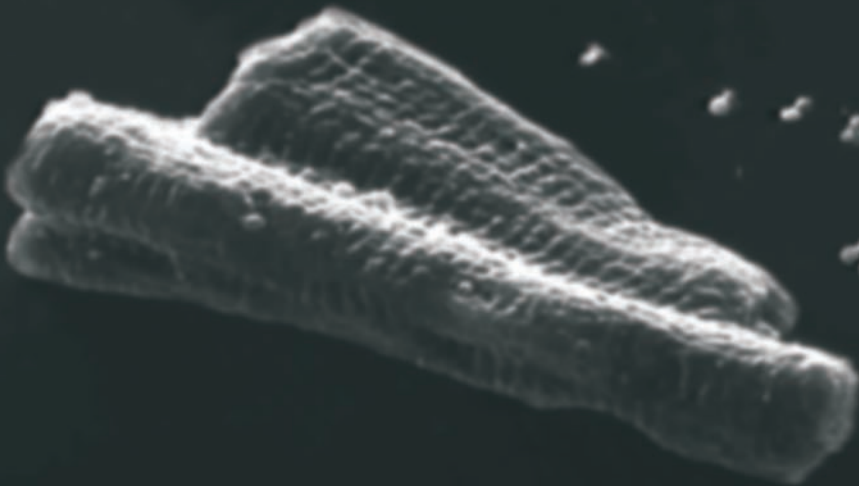


DIE PROTEKTION GEGEN DEN MYOKARDIALEN REPERFUSIONSSCHADEN DURCH AKTIVIERUNG DER LÖSLICHEN GUANYLATZYKLASE

JULIA K. TILLMANN

INAUGURALDISSERTATION

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



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

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 2008

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 2008

© 2008 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



VVB LAUFERSWEILER VERLAG
édition scientifique

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

www.doktorverlag.de

Die Protektion gegen den myokardialen Reperfusionsschaden durch Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase

INAUGURALDISSERTATION

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

vorgelegt von

Julia Kristin Tillmann

aus Marburg

Gießen 2008

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

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

Tag der Disputation: 16.10.2008

Meinen Eltern
Ingrid und Emil Tillmann
gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	6
1.1 Der myokardiale Reperfusionsschaden	6
1.2 Die Rolle der löslichen Guanylatzyklase bei der Protektion gegen den myokardialen Reperfusionsschaden	9
1.3 Ziele der Arbeit	11
2 Material	12
2.1 Chemikalien	12
2.2 Häufig verwendete Medien und Puffer	14
2.2.1 Zellkulturmedien	14
2.2.2 Perfusionsmedien	15
2.3 Geräte und Laborbedarf	17
3 Methoden	20
3.1 Herzmuskelzellisolierung	20
3.1.1 Versuchstiere	20
3.1.2 Präparation der ventrikulären Kardiomyozyten	20
3.2 Zellkultur	21
3.3 Anoxie-Reoxygenationsversuche	21
3.3.1 Versuchsbeschreibung	21
3.3.2 Fluoreszenzmikroskopische Messungen zur Ermittlung der intrazellulären Ionenkonzentration von Ca^{2+}	23
3.3.2.1 Ermittlung der intrazellulären Ca^{2+} - Konzentration mittels des Fluoreszenzfarbstoffes Fura-2 AM und Kalibrierung des Fluoreszenzsignals	23
3.3.3 Experimentelles Protokoll der Anoxie-Reoxygenationsversuche	25
3.3.3.1 Versuchsaufbau der Anoxie-Reoxygenationsversuche	26
3.3.3.2 Messparameter	29
3.4 Bestimmung des cGMP-Spiegels mittels cGMP-Radioimmunoassay	30
3.4.1 Gewinnung der Proben	30
3.4.2 Durchführung des RIA	31
3.5 Statistik	32

4 Ergebnisse	33
4.1 Veränderungen der zytosolischen Calciumkonzentration und der Zelllänge unter simulierter Ischämie (Anoxie) und Reperfusion (Reoxygenation) in Kardiomyozyten	33
4.2 Einfluss von Aktivatoren der löslichen Guanylatzyklase auf die zytosolische Ca ²⁺ -Konzentration und die Zelllänge	35
4.2.1 Beeinflussung der reoxygenationsinduzierten Hyperkontraktur durch Aktivierung der sGC	37
4.2.2 Beeinflussung der reoxygenationsinduzierten Ca ²⁺ -Oszillationen	40
4.3 Die zellulären Mechanismen der sGC-vermittelten Protektion	43
4.3.1 Zelluläre cGMP-Konzentration in Anwesenheit von Aktivatoren der löslichen Guanylatzyklase	43
4.3.2 Die Rolle der cGMP-abhängigen Proteinkinase G (PKG)	45
4.3.2.1 Beeinflussung der reoxygenationsinduzierten Hyperkontraktur	45
4.3.2.2 Beeinflussung der reoxygenationsinduzierten Ca ²⁺ -Oszillationen	47
4.3.3 Beeinflussung der Funktion des sarkoplasmatischen Retikulums durch sGC-Aktivatoren	49
5 Diskussion	52
5.1 Zusammenfassung der Ergebnisse	52
5.2 Der myokardiale Reperfusionsschaden unter simulierten Reperfusionsbedingungen	53
5.3 Protektion gegen den myokardialen Reperfusionsschaden durch sGC - Aktivatoren	54
4.5 Klinische Therapieoptionen	58
6 Zusammenfassung	59
7 Summary	60
8 Literatur	61
9 Erklärung	71

10 Danksagung	72
11 Lebenslauf	73

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ANP	atrial natriuretic peptide
ATP	Adenosintriphosphat
BDM	2,3-Butanedione monoxime
BNP	brain natriuretic peptide
°C	Grad Celsius
ca.	zirka
CaCl ₂	Calciumchlorid
Ca ²⁺	Calciumionen
cGMP	zyklischem 3',5'-Guanosinmonophosphat
cm	Zentimeter
DEA	Deanonoate
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglykol-bis-(-aminoethyl-)tetraacetat
Fura-2 AM	1-(2-(5-Carboxyoxazol-2-yl)-6-aminobenzofuran-5-oxy)-2-(-2'-amino-5'-methylphenoxy)-ethan-N,N,N',N'-tetraacetat
FCS	Fetales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung
GTP	Guanosintriphosphat
H ⁺	Wasserstoffionen
HCO ₃ ⁻	Hydrogencarbonat
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-2-ethansulfonsäure
HMR 1766	5-choro-thiopene-2-sulfonylamino-N-(morpholine-4-sulfonyl)-phenyl-benzamide sodium salt
KCl	Kaliumchlorid
kg	Kilogramm
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
KT 5823	C ₂₉ H ₂₅ N ₃ O ₅
M	Mol/Liter

Abkürzungen

mg	Milligramm
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
min	Minuten
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
N ₂	Stickstoff
Na ⁺	Natriumionen
NaCl	Natriumchlorid
NO	Stickstoffmonoxid
NS 2028	C ₉ H ₅ BrN ₂ O ₃
ONOO ⁻	Peroxinitrit
O ₂	Sauerstoff
p	Signifikanzniveau
pGC	partikuläre Guanylatzyklase
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H ₃ O ⁺ Konzentration
PKG	Proteinkinase G
r. E.	relative Einheiten
RIA	[³ H]-cGMP-Radioimmunassay Kits
s	Sekunde
SEM	Standardabweichung des Mittelwerts
SERCA	SR-Ca-ATPase
SR	sarkoplasmatisches Retikulum
sGC	lösliche Guanylatzyklase
YC1	3-(5'-hydroxymethyl-2'-furyl)-1-benzylindazol

1 Einleitung

1.1 Der myokardiale Reperfusionsschaden

Der akute Myokardinfarkt gehört noch immer zu den führenden Todesursachen in den Industrienationen. Das Akutgeschehen ist vom Verlust der kardialen Pumpfunktion bestimmt, basierend entweder auf dem Ausfall kontraktiles Gewebes oder auf ventrikulären Arrhythmien. Wird die Akutphase überlebt, hängt die langfristige Prognose für den Patienten ganz wesentlich von der Größe der Myokardnarbe und vom postischämischen Remodelling des nichtischämischen Myokards ab. Das schnelle Wiedereröffnen akut verschlossener Koronargefäße ist heute die wirksamste Therapie, einen drohenden Herzinfarkt einzugrenzen. An dem irreversiblen Gewebeuntergang im postischämischen Myokard ist die Ischämie nur zu einem Teil beteiligt. Ein großer Anteil dieser Gewebeerstörung wird durch Mechanismen verursacht, die erst durch die Reperfusion in Gang gesetzt werden (Piper et al., 2004; Garcia-Dorado, 2004). Dieser Gewebeschaden, der erst in der Reperfusionsphase entsteht -und in dieser Phase beeinflussbar ist- wird als „Reperfusionsschaden“ bezeichnet. Nachdem in den Tierversuchen die Existenz des Reperfusionsschadens bereits seit längerem belegt ist, wurde erst kürzlich am Menschen gezeigt, dass der Reperfusionsschaden ein wichtiges therapeutisches Target darstellt (Ramzy et al., 2006). Als morphologisches Korrelat für den Reperfusionsschaden findet man im reperfundierten Myokard hyperkontrahierte Myofibrillen und Rupturen an der Plasmamembran der Herzmuskelzellen. In ischämisch-reperfundierten Herzen wird dieses histologische Bild als „Kontraktionsbandnekrose“ bezeichnet (Ganote, 1983). Diese morphologischen Beobachtungen führen zur Hypothese, dass die Hyperkontraktur von Kardiomyozyten in der Frühphase der Reperfusion der Hauptverursacher der Zellnekrose und somit des frühen myokardialen Reperfusionsschadens ist. Diese Annahme wurde sowohl in vitro als auch in vivo durch Arbeiten des eigenen Institutes und Anderen belegt, u.a. durch Experimente in denen durch eine kurzzeitige pharmakologische Blockade des kontraktiles Apparates mit BDM die Kontraktur von Kardiomyozyten im reperfundierten Gewebe verhindert und nachfolgend die Pumpfunktion verbessert werden konnte (Garcia-Dorado et al.,

1992; Siegmund et al., 1991). Das Ausmaß des Reperfusionsschadens wird massgeblich von den Störungen der zytosolischen Ca^{2+} -Homöostase während der vorangegangenen Ischämie beeinflusst.

