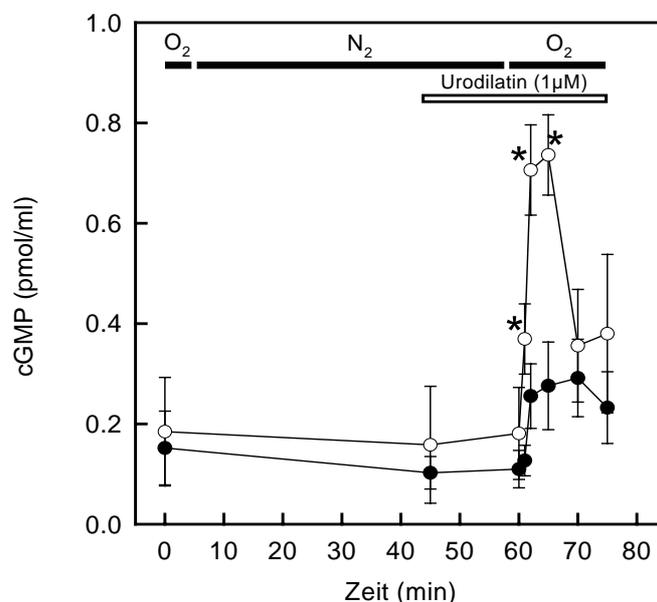


Abbildung 4.3.1.1 Einfluss von Urodilatin (1 μ M) (○) auf die Bildung von cGMP im Vergleich zur Kontrolle (●). Daten sind dargestellt als Mittelwerte \pm SEM (n = 5; *p < 0,05 versus Kontrolle).

4.3.2 Beeinflussung der Hyperkontraktur mit 8-Br-cGMP, 8-pCPT-cGMP und Urodilatin

Um zu untersuchen, ob eine rezeptorvermittelte Erhöhung des zytosolischen cGMP gegen die Hyperkontraktur schützen kann, haben wir die Zellen mit 1 μM Urodilatin reoxygeniert. Abbildung 4.3.2.1 zeigt einen vergleichbaren Schutz mit Urodilatin gegen die Hyperkontraktur wie unter dem Einfluss des cGMP-Analogons (8-Br-cGMP). Die Effekte von Urodilatin und 8-Br-cGMP wurden mit der Wirkung von 8-pCPT-cGMP, einem spezifischen Aktivator der Proteinkinase G verglichen. Wir stellten fest, dass 8-pCPT-cGMP die Zellen gegen die Hyperkontraktur schützen kann und, dass dieser Schutz mit dem unter Urodilatin oder 8-Br-cGMP vergleichbar ist.

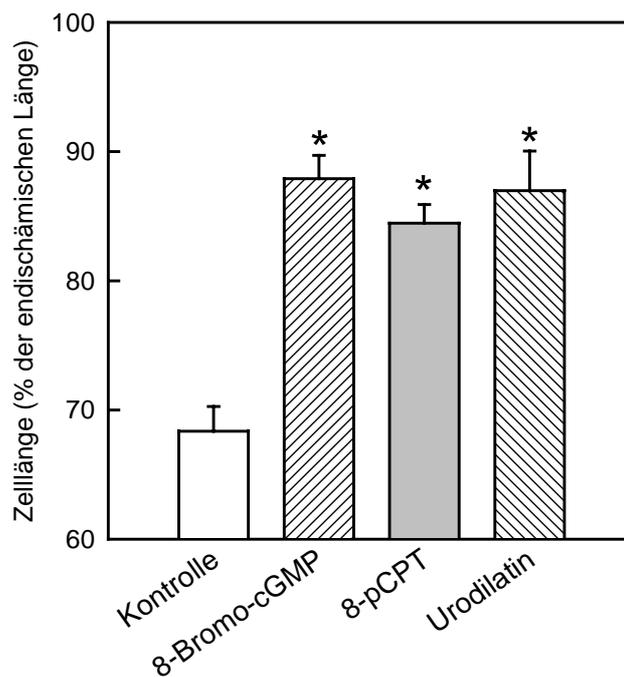


Abbildung 4.3.2.1 Einfluss von 8-Br-cGMP (1 μM), 8-pCPT-cGMP (10 μM) und Urodilatin (1 μM) auf die Hyperkontraktur nach 15-minütiger Reoxygenation. Daten sind dargestellt als Mittelwerte \pm SEM ($n = 25$; * $p < 0,05$ versus Kontrolle).

4.3.3 Beeinflussung der zytosolischen Calciumoszillationen mit 8-Br-cGMP, 8-pCPT-cGMP und Urodilatin

Der beschriebene Schutz gegen die Hyperkontraktur mit 8-Br-cGMP, 8-pCPT-cGMP und Urodilatin ist von einer starken Reduktion der Frequenz der zytosolischen Ca^{2+} Oszillationen begleitet. Wie Abbildung 4.3.3.1 zeigt, wurde die Oszillationsfrequenz in der zweiten Minute der Reoxygenation in Gegenwart von 8-pCPT-cGMP, 8-Br-cGMP oder Urodilatin ($15\text{-}20\text{ min}^{-1}$) im Vergleich zur Kontrolle ($35\text{-}40\text{ min}^{-1}$) signifikant reduziert.

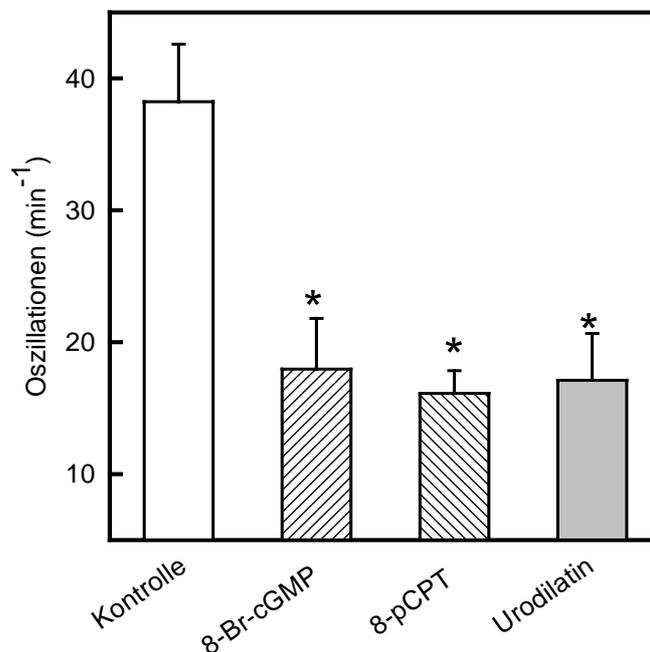


Abbildung 4.3.3.1 Einfluss von 8-Br-cGMP (1 mM), 8-pCPT-cGMP (10 μM) und Urodilatin (1 μM) auf die Frequenz der zytosolischen Ca^{2+} -Oszillationen in der zweiten Minute der Reoxygenation im Vergleich zur Kontrolle. Daten sind dargestellt als Mittelwerte \pm SEM ($n = 25$; * $p < 0,05$ versus Kontrolle).

4.3.4 Beeinflussung der Geschwindigkeit der zytosolischen Calciumerholung mit 8-Br-cGMP, 8-pCPT-cGMP und Urodilatin

Um zu untersuchen, ob 8-Br-cGMP, 8-pCPT-cGMP und Urodilatin die Geschwindigkeit der zytosolischen Calciumerholung zu Beginn der Reoxygenation beeinflussen, wurde die Abnahme der Fura-2-Ratio pro Minute ausgewertet. Es zeigte sich eine beschleunigte Abnahme der Fura-2-Ratio unter den Einfluss von 8-Br-cGMP, 8-pCPT-cGMP und Urodilatin.

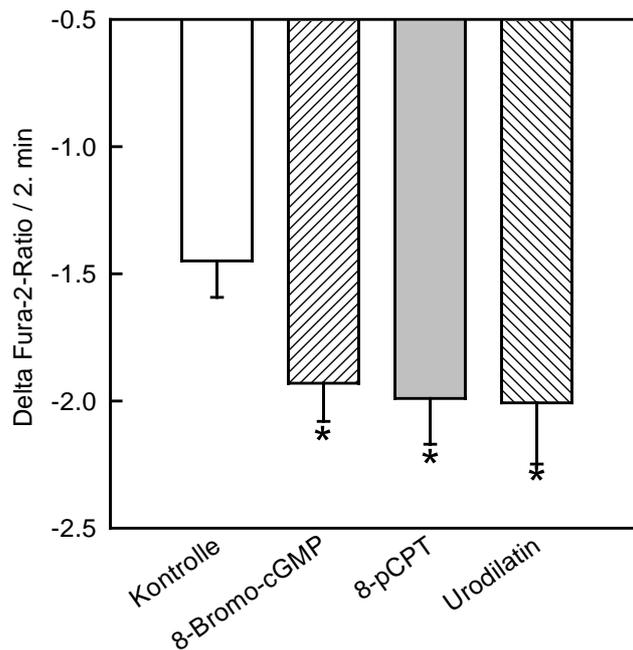


Abbildung 4.3.4.1 Abnahme-Geschwindigkeit der Fura-2-Ratio (min^{-1}) als Ausdruck der beschleunigten zytosolischen Calciumerholung in den ersten zwei Minuten der Reoxygenation unter den Einfluss von 8-Br-cGMP (1 mM), 8-pCPT-cGMP (10 μM) und Urodilatin (1 μM) im Vergleich zur Kontrolle. Daten sind dargestellt als Mittelwerte \pm SEM (n = 25; *p < 0,05 versus Kontrolle).

4.3.5 Einfluss von 8-Br-cGMP, 8-pCPT-cGMP und Urodilatin auf den zytosolischen pH_i -Wert während der Reoxygenation

Um zu untersuchen, ob 8-Br-cGMP, 8-pCPT-cGMP und Urodilatin einen vergleichbaren Einfluss auf die Erholung des pH_i -Wertes haben, wurden diese Substanzen während der Reoxygenationsphase eingesetzt. Die Daten belegen, dass die pH_i Erholung nach 10-minütiger Reoxygenation unter den Einfluss von 8-Br-cGMP, 8-pCPT-cGMP und Urodilatin vergleichbar zur Kontrolle ist.