Während der Ischämiephase fällt aufgrund des O_2 - Mangels die mitochondriale Atmung aus. Der Energiebedarf wird 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 (Owens et al., 1996), sodass schließlich auch die anaerobe ATP-Produktion gehemmt wird. Dies wiederum führt zu einem Zusammenbruch des transsarkolemmalen Na^+ -Gradienten. Daraufhin wird der $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher der Zellmembran aktiviert, d.h. Na^+ wird aus der Zelle heraus und Ca^{2+} in die Zelle hinein transportiert. Es resultiert eine zytosolische Ca^{2+} -Überladung um mehr als zwei Zehnerpotenzen gegenüber dem normalen Wert in der Diastole. Gleichzeitig wirkt aber die fortschreitende, ischämiebedingte Azidose in gewissen Maßen auch protektiv gegen eine zu starke Aktivierung solcher schädlichen Prozesse, da diese im sauren Milieu verlangsamt sind (Ladilov et al., 1995).

Während der Reperfusion, besonders in der frühen Phase, ist bei der Entstehung des myokardialen Reperfusionsschadens die Störung der zytosolischen Ca^{2+} -Homöostase von besonderer Bedeutung (Piper et al., 2004; Siegmund et al., 1992). Für die Störung der Ca^{2+} -regulierenden Mechanismen in dieser Phase spielt die Ca-ATPase (SERCA) des sarkoplasmatischen Retikulums eine entscheidende Rolle. Zu Beginn der Reperfusion werden in Folge der erneuten Aufnahme mitochondrialer ATP-Produktion die in der Ischämiephase akkumulierten Ca^{2+} -Ionen durch Aktivierung der SR-Ca-ATPase schnell ins sarkoplasmatische Retikulum (SR) zurückgepumpt. Die Speicherkapazität des SR ist jedoch begrenzt, so dass es sofort wieder zu einer Freisetzung von Ca^{2+} aus dem SR kommt. Die repetitive Aufnahme und Freisetzung von Ca^{2+} aus dem SR ist im Zytosol reperfundierter Kardiomyozyten in Form von Ca^{2+} -Oszillationen messbar. Die hierbei auftretenden hohen Ca^{2+} -Spitzenkonzentrationen aktivieren den kontraktilen Apparat in Anwesenheit von ATP und lösen so die Hyperkontraktur aus (Siegmund et al., 1992, 1994; Schäfer et al., 2001). Dies führt zu einer mechanischen Schädigung der Zelle und einer irreversiblen Zellverkürzung. Dabei handelt es sich um eine unkontrollierte Ca^{2+} -

Aktivierung des kontraktiven Apparates (Siegmund et al., 1991), ausgelöst durch die Erholung des Energiestoffwechsels, bei einer weit überhöhten zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration. Diese Hyperkontraktur bleibt in vivo allerdings nicht auf die einzelne Zelle beschränkt, sondern breitet sich als Kontraktionsbandennekrose unter Nachbarzellen aus. Dies geschieht zum Teil rein mechanisch, da eine Zelle die hyperkontrahiert an ihren Nachbarzellen Zerreißen von Zellmembranen verursachen kann. In vivo sowie in vitro haben einige Studien bereits gezeigt, dass eine Protektion gegen den Reperfusionsschaden während der Reperfusion möglich ist. Durch die Gabe von BDM (2,3-Butanedione monoxime) während der Reperfusionphase kann die Hyperkontraktur weitgehend verhindert werden (Siegmund et al., 1991; Garcia Dorado et al., 1992). Ca^{2+} -Oszillationen und Hyperkontraktur können auch durch gleichzeitige Inhibition des Na^+/H^+ -Austauschers und des $\text{Na}^+\text{-HCO}_3^-$ -Kotransporters und die damit verbundene verzögerte pH-Erholung (in der 2. Phase der Ca^{2+} -Erholung) signifikant reduziert werden (Ladilov et al., 1995; Schäfer et al., 2000). Siegmund et al. zeigten 1997, dass sich eine längere Aufrechterhaltung der zytosolischen Azidose während der Reperfusion (in der 1. Phase der Ca^{2+} -Erholung) protektiv auf die Ausbildung der Hyperkontraktur auswirkt. Dabei wird die überschießende Aktivität des sarkoplasmatischen Retikulums durch die niedrigen pH-Werte im Zytosol direkt gehemmt.

1.2 Die Rolle der löslichen Guanylatzyklase bei der Protektion gegen den myokardialen Reperfusionsschaden

Die lösliche Guanylatzyklase ist ein Schlüsselenzym der NO/cGMP-Signaltransduktion, das durch Stickstoffmonoxid (NO) aktiviert wird und durch direkte Anbindung an das Häm-Eisen die Produktion von zyklischem 3',5'-Guanosinmonophosphat (cGMP) einleitet. cGMP ist ein wichtiger „second messenger“ in der Herzmuskelzelle. Durch ihn werden verschiedene Signalwege, wie z.B. die cGMP-abhängige Proteinkinase G (PKG), reguliert und moduliert. Frühere Arbeiten zeigten bereits, dass sich eine Erhöhung des zytosolischen cGMP-Spiegels auf den Reperfusionsschaden bzw. die myokardiale Hyperkontraktur protektiv auswirkt (Schlüter et al., 1994; Schlack et al., 1996 ; Hempel et al., 1997; Amrani et al., 1997; Agulló et al., 1999; Inserte et al., 2000; Abdallah et al., 2005). In Versuchen am Schweineherz führte die Gabe von Urodilatin, einem ANP-Rezeptor-Agonisten während der Reperfusion zu einer signifikanten Abnahme der Infarktgröße (Padilla et al., 2000).

Generiert wird cGMP durch die lösliche (sGC) und die partikuläre Guanylatzyklase (pGC). Diese unterscheiden sich voneinander durch Lokalisation und Aktivierung. Die partikuläre Guanylatzyklase (pGC) liegt in der Plasmamembran und wird durch natriuretische Peptide wie ANP, BNP oder durch welche vom C-Typ aktiviert (D'Souza et al., 2004; Kuhn, 2003; Padayatti et al., 2004). Die lösliche Guanylatzyklase (sGC) befindet sich im Zytosol. Ihre Aktivierung erfolgt durch NO (Padayatti et al., 2004; Pyriochou et al., 2005). In dieser Arbeit liegt das besondere Interesse in der Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase. Man kann eine Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase während der Reperfusion durch NO-Donatoren oder Substrate der NO-Synthase (L-Arginin) erreichen (Saxenhofer et al., 1993; Foster et al., 1999; Brunner et al., 2003). Auch in Tierversuchen mit Schweinen wurde bereits gezeigt, dass die Inhalation von NO kurz vor oder während der Reperfusion die Infarktgröße reduziert sowie die mikrovaskuläre Durchblutung signifikant verbessert (Liu et al. 2007). NO bzw. NO-Donatoren schützen vor dem myokardialen Reperfusionsschaden (Hoschida et al., 1996; Schlüter et al., 1994). Auch in anderen Organen wie z.B. der Leber führt NO zu einer Reduzierung des

Ischämie-Reperfusionsschadens (Duranski et al., 2006). Allerdings gibt es bei der Therapie mit NO oder NO-Donatoren auch Einschränkungen, da NO eine Zunahme des schädlichen Peroxynitrits (ONOO^-) bewirkt (Lipton 1996; Wang et al., 1996). So nimmt man an, dass eine NO-unabhängige direkte Aktivierung der sGC bedeutende therapeutische Vorteile hätte (Evgenov et al., 2006). Langer et al. zeigten 2003 an isolierten Rattenkardiomyozyten u. a., dass durch direkte Aktivierung der sGC mit yc1 (3-(5'-hydroxymethyl-2'-furyl)-1-benzylindazol) die Zellkontraktilität, ähnlich wie nach Gabe von NO-Donatoren, verbessert werden konnte. Ein weiterer direkter Aktivator der sGC ist HMR 1766 (5-choro-thiopene-2-sulfonylamino-N-(morpholine-4-sulfonyl)-phenyl-benzamide sodium salt), entwickelt von Sanofi-Aventis (Frankfurt). An anästhesierten Schweinen führte HMR intravenös injiziert zu einer Senkung des arteriellen Blutdrucks. Am Modell der Endothel-denuierten Rattenaorta induziert HMR eine Vasorelaxation (Schindler et al., 2006). Auch in verschiedenen klinisch – pharmakologischen Studien am Menschen wurde HMR 1766 bereits als Antihypertensivum eingesetzt (Witte et al., 2004).

Um den intrazellulären cGMP-Signalweg zu aktivieren, wurden in dieser Arbeit zwei verschiedene Aktivatoren der sGC eingesetzt. HMR, ein NO-unabhängiger Aktivator der sGC, welcher vorwiegend die oxidierte Form der sGC aktiviert und Deanonoate (DEA) ein konventioneller NO-Donator, der die nicht-oxidierte Form der sGC aktiviert.

1.3 Ziele der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu untersuchen, ob unter Reperusionsbedingungen eine Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase durch die pharmakologisch entwickelte Substanz HMR 1766 und DEA (Deanonoate) stattfindet und wie sich diese auf den myokardialen Reperusionschaden auswirkt. Am Modell isolierter Kardiomyozyten wurde analysiert, ob die Applikation von Aktivatoren der löslichen Guanylatzyklase während der Frühphase der Reoxygenation Einfluss haben auf

- 1) die Entwicklung von Hyperkontraktur,
- 2) die zytosolische Ca^{2+} - Homoöstase
- 3) den cGMP-Spiegel, und
- 4) die Funktion des sarkoplasmatischen Retikulums

2 Material

2.1 Chemikalien

Albumin (aus Rinderserum)	RocheApplied Science, Mannheim
Kollagenase, Typ CLS II,(322U/mg)	Biochrom KG, Berlin
Cystein	Sigma, Taufkirchen
EGTA	Sigma, Taufkirchen
Fura-2AM	Molecular Probes, Leiden, Niederlande
Hepes, Science	Roche Applied, Mannheim
Medium 199	Biochrom, Berlin
N ₂	Messer Griesheim, Krefeld
KT5823	Sigma, Aldrich
Resazurin	Sigma, Taufkirchen
NS 2028	Sigma, Aldrich
Koffein	Sigma, Taufkirchen

Material

[H ³]-cGMP-Radioimmunassay Kits	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
98% Ethanol	Riedel de Haen, Seelze
Szinticocktail	Ultima Gold, Packard, Groningen, Niederlande

2.2 Häufig verwendete Medien und Puffer

2.2.1 Zellkulturmedien

Medium 199-Stammlösung:

Medium 199 EARLE ´S salt	9,6 g
Aqua dest.	1,0 l

CCT/HEPES-Stammlösung:

Medium 199-Stammlösung	1,0 l
HEPES	3,6 g
Kreatin	5,0 mM
Karnitin	2,0 mM
Taurin	5,0 mM

Diese Lösung wurde auf pH 7,4 titriert.