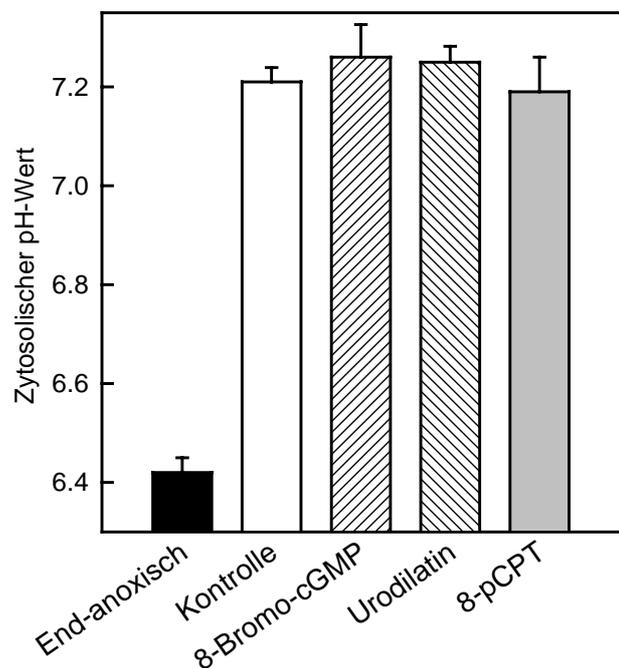


Abbildung 4.3.5.1 Einfluss von 8-Br-cGMP (1 mM) , 8-pCPT-cGMP (10 μM) und Urodilatin (1 μM) auf die pH_i -Erholung im Vergleich zur Kontrolle nach 10-minütiger Reoxygenation. Daten sind dargestellt als Mittelwerte \pm SEM (n = 22).

5 DISKUSSION

5.1 Mechanismus der cGMP-abhängigen Protektion gegen den myokardialen Reperfusionsschaden

Zentrales Ziel der Arbeit war es zu untersuchen, auf welche Weise Erhöhung des zellulären cGMP-Spiegels in Herzmuskelzellen diese vor der reoxygenationsinduzierten Hyperkontraktur schützen kann. Die schnelle Entwicklung von Hyperkontraktur stellt den wichtigsten Mechanismus der Myokardschädigung in der Akutphase der Reperfusion dar (akuter Reperfusionsschaden). Sie wird ausgelöst durch die Re-energetisierung der Myokardzellen bei erhöhtem zytosolischen Ca^{2+} -Spiegel, da diese Kombination von Bedingungen eine ungezügelte Aktivierung des Kontraktionsapparates auslöst.

Die Ergebnisse der Arbeit zeigen, dass Manöver, die in den reoxygenierten Myokardzellen die cGMP-Spiegel erhöhen, einen beschleunigten Abbau der zytosolischen Ca^{2+} -Überladung bewirken. Damit wird einer der Auslöser für die Hyperkontraktur beseitigt und folglich war die reoxygenationsinduzierte Hyperkontraktur unter diesen Bedingungen auch sehr deutlich reduziert. Die bei cGMP-Erhöhung beschleunigte Restitution der Ca^{2+} -Homöostase war in Gegenwart von Thapsigargin aufgehoben. Thapsigargin hemmt selektiv die SR-Ca-ATPase (SERCA) und somit auch die Rückspeicherung des zytosolischen Calciums in das sarkoplasmatische Retikulum. Diese Befunde deuten daraufhin, dass die schnellere Calciumerholung auf eine schnellere Calciumaufnahme in das sarkoplasmatische Retikulum via SR-Ca-ATPase zurückzuführen ist. Die Interaktion zwischen cGMP und SERCA wurde in verschiedenen früheren Arbeiten untersucht. Brosq et al. zeigten, dass cGMP über eine Aktivierung der Proteinkinase G (PKG) das SERCA-modulierende Protein Phospholamban phosphorylieren kann. In der nichtphosphorylierten Form hemmt Phospholamban die SERCA. Wird Phospholamban phosphoryliert, wird diese Hemmung aufgehoben und die SERCA wird infolgedessen aktiviert. Eine Aktivierung der SR-Ca-ATPase führt zu einer schnelleren Rückspeicherung des zytosolischen Calciums ins sarkoplasmatische Retikulum. Auf diesen Mechanismus dürfte auch der hier beschriebene

beschleunigte Abbau der zytosolischen Ca^{2+} -Überladung unter dem Einfluss von cGMP zurückzuführen sein.

Zur protektiven Wirkung von 8-Br-cGMP könnte auch eine hemmende Wirkung auf den „reverse mode“ bzw. eine aktivierende Wirkung auf den „forward mode“ des Natrium-Calcium-Austauschers beitragen. In früheren Studien unserer Arbeitsgruppe (Schäfer et al., 2001; Nakamura et al., 1998; Doering et al., 1993) wurde gezeigt, dass eine Hemmung des „reverse mode“ des Natrium-Calcium-Austauscher während der Reoxygenation zur Reduktion der Ca^{2+} -Oszillationen und somit zur Protektion gegen die reoxygenationsinduzierte Hyperkontraktur führte. In natriumfreien Experimenten wurde die Wirkung von 8-Br-cGMP sowohl auf den „reverse mode“ als auch auf den „forward mode“ des Natrium-Calcium-Austauschers untersucht. Der Natriumentzug führt in den Kardiomyozyten zu einem zytosolischen Ca^{2+} -Anstieg über den „reverse mode“ des Natrium-Calcium-Austauschers. Bei Reperfusion der Kardiomyozyten mit Na^+ -haltigem Medium kommt es zu einer zytosolischen Ca^{2+} -Erholung über den „forward mode“ des Natrium-Calcium-Austauschers. Vorinkubation mit 8-Br-cGMP kann weder den zytosolischen Ca^{2+} -Anstieg noch die Ca^{2+} -Erholung beeinflussen. Infolgedessen kann sowohl eine Hemmung des „reverse mode“ als auch eine Aktivierung des „forward mode“ des Natrium-Calcium-Austauschers durch 8-Br-cGMP ausgeschlossen werden.

Anhand von Mangan-Quench-Experimenten wurde eine weitere Möglichkeit ausgeschlossen werden, über die cGMP die zytosolische Calciumerholung in der Frühphase der Reoxygenation beschleunigen könnte. Diese Experimente zeigen, dass es nicht zu einer Reduktion des sarkolemmalen Calciuminfluxes kommt.

Zusammengefasst kann die beschleunigte Ca^{2+} -Erholung bzw. die Reduktion der Ca^{2+} -Oszillationen in Anwesenheit von cGMP während der Reoxygenation auf eine verstärkte Aufnahme ins sarkoplasmatische Retikulum zurrückgeführt werden.

Die Reduktion der reoxygenationsinduzierten Ca^{2+} -Oszillationen in Anwesenheit von cGMP könnte auf einer protoneninduzierten Hemmung der Ca^{2+} -Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (Lochner et al., 1994; Ladilov et al. 1995,

Schäfer et al. 2000) beruhen. Um diese Möglichkeit zu überprüfen, wurde der Einfluss von 8-Br-cGMP, Urodilatin und 8-pCPT-cGMP auf den zytosolischen pH-Wert während der Reoxygenation untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass kein Unterschied bezüglich des zytosolischen pH-Wertes unter dem Einfluss von cGMP im Vergleich zur Kontrolle auftritt. Aufgrund dieser Befunde ist die Reduktion der Ca^{2+} -Oszillationen nicht auf eine Änderung des zytosolischen pH-Wertes zurückzuführen. Auch eine Verminderung der Hyperkontraktur durch eine zusätzliche Ca^{2+} -Desensitivierung am Troponin-C der Myofilamente durch Ansäuerung (Kitakaze et al., 1988; Harrison et al., 1992; Ito et al., 1997) wurde damit ausgeschlossen.

Ladilov et al. (1997) zeigten in einer früheren Arbeit an isolierten Kardiomyozyten, dass eine Ischämie die Auslösbarkeit irreversibler Hyperkontraktur bei erhöhten zytosolischen Ca^{2+} -Spiegeln steigert. Diese erhöhte Hyperkontraktorneigung kann durch zwei verschiedene Ursachen ausgelöst werden: Erstens, durch eine gesteigerte Ca^{2+} -Sensitivität des kontraktiven Apparates und zweitens, eine erhöhte Fragilität des Zytoskelettes. cGMP-abhängige Signalmechanismen reduzieren die Ca^{2+} -Sensitivität des kontraktiven Apparates (Shah et al., 1994). Abbildung 4.2.4.1 zeigt, dass die Hyperkontraktorneigung der Kardiomyozyten bei gegebener Ca^{2+} -Überladung unter cGMP geringfügig reduziert ist. Dies könnte auf die beschriebene Ca^{2+} -Desensitivierung zurückzuführen sein. Der Effekt ist aber zu klein, um die beobachtete Protektion durch cGMP zu erklären.

Die beobachtete Reduktion der Hyperkontraktorentwicklung während der Reoxygenation in Gegenwart von erhöhten cGMP-Spiegeln hat demnach seine Ursache nicht in einer verminderten Ansprechbarkeit des kontraktiven Apparates, sondern in der oben beschriebenen Veränderung der zytosolischen Ca^{2+} -Homoöstase.

In unserer Arbeit wurde der zelluläre Mechanismus analysiert, durch den erhöhte cGMP-Spiegel gegen den myokardialen Reperfusionsschaden schützen. Wir verwendeten in unserem Kardiomyozyten-Modell sowohl zellpermeable Substanzen (8-Br-cGMP, 8-pCPT-cGMP) als auch ANP-Rezeptoragonisten (Urodilatin). Urodilatin, als Aktivator der partikulären Guanylylzyklase ist von besonderer

Bedeutung für eine mögliche therapeutische Nutzung dieses Protektionsprinzips, da es nach intravenöser Gabe von geringen Konzentrationen wie z.B. von 50 nM (Ischämie / Reperfusion am Schweinmodell in vivo) zu einer signifikanten Reduktion der Infarktgröße geführt hat (Ferran et al., 2000). Bei systemischer Gabe führen solche Konzentrationen von Urodilatin zu keinen negativen hämodynamischen Nebenwirkungen.