Bestandteile des Vorplattierungsmediums:

CCT/HEPES-Stammlösung +	
FCS	4%(vol/vol)
Penicillin	100 IU/ml
Streptomycin	10 µg/ml

Bestandteile des Ausplattierungsmediums:

CCT/HEPES-Stammlösung +	
Penicillin	100 IU/ml
Streptomycin	10 µg/ml

Alle Medien wurden sterilisiert und bei 4°C aufbewahrt.

2.2.2 Perfusionsmedien

Die in unseren Experimenten verwendeten Perfusionsmedien werden im Folgenden beschrieben.

Normoxische HEPES-gepufferte Tyrode-Lösung (Normoxiemedium):

Zusammensetzung (in mM): NaCl (125,0), KCl (2,6), KH_2PO_4 (1,2), MgSO_4 (1,2), CaCl_2 (1,0), HEPES (25,0), Glucose (2,5)

Die Lösung wird bei 37°C mit 1 N NaOH auf pH 7,4 titriert.

Anoxische HEPES-gepufferte Tyrode-Lösung (Anoxiemedium):

Zusammensetzung (in mM): NaCl (125,0), KCl (2,6), KH_2PO_4 (1,2), MgSO_4 (1,2), CaCl_2 (1,0), HEPES (25,0)

Die Lösung wird bei 37°C mit 1 N NaOH auf pH 6,4 titriert.

Nach der von Allshire et al. (1987) beschriebenen Methode wird das Anoxiemedium autoklaviert. Man setzt der Lösung den Redoxindikator Resazurin (1% vol/vol) und Cystein (5,0 mM) zu. Durch Resazurin färbt sich das Medium blau-lila. Dann begast man solange mit N_2 bis ein Farbumschlag von blau-lila nach rosa stattfindet, also bis sich kein O_2 mehr im Gefäß befindet. Anschließend wird die Tyrode-Lösung mittels dampfdrucktauglicher Gefäße für 40 min bei 2 bar und 120°C autoklaviert.

Lösungen zur Präparation der Herzmuskelzellen:

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), Glucose (11,0 mM)

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

2.3 Geräte und Laborbedarf

Zellkultur und Herzmuskelzellisolierung:

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

Fluoreszenzmessungen:

CCD Camera	TillPhotonics, Gräfelfing
Computer-Software "Tillvision"	TillPhotonics, Gräfelfing
Dichroid-Spiegel und Emissionsfilter	Olympus, Hamburg

Material

Inverses Mikroskop	Olympus, Hamburg
Monochromator	TillPhotonics, Gräfelfing
UV-Lampe	TillPhotonics, Gräfelfing

Anoxie-Reoxygenationsexperimente:

Dampfdruckkochtopf	All American, Canada
Druckstabile Glasgefäße mit verschliessbarem Deckel	Bormioli Rocco, Italien
Edelstahlkapillaren	Alltech, Unterhaching
Gasdichte Schläuche	Kahlensee, Gießen
Gasventile	Kahlensee, Gießen
Peristaltikpumpe	Gilson-Abimed, Langenfeld
Perfusionskammer	Eigenbau, Physiologisches Institut der JLU-Gießen

cGMP-Radioimmunassay:

Cell-Scraper	Greiner, Frickenhausen
Szintival	Vail Pocto/ 6 ml, Pachard, Groningen, Niederlande
β -Counter (1600 TR, Liquid Scintillation Analyzer)	Canbara Packard, Frankfurt

Weitere Geräte:

Glasgeräte	Schott, Mainz
Eppendorf Reaktionsgefäß	Eppendorf, Hamburg
Heizrührer	Jahnke& Kunkel, Staufen
Inkubator	Kendro, Hanau
Perfusionsheizung	Eigenbau, Physiologisches Institut der JLU-Gießen
Pipetten	Eppendorf-Nethler-Hinz, Hamburg
pH-Messgerät	WTW, Weinheim
Wasserbad	Julabo, Seelbach
Wasserdemineralisierungs- anlage	Millipore, Eschborn
Zentrifugen	Heraeus, Hanau

Verbrauchsmaterialien:

Kulturschalen, Falcon 3001	Becton Dickinson, Heidelberg
Pipettenspitzen	Eppendorf-Nethler-Hinz, Hamburg

3 Methoden

3.1 Herzmuskelzellisolierung

3.1.1 Versuchstiere

Im Modell isolierter Kardiomyozyten verwendet man Herzmuskelzellen adulter 200-300g schwerer Wistar Ratten. Diese Ratten werden im Physiologischen Institut gezüchtet und haben freien Zugang zu Nahrung (Altromin) und Wasser.

3.1.2. Präparation der ventrikulären Kardiomyozyten

Die Präparation der Kardiomyozyten wird nach der von Piper et al. (1982) beschriebenen Methode durchgeführt.

Die Ratten werden mit Äther narkotisiert, dann durch Genickbruch getötet. Man öffnet den Thorax, entfernt das Perikard, hebt Herz und Lunge an und trennt diese durch einen Scherenschlag vom Körper. Dann legt man sie zügig in eiskalte isotonische NaCl-Lösung. In der Lösung verbleibend wird das Herz sorgfältig freipräpariert und mit der Aorta in eine Langendorff-Apparatur eingebunden. Blutrückstände, die in den Koronarien verblieben sind, müssen entfernt werden. Dazu wird 2 min lang mit 20 ml Powell – Lösung und anschließend rezirkulär (2 – 3 ml/ min) mit Kollagenasepuffer perfundiert.

Man trennt die Ventrikel von den Atrien und zerkleinert das Gewebe der Ventrikel zuerst mit einem Gewebehacker, dann manuell mit zwei Skalpell. Jetzt wird für 10 min bei 37°C in Rezirkulationspuffer inkubiert. Durch vorsichtiges Auf- und Absaugen mit Hilfe einer 5 ml Pipette verbessert man die Mazeration der Kardiomyozyten. Anschließend wird die Zellsuspension durch ein Nylonnetz mit 0,2 mm Porengröße gefiltert und bei 25 x g für 3 min zentrifugiert um die übrigen Zellaggregate zu entfernen. Mit Powell-Medium, das 200 µM CaCl₂ enthält, nimmt man das entstandene Pellet auf. Es folgt eine weitere Zentrifugation bei 25 x g für 2 min. Die Resuspension der Kardiomyozyten wird, diesmal mit Powell-Medium das 400 µM CaCl₂ enthält, aufgenommen und entsprechend der Anzahl der präparierten Herzen

auf Reagenzgläser, die vorher mit Powell-Medium befüllt werden, verteilt. Dann wird ein weiteres Mal bei 25 x g 1 min lang zentrifugiert und man erhält eine Zellpopulation, die zu 70 – 80 % aus stäbchenförmigen Kardiomyozyten besteht.

3.2 Zellkultur

Über Nacht werden die Kulturschalen mit Vorplattierungsmedium beschickt und vor dem Ausplattieren wieder abgesaugt. Dadurch wird ein besseres Anheften der Kardiomyozyten an die Deckgläschen erreicht. Das zuletzt gewonnene Pellet vermischt man vorsichtig mit Ausplattierungsmedium (25 ml) und verteilt es auf die vorbereiteten Schalen. Es folgt eine vierstündige Anheftungsphase im Brutschrank bei etwa 37°C. Daraufhin werden die Zellen vorsichtig „gewaschen“, d.h. man wechselt das Ausplattierungsmedium. Dabei werden die abgerundeten, nicht haftenden Zellen entfernt. Die Kultur besteht jetzt zu 90 % aus stäbchenförmigen Kardiomyozyten die nach einer Anheftungszeit von 4 Stunden für die Anoxie - Reoxygenationsversuche genutzt werden.

3.3 Anoxie-Reoxygenationsversuche

3.3.1 Versuchbeschreibung

Die mit Kardiomyozyten behafteten Deckgläschen werden gasdicht in eine Perfusionskammer eingebaut. Diese Kammer ist durch Edelstahlkapillaren mit einem Gefäß verbunden, welches je nach Versuchsablauf Anoxie oder Reoxygenationsmedium enthält. Mit Hilfe einer Peristaltikpumpe fließen die Medien mit einer Geschwindigkeit von 0,5 ml/min durch das System und umspülen kontinuierlich die Kardiomyozyten in der Perfusionskammer. Dabei ist zu beachten, dass das anoxische Medium während des kompletten Versuches mit N₂ begast wird, um zu verhindern, dass Sauerstoff in das System eindringt. Die Temperatur in der Perfusionskammer beträgt 37 °C.