Die Protektion gegen den myokardialen Reperfusionsschaden durch NO-Donatoren, die die lösliche Guanylylzyklase direkt aktivieren, werden kontrovers diskutiert. Es konnte in verschiedenen Arbeiten gezeigt werden (Hoschida et al., 1996; Schlüter et al., 1994), dass durch NO-Donatoren eine Protektion gegen den myokardialen Reperfusionsschaden erzielt werden konnte. Es zeigten aber (Depré et al., 1995; Cope et al., 1997; Brunner et al., 1997), dass auch Inhibitoren der NO-Synthese derartige protektive Effekte erzielen können. Diese Diskrepanz könnte dadurch erklärt werden, dass einerseits NO über cGMP vermittelt wirken kann und auch Sauerstoffradikale abfangen und damit deren negative Wirkungen neutralisieren kann, es sich andererseits aber auch selbst als toxisches Radikal durch die Bildung von Peroxynitrit verhalten kann (Klem et al., 1987; Yasmin et al., 1997). Ein systemischer Einsatz von NO-Donatoren kann sich auch durch den begleitenden Blutdruckabfall und die dadurch bedingte Verschlechterung der Koronarperfusion negativ auf das ischämisch-reperfundierte Myokard auswirken.

Zusammengefasst ist deshalb Urodilatin als Aktivator der partikulären Guanylylzyklase von besonderem therapeutischen Interesse für eine Protektion des ischämisch-reperfundierten Myokardes.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Die Hauptaufgabe der vorliegenden Arbeit war zu klären, welcher zelluläre Mechanismus der cGMP-vermittelten Protektion des Ischämisch-reperfundierten Myokard gegen den akuten Reperfusionsschaden zugrunde liegt.

Unsere Befunde zeigen:

- i) Stimulation von cGMP-Signalwegen während der Reperfusion vermindert die reoxygenationsinduzierte Hyperkontraktur von Herzmuskelzellen.
- ii) Diese Protektion ist auf einen Ca^{2+} -abhängigen Mechanismus zurückzuführen. Erhöhte cGMP-Spiegel führen zur beschleunigten Restitution einer normoxischen Ca^{2+} - Kontrolle im Zytosol sowie zu signifikanter Reduktion der Frequenz und der Amplitude der reoxygenationsinduzierten Oszillationen des zytosolischen Calciums.
- iii) Die Beeinflussung der zellulären Ca^{2+} -Homoöostase in der Reperfusion ist auf eine beschleunigte Rückspeicherung des zytosolischen Calciums ins sarkoplasmatische Retikulum zurückzuführen.
- iv) Erhöhung des zellulären cGMP-Spiegels hat keinen Einfluss auf den zytosolischen pH-Wert von reoxygenierten Herzmuskelzellen.
- v) Die Protektion gegen den myokardialen Reperfusionsschaden kann nicht nur mit den membrangängigen cGMP-Analoga 8-Bromo-cGMP und 8-pCPT-cGMP, sondern auch mit dem ANP-Rezeptoragonisten Urodilatin erzielt werden. Alle diese Substanzen führen in der Reoxygenation zu einer schnelleren Erholung der Herzmuskelzellen von der unter Ischämiebedingungen akkumulierten zytosolischen Calciumüberladung sowie zu einer signifikanten Reduktion von Frequenz und Amplitude der reoxygenationsinduzierten Ca^{2+} -Oszillationen.
- vi) Eine Ca^{2+} - Desensitivierung der Myofilamente unter dem Einfluss von cGMP in anoxisch-reoxygenierten Kardiomyozyten ist nur zu einem geringen Anteil an dem protektiven Effekt von cGMP beteiligt .

7 SUMMARY

The aim of the present study was to investigate the cellular mechanism involved in the cGMP mediated protection of the ischemic-reperfused myocardium against myocardial reperfusion injury.

Our principal findings show:

- i) The stimulation of the cGMP-signaling during reperfusion reduces the reoxygenation-induced hypercontracture of cardiomyocytes.
- ii) The protection of cardiomyocytes against hypercontracture can be attributed to a Ca^{2+} -dependent mechanism. Elevated cGMP levels accelerate the return to normal cytosolic calcium values and significantly reduce the frequency and amplitude of reoxygenation-induced oscillations of cytosolic calcium.
- iii) The recovery of cytosolic calcium during reoxygenation is due to an enhanced uptake of calcium into the sarcoplasmic reticulum.
- iv) Elevation of cGMP levels do not influence the pH_i in reoxygenated cardiomyocytes.
- v) The myocardium can be protected against reperfusion injury not only with cell permeable cGMP analogs such as 8-Br-cGMP and 8-pCPT-cGMP, but also with Urodilatin, an ANP-receptor agonist. During reoxygenation these substances allow for a speedier recovery of the cardiomyocytes from ischemic Ca^{2+} -overload and also lower the frequency and amplitude of Ca^{2+} -oscillations in reoxygenated cardiomyocytes.
- vi) In anoxic-reoxygenated cardiomyocytes, Ca^{2+} -desensitization of the contractile apparatus plays a minor role in the cGMP mediated protection of cardiomyocytes against reoxygenation induced injury.