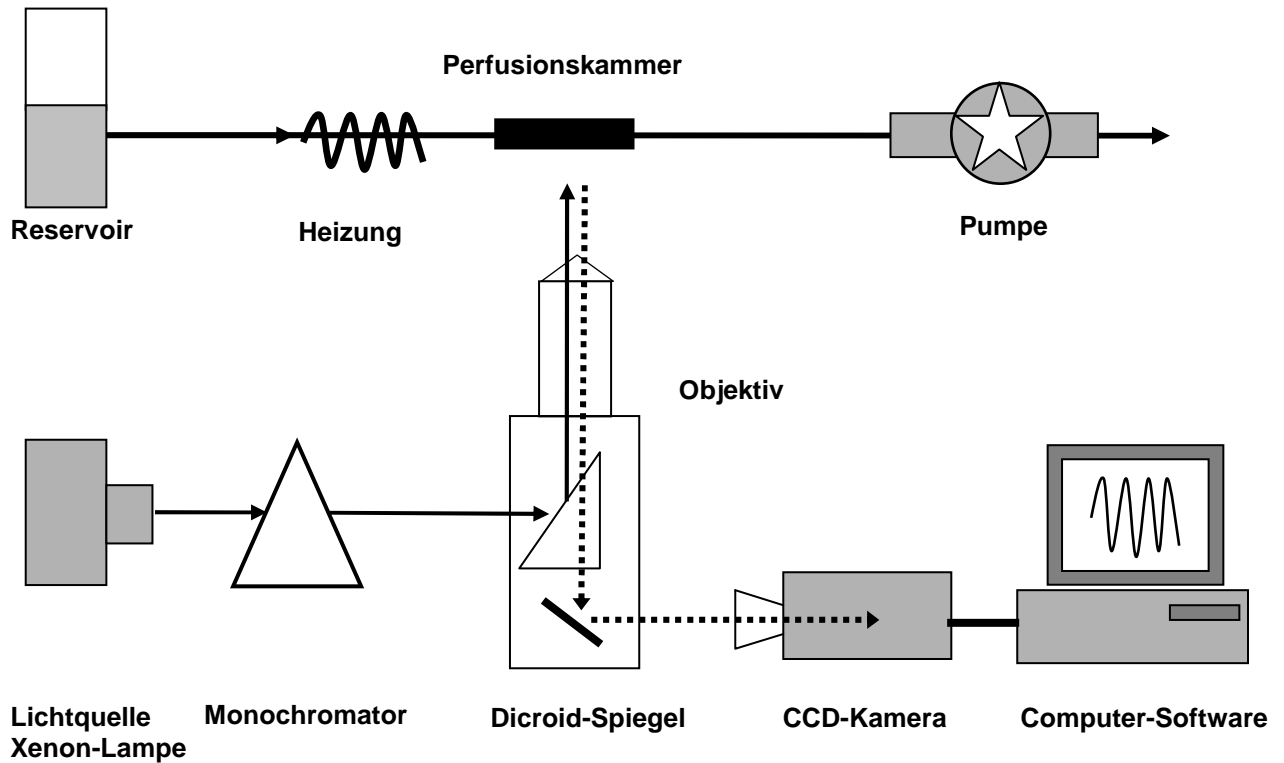


Abb.3.3.1 Vereinfachte schematische Darstellung des Video Imaging Fluoreszenzmikroskops. Der Strahlengang des Anregungslichts ist als durchgezogener, der Strahlengang des Fluoreszenzlichtes als gestrichelter Pfeil dargestellt.

3.3.2 Fluoreszenzmikroskopische Messungen zur Ermittlung der intrazellulären Ionenkonzentration von Ca^{2+}

Die Messungen basieren auf Video Imaging Fluoreszenzmikroskopie. Von einer Xenonlampe generiertes Licht wird durch die Filterfunktion des Monochromators selektiert und einwelliges Licht weitergeleitet. Dieses Licht wird über einen Dichroidspiegel auf die zuvor mit Fluoreszenzfarbstoff beladenen Kardiomyocyten in der Perfusionskammer gerichtet. Dadurch wird der Farbstoff angeregt und das emittierte Licht gelangt durch ein inverses Mikroskop, den Dichroidspiegel und einen Emissionsfilter schließlich zu einer Kamera, die das eintreffende Signal aufzeichnet. Die Daten werden durch das zugehörige Programm „Tillvision“ ausgewertet.

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

Die Ermittlung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration beruht auf Fluoreszenzmikroskopie. Die Kardiomyozyten werden mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 AM (2,5 μM) in Ausplattierungsmedium beladen und 30 min lang bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Dann werden die Zellen vorsichtig in Ausplattierungsmedium weitere 15 min nachinkubiert. Fura-2 AM ist ein Acetoxymethylester der in die Zellen eindringt, dort von intrazellulären Esterasen gespalten wird und dann als geladenes Molekül nicht mehr die Zellmembran durchdringen kann. Die Anregung von Fura-2 AM erfolgt mit den Wellenlängen 340 nm und 380 nm, das Emissionsmaximum liegt bei 510 nm. Die Daten der Fura-2-Messungen werden als Ratio (340nm/380nm) wiedergegeben und die Kalibrierung nach dem von Li et al., (1987) beschriebenen Protokoll durchgeführt.

Als Lösungen werden verwendet:

Kalibrierungslösung (mM): 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 μM), pH 7,4 bei 37°C, titriert mit 1 N KOH.

Die freie zytosolische Ca^{2+} Konzentration wird durch folgende Formel nach Grynkiewicz et al. (1985) ermittelt:

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

Der R_{\max} -Wert (die maximale Ratio) wird bestimmt, indem man zu dem Perfusat 3 mM CaCl_2 hinzugibt. Den R_{\min} -Wert (die minimale Ratio) bestimmt man durch Zufügen von 5 mM EGTA.

- [Ca²⁺]:** Zytosolische Kalziumkonzentration
R: Fura-2-Ratio(340/380 nm)
R_{max}: Maximale Ratio
R_{min}: Minimale Ratio
b: Quotient aus Emissionsintensität der 380 nm Wellenlänge des R_{\min} -Wertes und der Emissionsintensität der 380 nm Wellenlänge des R_{\max} -Wertes
K_d: Maß für die Affinität von Fura-2 zu freien zytosolischen Ca^{2+} -Ionen. Dieser Wert ist abhängig vom pH-Wert. Grynkiewicz et al. bestimmten 1985 in vitro einen K_d -Wert für Fura-2 von 224 nM. Entsprechend verschiedener pH-Werte konnten in Kardiomyozyten folgende Werte ermittelt werden:

pH-Wert	7,15	6,5
K _d -Wert	312± 9 nM	337±4 nM

(nach Ladilov et al., 1997)

3.3.3 Experimentelles Protokoll der Anoxie-Reoxygenationsversuche

In den durchgeführten Versuchen wurden Ischämie und Reperfusion simuliert. Die mit Fura-2 AM beladenen Kardiomyozyten wurden zuerst 40 – 70 min anoxisch mit einer Hepes gepufferten Tyrode-Lösung bei einem pH-Wert von 6,4 perfundiert und anschließend 15 min lang bei einem pH-Wert von 7,4 reoxygeniert. Die nachfolgende Tabelle zeigt die verwendeten Substanzen und die eingesetzten Konzentrationen.

Substanz	Konzentrationen	Eigenschaften
HMR 1766	1 μ M	Aktivator der sGC, führt zur Erhöhung des cGMP-Spiegels
Deanonoate (NO-Donator)	1 μ M	Aktivator der sGC, führt zur Erhöhung des cGMP-Spiegels
NS 2028	1 μ M	Inhibitor der sGC
KT 5823	1 μ M	Inhibitor der cGMP-abhängigen Kinase (PKG)

3.3.3.1 Versuchsaufbau der Anoxie-Reoxygenationsversuche

Versuchsreihe HMR 1766 mit NS 2028

Kontrolle

Normoxie (5 min)	Anoxie (60 min)	Reoxygenation (15 min)
------------------	-----------------	------------------------

HMR 1766

HMR (1 μ M)



Normoxie (5 min)	Anoxie (60 min)	Reoxygenation (15 min)
------------------	-----------------	------------------------

NS 2028

NS (1 μ M)



Normoxie (5 min)	Anoxie (60 min)	Reoxygenation (15 min)
------------------	-----------------	------------------------

NS 2028/HMR 1766

NS (1 μ M) HMR (1 μ M)



Normoxie (5 min)	Anoxie (60 min)	Reoxygenation (15 min)
------------------	-----------------	------------------------

Versuchsreihe DEA mit NS 2028

Kontrolle

Normoxie (5 min)	Anoxie (60 min)	Reoxygenation (15 min)
------------------	-----------------	------------------------

DEA

DEA (1 μ M)



Normoxie (5 min)	Anoxie (60 min)	Reoxygenation (15 min)
------------------	-----------------	------------------------

NS 2028

NS (1 μ M)



Normoxie (5 min)	Anoxie (60 min)	Reoxygenation (15 min)
------------------	-----------------	------------------------

NS 2028 / HMR 1766

NS (1 μ M) DEA (1 μ M)



Normoxie (5 min)	Anoxie (60 min)	Reoxygenation (15 min)
------------------	-----------------	------------------------

Versuchsreihe KT 5823 mit HMR 1766

Kontrolle

Normoxie (5 min)	Anoxie (60 min)	Reoxygenation (15 min)
------------------	-----------------	------------------------

HMR 1766

HMR (1 μ M)



Normoxie (5 min)	Anoxie (60 min)	Reoxygenation (15 min)
------------------	-----------------	------------------------

KT 5823

KT (1 μ M)



Normoxie (5 min)	Anoxie (60 min)	Reoxygenation (15 min)
------------------	-----------------	------------------------

KT 5823 / HMR 1766

KT (1 μ M) HMR (1 μ M)



Normoxie (5 min)	Anoxie (60 min)	Reoxygenation (15 min)
------------------	-----------------	------------------------

Versuchsreihe KT 5823 mit DEA

Kontrolle

Normoxie (5 min)	Anoxie (60 min)	Reoxygenation (15 min)
------------------	-----------------	------------------------

DEA

DEA (1 μ M)



Normoxie (5 min)	Anoxie (60 min)	Reoxygenation (15 min)
------------------	-----------------	------------------------

KT 5823

KT (1 μ M)



Normoxie (5 min)	Anoxie (60 min)	Reoxygenation (15 min)
------------------	-----------------	------------------------

KT 5823 / DEA

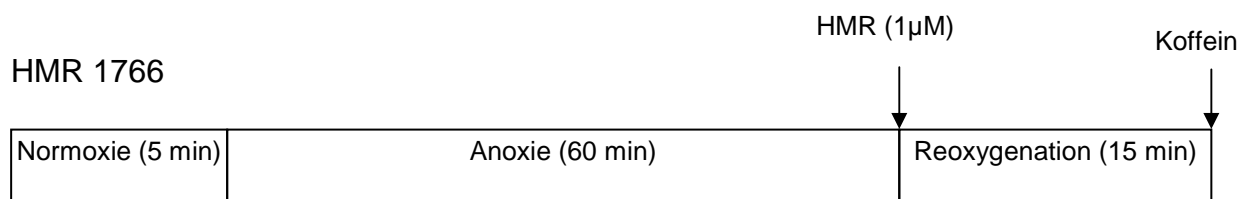
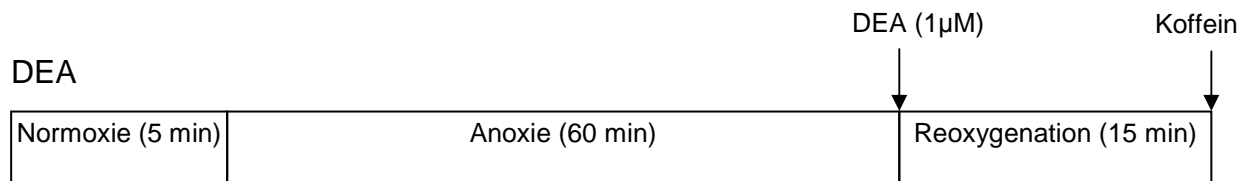
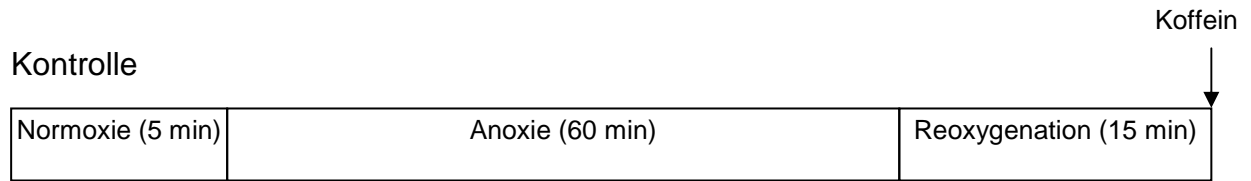
KT (1 μ M)

DEA (1 μ M)



Normoxie (5 min)	Anoxie (60 min)	Reoxygenation (15 min)
------------------	-----------------	------------------------

Versuche mit Koffein



3.3.3.2 Messparameter

Die folgenden Parameter wurden in den Experimenten bestimmt:

Parameter	Einheit	Methode
Zytosolischer Ca^{2+} -Gehalt	"relative Einheiten" (r.E.) der Fura-2-Ratio oder als Absolutwerte	Fluoreszenzmikroskopie (Fura-2)
"Diastolische" und "Systolische" Ca^{2+} Werte	Maximalwerte und Minimalwerte der Oszillationen in r.E. der Fura-2-Ratio	Fluoreszenzmikroskopie (Fura-2)
Ca^{2+} -Oszillationen	Anzahl der Oszillationen/ min	Fluoreszenzmikroskopie (Fura-2)
Zelllänge	Zelllänge in % bezogen auf die Endanoxischezelllänge	Zelllängenmessung
Rigorzeitpunkt (Zeitpunkt des Rigoreintritts)	Zeitdifferenz (min) zwischen Anoxiebeginn und Rigoreintritt	Zeitmessung

3.4 Bestimmung des cGMP - Spiegels mittels cGMP - Radioimmunoassay

Mit Hilfe dieser Methode wird die Bildung des intrazellulären „second messenger“ cGMP bestimmt. cGMP wird bei der Umwandlung von GTP in cGMP in der Zelle gebildet (Löffler et al., 1998). Der cGMP- Spiegel der Zellen wird durch Verwendung eines [³H]-cGMP-Radioimmunassay Kits (RIA; Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) bestimmt.

3.4.1 Gewinnung der Proben

Es werden Ischämie-Reoxygenationsversuche durchgeführt und zu festgelegten Zeitpunkten (Normoxie, 30 und 60 min Ischämie, 15 min Reoxygenation unter Kontrollbedingungen und nach Reoxygenation in Anwesenheit von DEA bzw. HMR) werden die Experimente gestoppt und die Schalen entnommen. Die jeweilige Lösung abgesaugt und 500 µl eiskaltes 98 % Ethanol auf die Zellen pipettiert. Anschließend werden die Zellen durch Lagern in flüssigem Stickstoff für 30 Sekunden schockgefroren, dann auf der Handfläche wieder aufgetaut und mit einem Cell-Scraper sorgfältig abgeschabt. Das Zelllysat wird in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und dann die Zellschale noch einmal mit 250 µl Ethanol gespült, um sicher zu gehen, dass alle Zellen überführt werden. Das so gewonnene Zelllysat wird bei 12000 rpm 2 min lang zentrifugiert und der Überstand in ein weiteres 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß transportiert. In diesem Überstand befindet sich das zu messende cGMP, das durch Verdampfen des Ethanols bei 30°C in einem Heizblock über Nacht von diesem getrennt und dann als Probe in dem RIA weiterverarbeitet.

3.4.2 Durchführung des RIA

Alle der oben genannten Substanzen sind in dem [³H]-cGMP-RIA-KIT enthalten. Zunächst wird gemäß Protokoll aus der 8 pmol/l enthaltenen cGMP-Standardlösung eine Verdünnungsreihe angefertigt, sodass sich cGMP-Lösungen der Konzentrationen 8 pmol/l, 4 pmol/l, 2 pmol/l, 1 pmol/l, und 0,5 pmol/l ergeben. Aus dieser Verdünnungsreihe werden jeweils zwei Eppendorfgefäße mit 50 µl der Standard-Lösung und je zwei mit 50 µl Puffer- bzw. Blanklösung befüllt. Sobald der Alkohol vollständig verdunstet ist, gibt man auf jede Probe noch 50 µl destilliertes Wasser und vortext die Eppendorfgefäße gründlich. Dieser Ansatz sollte während des gesamten Versuches im Eisbad stehen. In jedes Eppendorfgefäß werden je 25 µl Anti-cGMP-Antiserum und [³H]-cGMP hinzupipettiert, dann für wenige Sekunden gevortext und in einem Eisbad für 90 min im Kühlschrank (+4°C) aufbewahrt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wird jedes Eppendorfgefäß mit 500 µl eiskaltem, dem RIA-Kit entnommenen Ammoniumsulfat befüllt, kurz gevortext und für 5 min zurück ins Eisbad gestellt. Danach werden die Ansätze für 90 Sekunden bei 12.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird komplett abgesaugt und verworfen. Das Pellet wird mit 550 µl destilliertem Wasser resuspendiert. Von dieser Suspension werden 500 µl in ein Szintivial überführt, und mit 4 ml Szinticocktail aufgefüllt. Die Szintivials können nun im β-Counter gemessen werden. Aus den Messergebnissen für die cGMP-Standards (0,5 pmol/l bis 8 pmol/l) wird gemäß der Anleitung des Kits eine Eichgerade berechnet, von der die cGMP-Konzentrationen der Proben abgelesen werden können. Für die verschiedenen Messreihen werden jeweils eigene Eichgeraden angefertigt.

3.5 Statistik

Die Ergebnisse der Daten werden als Mittelwerte +/- SEM von n verschiedenen Experimenten wiedergegeben.

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

4 Ergebnisse

4.1 Veränderungen der zytosolischen Calciumkonzentration und der Zelllänge unter simulierter Ischämie (Anoxie) und Reperfusion (Reoxygenation) in Kardiomyozyten

Während der ischämischen Phase von 60 min kommt es nach etwa 15 bis 20 min zu einer Zellverkürzung auf ca. 70 % ihrer Ausgangslänge (siehe Abb. 4.1 oben). Das Auftreten dieser Zellverkürzung korreliert mit dem Abbau energiereicher Phosphate wie ATP und Phosphokreatin (Siegmond et al., 1990) und wird als Rigorkontraktur bezeichnet. Bei längerem Andauern der ischämischen Phase kommt es durch den ATP-Mangel zur Inaktivierung der $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$. Dadurch bricht der transsarkolemnale Na^+ -Gradient zusammen und die Aktivierung des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers führt zu einer zytosolischen Ca^{2+} -Überladung. Die Fura-2-Ratio steigt bis auf einen Wert von $2 \pm 0,4$ r. E. ($n=12$) an. Dies entspricht einer zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration von $1,88 \pm 0,05 \mu\text{M}$ ($n=12$).

Während der 20 minütigen Reoxygenation entwickelt sich durch Ca^{2+} -Verschiebungen zwischen dem Zytosol und dem sarkoplasmatischen Retikulum eine Hyperkontraktur. Die Zellen verkürzen sich auf etwa 30 % ihrer Ausgangslänge (siehe Abb.4.1oben). Es kommt während der Reoxygenation zur kompletten Erholung des zytosolischen Ca^{2+} -Spiegels. Diese verläuft in 3 Phasen. In Phase 1 kommt es zu einer schnellen Abnahme der Ca^{2+} -Konzentration, die durch die Aufnahme von Ca^{2+} ins sarkoplasmatische Retikulum bedingt ist. In Phase 2 treten hochfrequente Oszillationen, die Calciumspitzenkonzentrationen des Zytosols darstellen, auf. Diese Oszillationen nehmen nun in der dritten Phase an Frequenz und Amplitude ab und die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration nähert sich wieder normoxischen Werten (siehe Abb. 4.1 oben). Die folgende Abbildung veranschaulicht im unteren Teil den zytosolischen Ca^{2+} -Verlauf von Kardiomyozyten während der Reoxygenation unter Kontrollbedingungen. Man erkennt den dreiphasigen Verlauf der Ca^{2+} -Erholung mit Ausbildung hochfrequenter Ca^{2+} -Oszillationen. Der obere Teil zeigt die zugehörigen Bilder von Kardiomyozyten bei Normoxie, Ischämie (nach

Rigoreintritt) und in der Reoxygenationsphase. Zu beachten ist die massive Zellverkürzung in der Reperfusion (Hyperkontraktur).