6 LITERATUR

Agullò L, Garcia-Dorado D, Inserte J et al. (1999). L-Arginine limits myocardial cell death secondary to hypoxia-reoxygenation by a cGMP-dependent mechanism. *Am J Physiol*; 276: H1574-1580.

Allshire A, Piper HM, Cuthbertson KSR, Cobbold PH (1987). Cytosolic free calcium in single rat heart cells during anoxia and reoxygenation. *Biochem J*; 244: 381-385.

Amrani M, Gray CC, Smolenski RT et al. (1997). The effect of L-Arginine on myocardial recovery after cardioplegic arrest and ischemia under moderate and deep hypothermia. *Circulation*; 96: 274-279.

Anderson SE, Murphy E, Steenbergen C, London RE, Cala PM (1990). Na⁺/H⁺ in myocardium: effects of hypoxia and acidification on Na⁺ and Ca²⁺. *Am J Physiol*; 259: C940-948.

Barrabes JA, Garcia-Dorado D, Ruiz-Meana M, Piper HM, Solares J, Gonzales MA, Oliveras J, Pilar Herrejon M, Soler Soler J (1996). Myocardial segment shrinkage during coronary reperfusion in situ. *Pflügers Arch Eur J Physiol*; 431: 519-526.

Borzak S, Kell RA, Krämer BK, Motoba Y, Marsh JD, Reers M (1990). In situ calibration of fura-2 and BCECF fluorescence in adult rat ventricular myocytes. *Am J Physiol*; 259: H973-981.

Brunner F (1997). Interaction of nitric oxide and endothelin-1 in ischemia/ reperfusion injury of rat heart. *J Mol Cell Cardiol*; 29: 2363-2374.

Brusq JM, Mayoux E, guigui L, Kirilovsky J (1999). Effect of C-type natriuretic peptide on rat cardiac contractility. *Br J Pharmacol*; 128 (1): 206-212.

Cope JT, Banks D, Laubach VE, Binns OA, King RC, Richardson RM, Shockey KS, Tribble CG, Kron IL (1997). Sodium nitroprusside exacerbates myocardial ischemia-reperfusion injury. *Ann Thorac Surg*; 64 (6): 1656-1659.

Cordeiro JM, Howlett SE, Ferrier GR (1994). Simulated ischaemia and reperfusion in isolated guinea pig ventricular myocytes. *Cardiovasc Res*; 28: 1794-802.

Dennis SC, Gevers W, Opie LH (1991). Protons in ischemia: Where do they come from; where do they go to?. *J Mol Cell Cardiol*; 23: 1077-1086.

Depre C, Vanoverschelde JL, Goudemant JF, Motte I, Hue L (1995). Protection against ischemic injury by non-vasoactive doses of nitric oxide synthase inhibitors in the perfused rabbit heart. *Circulation*; 92: 1911-1918.

Doering AE, Lederer WJ (1993). The mechanism by which cytoplasmic protons inhibit the sodium-calcium exchanger in guinea-pig heart cells. *J Physiol Lond*; 466: 481-499.

Labiato A, Fabiato F (1978). Effects of pH on the myofilaments and the sarcoplasmic reticulum of skinned cells from cardiac and skeletal muscle. *J Physiol*; 276: 233-255.

Padilla F, Garcia-Dorado D, Agullò L, Barrabes JA, Inserte J, Escalona N, Meyer M, Mirabet M, Pina Pilar, Soler-Soler J (2000). Intravenous administration of the natriuretic peptide urodilatin at low doses during coronary reperfusion limits infarct size in anesthetized pigs. *Cardiovasc Res*; 51: 592-600.

Foster DC, Wedel BJ, Robinson SW, Garbers DL (1999). Mechanism of regulation and function of guanylyl cyclases. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*; 135: 1-39.

Ganote CE (1983). Contraction band necrosis and irreversible myocardial injury. *J Mol Cell Cardiol*; 15: 67-73.

Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY (1985). A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem*; 260: 3440-3450.

Haigney MC, Miyata H, Lakatta EG, Stern MD, Silverman HS (1992). Dependence of hypoxic cellular calcium loading on Na^+ - Ca^{2+} exchange *Circ Res*; 71: 547-557.

Harrison SM, Frampton E, Mc Call E., Boyett MR, Orchard CH (1992). Contraction and intracellular Ca^{2+} , Na^+ and H^+ during acidosis in rat ventricular myocytes. *Am J Physiol*; 262: C348-357.

Hempel A, Friedrich M, Schlüter KD, Forssmann WG, Kuhn M., Piper HM (1997). ANP protect against reoxygenation induced hypercontracture in adult cardiomyocytes. *Am J Physiol*; 42: H244-249.