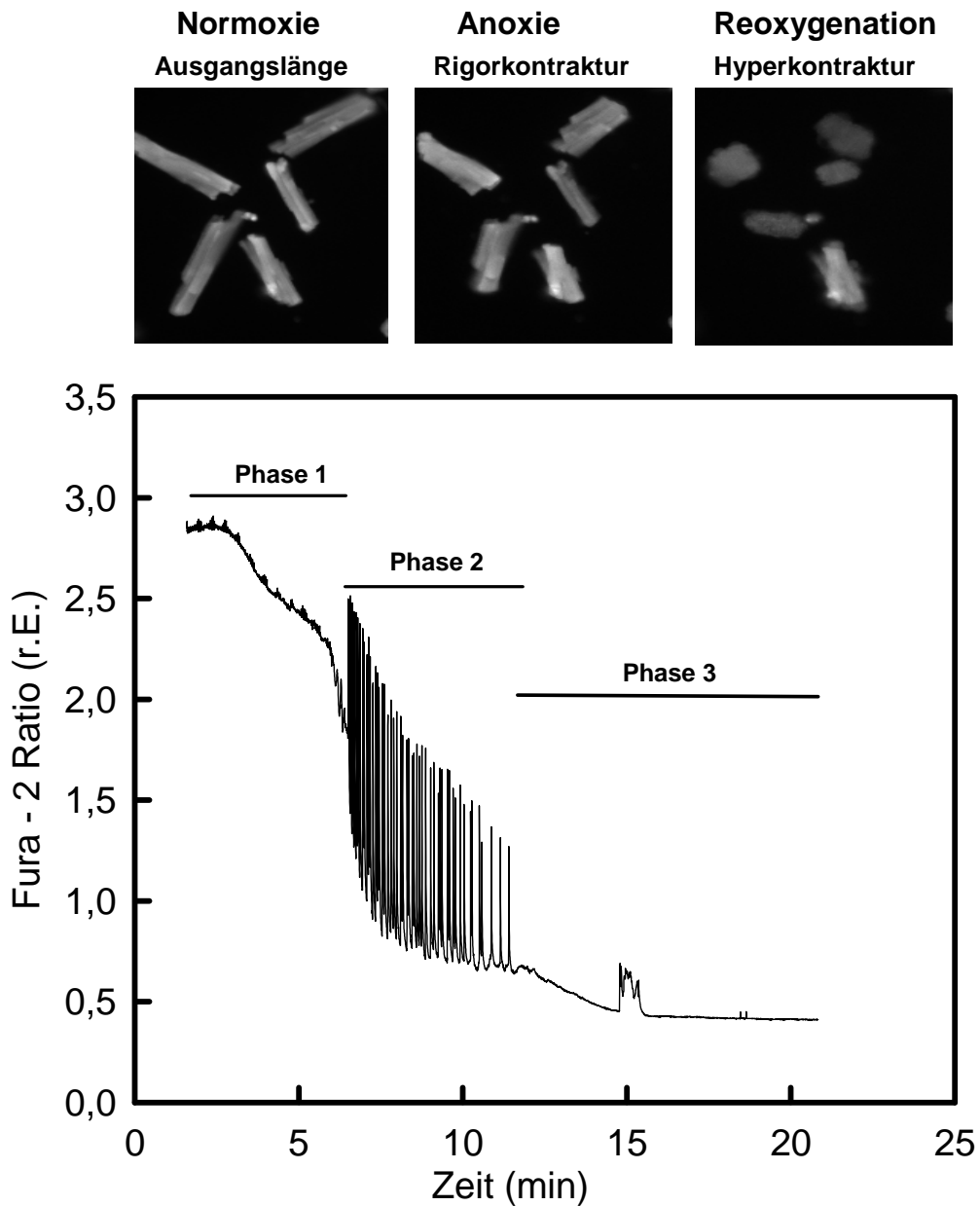


Abb. 4.1

Oben: Repräsentative Bilder von Kardiomyozyten während Normoxie, Anoxie und in der Reoxygenationsphase unter Kontrollbedingungen.

Unten: Exemplarischer Ca^{2+} -Verlauf während der Reoxygenation unter Kontrollbedingungen.

4.2 Einfluss von Aktivatoren der löslichen Guanylatzyklase auf die zytosolische Ca²⁺-Konzentration und die Zelllänge

Die lösliche Guanylatzyklase wird durch NO bzw. NO-Donatoren aktiviert. Eine direkte Aktivierung der sGC kann aber auch durch HMR, ein synthetisch hergestellter Aktivator der löslichen Guanylatzyklase, erzielt werden. In einer Reihe von Experimenten wurde der Einfluss von DEA, einem NO-Donator auf den myokardialen Reperfusionsschaden im Vergleich zu HMR, einem direkten Agonisten der sGC ermittelt und durch deren Hemmung untersucht, ob dieser Einfluss tatsächlich auf die Aktivierung der sGC zurückzuführen ist. Die folgende Abbildung veranschaulicht die Veränderungen der zytosolischen Ca²⁺-Konzentration und die Veränderungen der Zelllänge unter simulierter Ischämie und Reperfusion bei Anwesenheit von HMR. Unter Einfluss von HMR blieb die Ausbildung von Oszillationen und Hyperkontraktur aus.

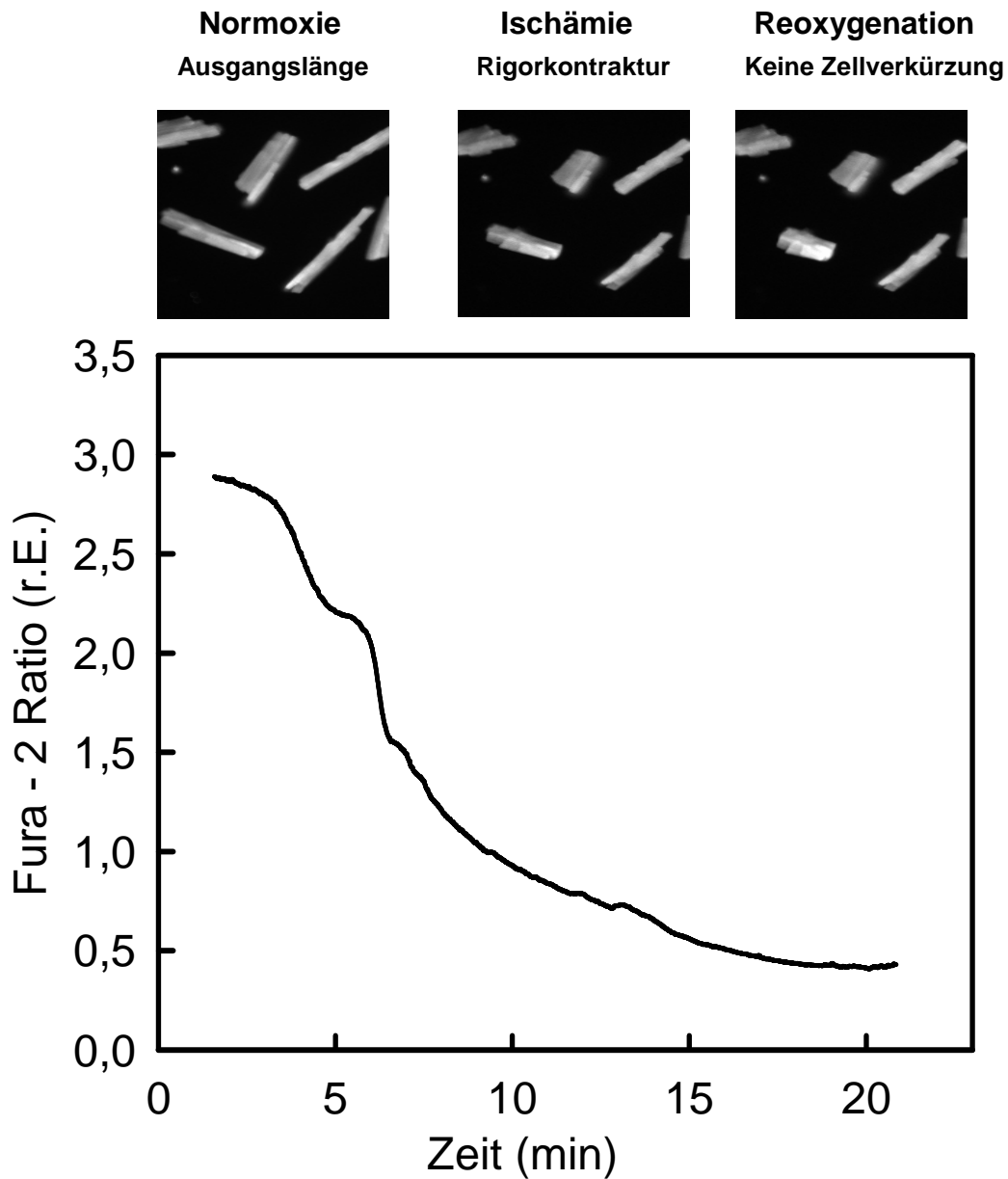


Abb. 4.2

Oben: Repräsentative Bilder von Kardiomyozyten während Normoxie, Ischämie und Reoxygenationsphase in Anwesenheit von HMR.

Unten: Exemplarischer Ca^{2+} -Verlauf während der Reoxygenation in Anwesenheit von HMR, einem direkten Aktivator der sGC.

4.2.1 Beeinflussung der reoxygenationsinduzierten Hyperkontraktur durch Aktivierung der sGC

Die folgende Abbildung (Abb. 4.2.1.1) zeigt die Zellverkürzung nach 5 – 10 minütiger Reoxygenation. Unter Kontrollbedingungen haben sich die Kardiomyozyten bereits auf 60 % ihrer endanoxischen Länge verkürzt und entwickeln demnach eine massive Hyperkontraktur. Bei Anwesenheit von Aktivatoren der sGC war diese Zellverkürzung signifikant reduziert. Durch eine Reihe von weiteren Experimenten wurde gezeigt, dass der protektive Effekt von DEA (Abb. 4.2.1.2) und HMR (Abb. 4.2.1.3) gegen die Hyperkontraktorentwicklung durch Zugabe von NS 2028, einem Inhibitor der löslichen Guanylatzyklase, aufgehoben werden konnte. In den beiden Versuchsreihen wurde NS 2028 (1 μ M) 5 min vor Reperfusionbeginn eingewaschen. Die Zugabe von HMR (1 μ M) bzw. DEA (1 μ M) erfolgte mit Beginn der Reoxygenation. Wie in den folgende Abbildungen ersichtlich (Abb. 4.2.1.2 und Abb. 4.2.1.3) zeigt NS 2028 (1 μ M) keinen signifikanten Unterschied zur Kontrolle.

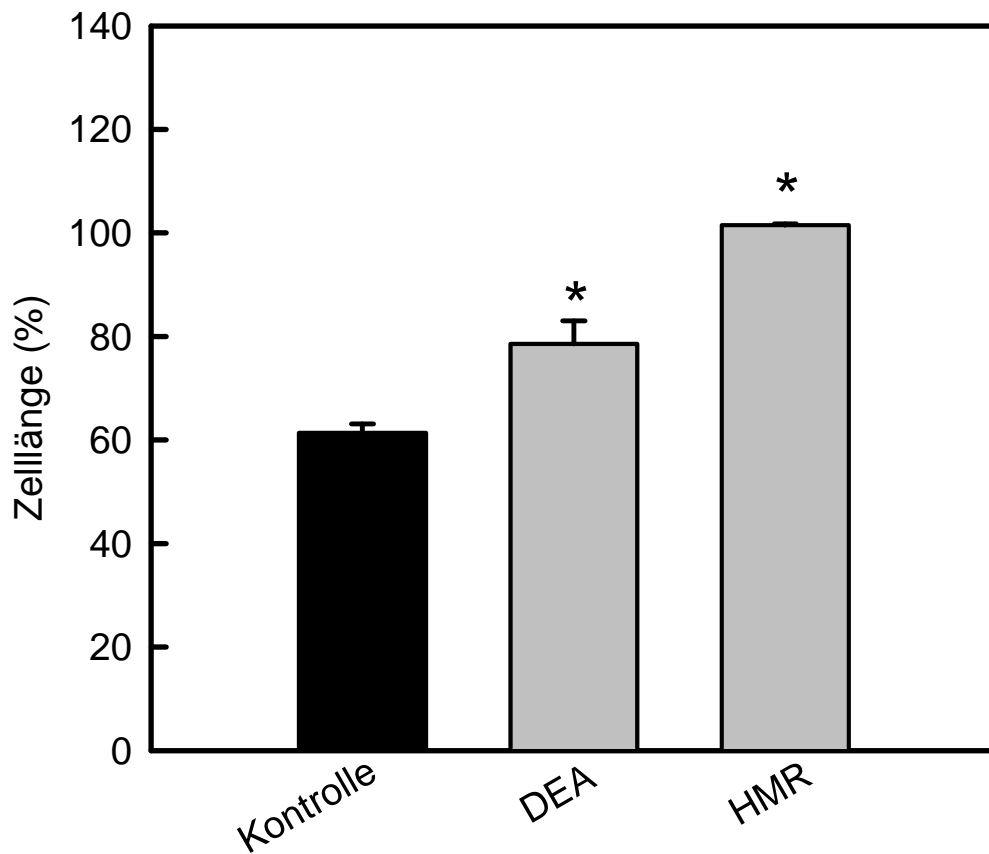


Abb. 4.2.1.1 Zelllänge in % der endanoxischen Länge nach 10 minütiger Reoxygenation unter Kontrollbedingungen und in Gegenwart von DEA (1 μ M) oder HMR 1766 (1 μ M). Die Daten sind dargestellt als Mittelwerte \pm SEM (n = 15 Zellen je Bedingung aus 6 verschiedenen Präparationen, * p < 0,05 versus Kontrolle).

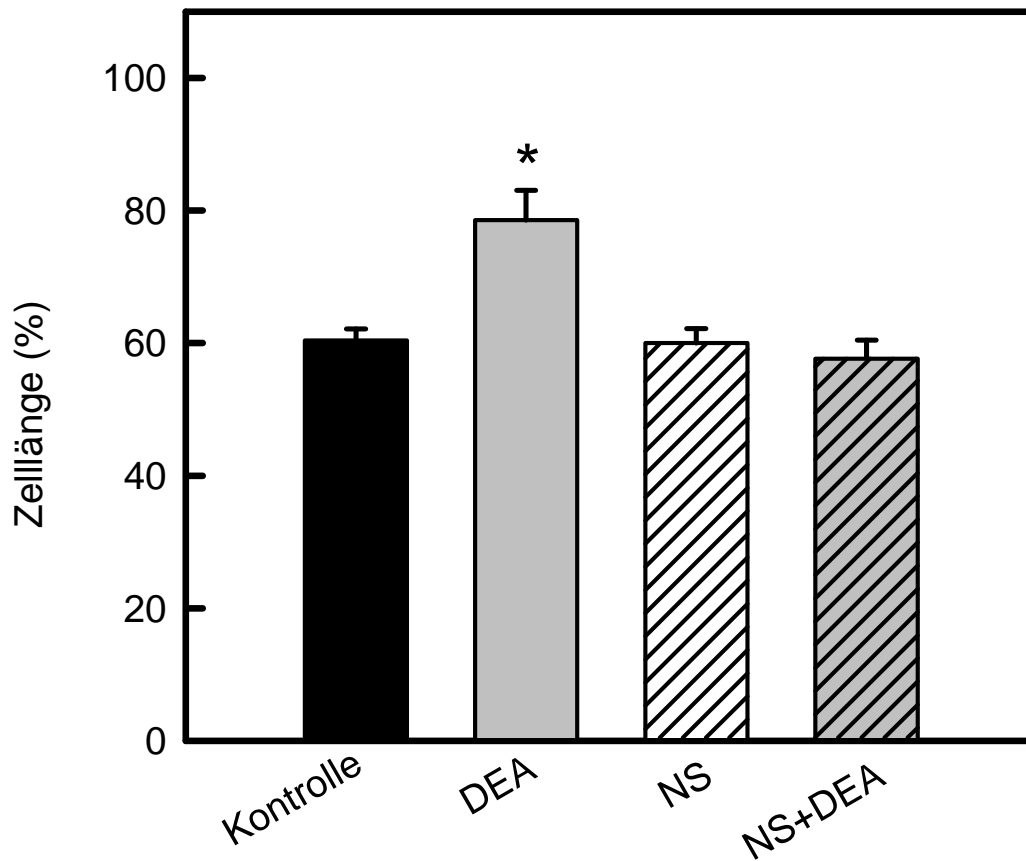


Abb. 4.2.1.2 Zelllänge in % der endanoxischen Länge nach 10 minütiger Reoxygenation bei Anwesenheit von DEA (1 μ M), NS 2028 (1 μ M) oder DEA (1 μ M) und NS 2028 (1 μ M) im Vergleich zur Kontrolle. Die Daten sind dargestellt als Mittelwerte \pm SEM (n = 15 Zellen je Bedingung aus 6 verschiedenen Präparationen, * p < 0,05 versus Kontrolle).

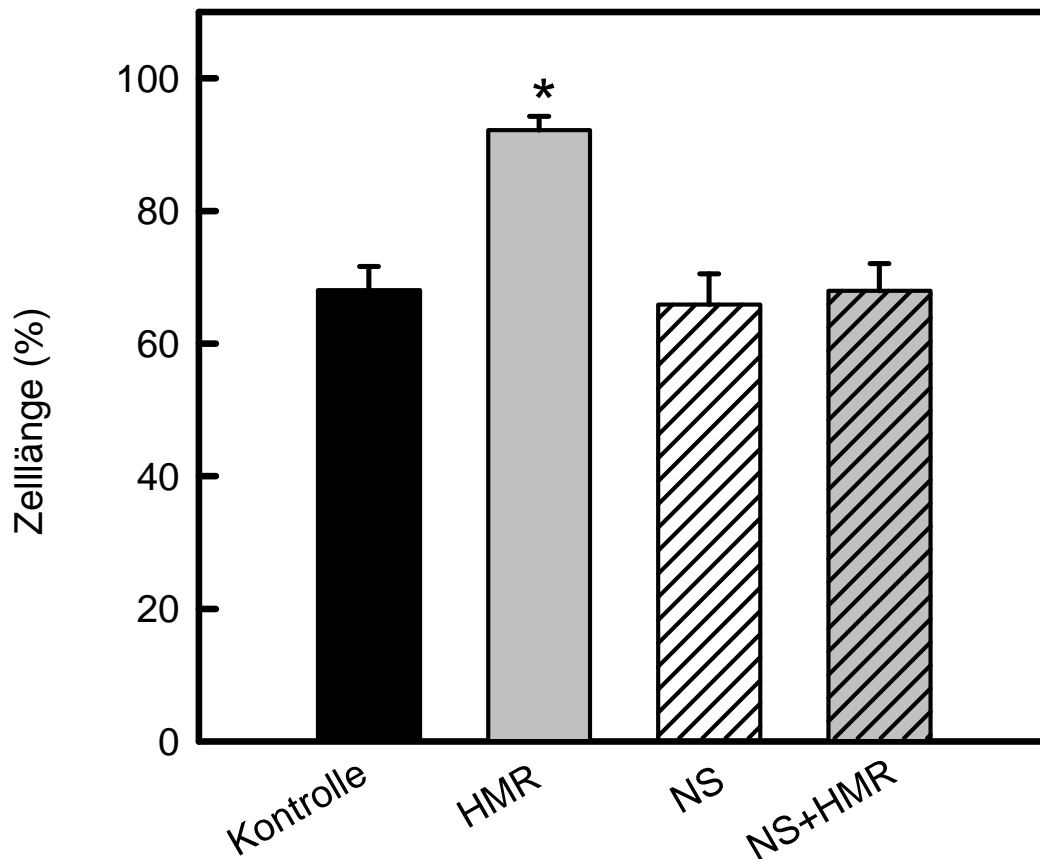


Abb. 4.2.1.3 Zelllänge in % der endanoxischen Länge nach 10 minütiger Reoxygenation bei Anwesenheit von HMR 1766 (1 μ M), NS 2028 (1 μ M) oder HMR 1766 (1 μ M) und NS 2028 (1 μ M) im Vergleich zur Kontrolle. Die Daten sind dargestellt als Mittelwerte \pm SEM (n = 25 Zellen je Bedingung aus 6 verschiedenen Präparationen, * p < 0,05 versus Kontrolle).

4.2.2 Beeinflussung der reoxygenationsinduzierten Ca²⁺-Oszillationen

Der beschriebene Schutz gegen die Hyperkontraktur durch DEA und HMR war von einer starken Reduktion der Frequenz der zytosolischen Ca²⁺-Oszillationen begleitet. Wie in Abbildung 4.2.2.1 veranschaulicht, wurden die Ca²⁺-Oszillation nach 5-10 minütiger Reoxygenation in Gegenwart von DEA oder HMR im Vergleich zur Kontrolle signifikant reduziert. Bei den folgenden Versuchsreihen wurde die sGC mit NS 2028 (1 μ M) gehemmt und der Effekt von HMR (1 μ M) oder DEA (1 μ M) in der Reperfusion untersucht. Bei Hemmung der löslichen Guanylatzyklase durch NS 2028 konnte ebenfalls die Abnahme der Oszillationsfrequenz durch DEA (Abb. 4.2.2.2)

und HMR (Abb. 4.2.2.3) aufgehoben werden, wobei die Gabe von NS 2028 allein keinen Unterschied zur Kontrolle zeigte; d.h. NS 2028 hatte keinen eigenen unspezifischen Effekt auf die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration während der Reperfusion. Damit bestätigt sich, dass dieser protektive Effekt ebenfalls über die Aktivierung der sGC ausgelöst wurde.