Hoshida S, Yamashita N, Igarashi J, Nishida M, Hori M, Kuzuya T, Tada M (1996). A nitric oxide donor reverses myocardial injury in rabbits with acute hypercholesterolemia. *J Pharmacol Exp Ther*; 278 (2): 1805-13.

Inserte J, Garcia-Dorado D, Agullò I, Paniagua A, Soler-Soler J (2000). Urodilatin limits acute reperfusion injury in the isolated rat heart. *Cardiovasc Res*; 45: 351-359.

Ito N, Bartunek J, Spitzer KW, Lorell BH (1997). Effect of nitric oxide donor sodium nitroprusside on intracellular pH and contraction in hypertrophied myocytes. *Circulation*; 95: 2303-2311.

Kitakaze M, Weisfeldt ML, Marban E (1988). Acidosis during early reperfusion prevents myocardial stunning in reperfused ferret hearts. *J Clin Invest*; 82: 920-927.

Klem M, Schäfer S, Dahmann R et al. (1987). Nitric oxide induced contractile dysfunction is related to a reduction in myocardial energy generation. *Cardiovasc. Res*; 36: 185-194.

Koop A, Piper HM (1992). Protection of energy status of hypoxic cardiomyocytes by mild acidosis. *J Mol Cell Cardiol*; 24: 55-65.

Ladilov YV, Balsler C, Piper HM (1998). Protection of rat cardiomyocytes against simulated ischemia and reoxygenation by treatment with protein kinase C activator. *Circ Res*; 82: 451-7.

Ladilov Y, Haffner S, Balsler-Schäfer C, Maxeiner H, Piper HM (1999). Cardioprotective effects of KB-R7943: a novel inhibitor of the reverse mode of $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger. *Am J Physiol*; 276: H1868-76.

Ladilov YV, Siegmund B, Balsler C, Piper HM (1997). Simulated ischemia increases the susceptibility of rat cardiomyocytes to hypercontracture. *Circ Res*; 80: 69-75.

Ladilov YV, Siegmund B, Piper HM (1995). Protection of reoxygenated cardiomyocytes against hypercontracture by inhibition of Na^+/H^+ exchange. *Am J Physiol*; 268: H1531-1539.

Leysens A, Nowicky V. A, Patterson L, Crompton M, Duchon R. M (1996). The Relationship between mitochondrial state, ATP hydrolysis, $[\text{Mg}^{2+}]_i$ and $[\text{Ca}^{2+}]_i$ studied in isolated rat cardiomyocytes. *Journal of Physiology*; 496: 111-128.

Li Q, Altschuld RA, Stokes BT (1987) Quantitation of intracellular free calcium in single adult cardiomyocytes by fura-2 fluorescence microscopy: calibration of fura-2 ratios. *Biochem Biophys Res Commun*; 147: 120-126.

Lochner A, Harper IS, Salie R, Genade S, Coetzee AR (1994). Halothane protects the isolated rat myocardium against excessive total intracellular calcium and structural damage during ischemia and reperfusion. *Anesth Analg*; 79: 226-233.

Ludbrook J (1994). Advantages of permutation (randomization) tests in clinical and experimental pharmacology and physiology (1994). *Clin Exp Pharmacol Physiol*; 21 (9): 673-86.

Nakamura A, Harada K, Sugimoto H, Nakajima F, Nishimura N (1998). Effects of KB-R 7943, a novel $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange inhibitor, on myocardial ischemia/reperfusion injury. *Folio Pharmacol Jpn*; 111: 105-115.

Orchard , Kentish (1990). Effects of changes of pH on the contractile function of cardiac muscle. *Am J Physiol*; 258: C967-981.

Owens LM, Fralix TA, Murphy E, Cascio WE, Gettes LS (1996). Correlation of ischemia-induced extracellular and intracellular ion changes to cell-to-cell electrical uncoupling in isolated blood-perfused rabbit hearts. Experimental Working Group. *Circulation*; 94 (1): 10-13.

Pike MM, Luo CS, Clark MD, Kirk KA, Kitakaze M, Madden MC, Cragoe EJ Jr, Pohost GM (1993). NMR measurement of Na^+ and cellular energy in ischemic rat heart: role of Na^+/H^+ exchange. *Am J Physiol*; 265: H2017-2026.

Piper HM, Probst I, Schwartz P, Hutter FJ, Spiekermann PG (1982). Culturing of calcium stable adult cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol*; 14: 397-412.

Saxenhofer H, Fitzgibbon WR, Paul RV (1993). Urodilatin: Binding properties and stimulation of cGMP generation in rat kidney cells. *Am J Physiol*; 264: F267-73.

Schäfer C, Ladilov Y, Inserte J, Schäfer M, Haffner S, Garcia-Dorado D, Piper HM (2001). Role of reverse mode of the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger in reoxygenation-induced cardiomyocyte injury. *Cardiovasc Res*; 51: 241-250.

Schäfer C, Ladilov YV, Siegmund B, Piper HM (2000). Importance of bicarbonate transport for protection of cardiomyocytes against reoxygenation injury. *Am Physiol Heart Circ Physiol*; 278: H1457-63.

Schlack W, Hollmann M, Stunneck J, Thämer V (1996). Effect of halothane on myocardial reoxygenation injury in the isolated rat heart. *Br J Anaesth*; 76: 860-867.

Schlack W, Uebing A, Schäfer M, Bier F, Grunert S, Ebel D, Piper HM, Thämer V (1995). Intracoronary SIN-1C during reperfusion reduces infarct size in dog. *J Cardiovasc Pharmacol*; 25: 424-431.

Schlüter KD, Weber M, Schraven E, Piper HM (1994). NO donor SIN-1 protects against reoxygenation-induced cardiomyocyte injury by a dual action. *Am J Physiol*; 267: H1461-1466.

Schulz-Knappe P, Forssmann K, Herbst F et al. (1988). Isolation and structural analysis of „urodilatin“, a new peptide of the cardiodilatin-(ANP)-family, extracted from human urine. *Klinischer Wochenschr*; 66: 752-759.

Shah AM, Spurgeon HA, Sollott SJ, Talo A, Lakatta EG (1994). 8-Br-cGMP reduces the myofilament response to Ca^{2+} in intact cardiac myocytes. *Circ. Res*; 74: 970-978.

Siegmund B, Klietz T, Piper HM (1991). Temporary contractile blockade prevents hypercontracture in anoxic -reoxygenated cardiomyocytes. *Am J Physiol*; 260: H426-435.

Siegmund B, Koop A, Klietz T, Schwartz P, Piper HM (1990). Sarcolemmal integrity and metabolic competence of cardiomyocytes under anoxia-reoxygenation. *Am J Physiol*; 258: H285-291.

Siegmund B, Ladilov YV, Piper HM (1994). Importance of sodium for recovery of calcium control in reoxygenated cardiomyocytes. *Am J Physiol*; 267: H506-513.

Siegmund B, Zude R, Piper HM (1992) Recovery of anoxic-reoxygenated cardiomyocytes from severe Ca^{2+} -overload. *Am J Physiol*; 263: H1262-1269.

Yasmin W, Strynadka KD, Schulz R (1997). Generation of peroxynitrite contributes to ischemia-reperfusion injury in isolated rat heart. *Cardiovasc Res*; 33: 422-432

8 ERKLÄRUNG

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten 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.“

(Yaser Abdallah)

9 DANKSAGUNG

Herrn Professor Dr. Dr. H. M. Piper danke ich für die Bereitstellung des Themas und des Arbeitsplatzes innerhalb des Physiologischen Institutes, für die gute Betreuung und die hilfreiche Kritik die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Frau Dr. Claudia Schäfer danke ich für die intensive Unterstützung und die nette Betreuung dieser Arbeit und für ihre wertvollen Anregungen.

Für die hervorragende technische Unterstützung möchte ich mich bei Frau Daniela Schreiber bedanken.

Für das nette Arbeitsklima danke ich allen anderen Mitgliedern des Institutes und besonders des Calciumlabors.

Ganz besonderer Dank gilt meiner Frau Stephanie, die mich mit allen Mitteln unterstützt hat, mir immer hilfsbereit zur Seite stand.

Recht herzlich möchte ich mich bei Dr. Matthias Schäfer für die guten Ratschläge bedanken.

9 LEBENS LAUF

Persönliche Angaben:

Name:	Abdallah
Vorname:	Yaser
Adresse:	Crednerstraße 38, 35392 Gießen
Geburtsdatum:	18.11.1970
Geburtsort:	Jabalia / Gazastreifen
Familienstand:	Verheiratet

Schulbildung:

Grundschule, Gazastreifen	1976-1982
Mittelschule, Gazastreifen	1982-1985
Gymnasium, Gazastreifen	1985-1988
Studienkolleg, Hamburg	1992-1993

Studium:

Humanmedizin, Christian-Albrecht-Universität-Kiel	Oktober 1993
Ärztliche Vorprüfung, Christian-Albrecht-Universität-Kiel	März 1996
I. Abschnitt der ärztlichen Prüfung Christian-Albrecht-Universität-Kiel	August 1997
II. Abschnitt der ärztlichen Prüfung Christian-Albrecht-Universität-Kiel	März 1999
III. Abschnitt der ärztlichen Prüfung Justus-Liebig-Universität Gießen	Mai 2000
Doktorarbeit im Physiologischen Institut bei Herrn Prof. Dr. med. Dr. phil. Piper Thema: Die cGMP-vermittelte Protektion gegen die myokardialen Reperfusionsschaden und die Rolle von Urodilatin. Disputation am 10.07.03	Juni 2000

Praktika:

Tätigkeit als Famulus

Kardiologie, El Shifa-Hospital, Gazastreifen	01.09.97 – 15.10.97
Unfallchirurgie, Justus-Liebig-Universität, Gießen	16.02.98 – 26.03.98
Allgemeinmedizinische Praxis, Gazastreifen	15.08.98 – 30.09.98

Praktisches Jahr

Klinikum der Justus-Liebig-Universität: Chirurgie	April – Juli 99
Innere Medizin	August – November 99