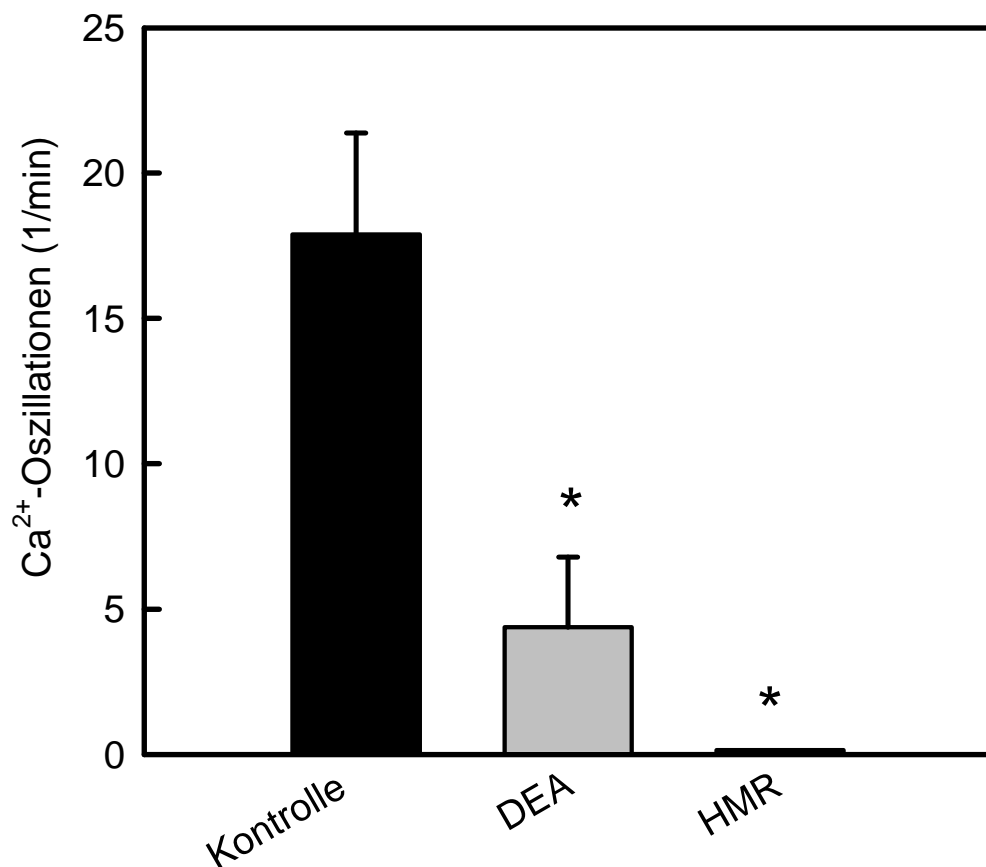


Abb. 4.2.2.1 Einfluss von DEA (1 μM) und HMR 1766 (1 μM) auf die Frequenz der zytosolischen Ca^{2+} -Oszillationen nach 10 minütiger Reoxygenation im Vergleich zur Kontrolle. Die Daten sind dargestellt als Mittelwerte \pm SEM (n = 15 Zellen je Bedingung aus 6 verschiedenen Präparationen, * p < 0,05 versus Kontrolle).

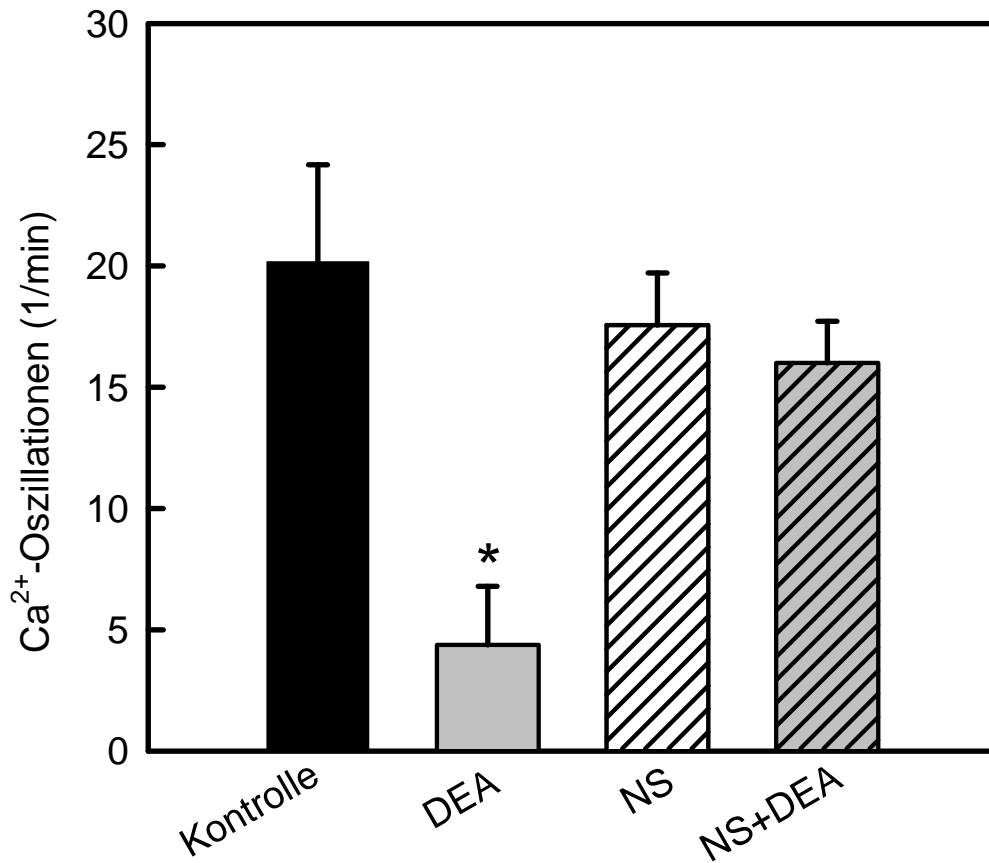


Abb.4.2.2.2 Ca²⁺-Oszillationen (1/min) nach 10 minütiger Reoxygenation bei Anwesenheit von DEA (1µM), NS 2028 (1µM) oder DEA (1µM) und NS 2028 (1µM) im Vergleich zur Kontrolle. Die Daten sind dargestellt als Mittelwerte +/- SEM (n = 25 Zellen je Bedingung aus 6 verschiedenen Präparationen, * p < 0,05 versus Kontrolle).

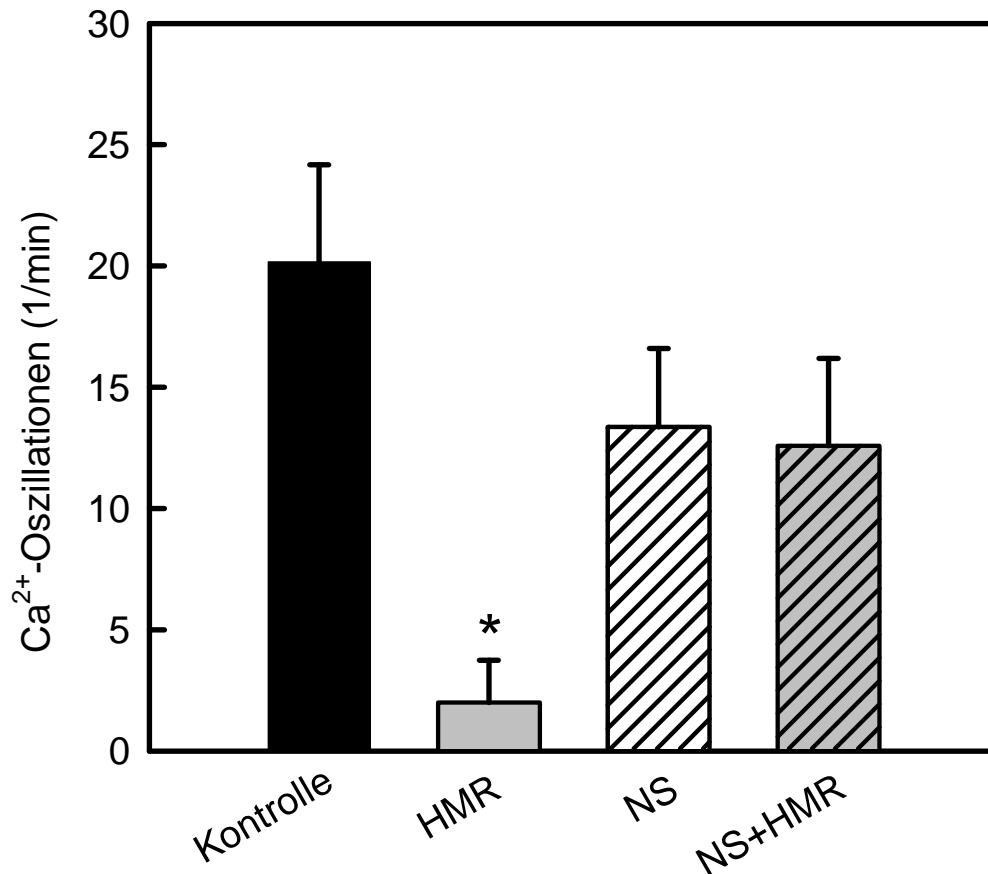


Abb.4.2.2.3 Ca²⁺-Oszillationen (1/min) nach 10 minütiger Reoxygenation bei Anwesenheit von HMR 1766 (1µM), NS 2028 (1µM) oder HMR 1766 (1µM) und NS 2028 (1µM) im Vergleich zur Kontrolle. Die Daten sind dargestellt als Mittelwerte +/- SEM (n = 25 Zellen je Bedingung aus 6 verschiedenen Präparationen, * p < 0,05 versus Kontrolle).

4.3 Die zellulären Mechanismen der sGC-vermittelten Protektion

4.3.1 Zelluläre cGMP-Konzentration in Anwesenheit von Aktivatoren der löslichen Guanylatzyklase

Wie gezeigt wurde, schützen HMR und DEA durch die Aktivierung der sGC in reperfundierten Kardiomyozyten vor der Ausbildung von Ca²⁺-Oszillationen und Hyperkontraktur. Die Aktivierung der sGC führt zu einer Erhöhung des zytosolischen cGMP-Spiegels. In einer Reihe von Experimenten wurde der Einfluss von HMR bzw. DEA auf die cGMP-Bildung untersucht. Diese Experimente wurden wie unter

Abschnitt 3.3.4 beschrieben durchgeführt. Wie in Abbildung 4.3.1.1 dargestellt ist, kam es im Verlauf der Ischämie und Reperfusion, besonders deutlich in der frühen Reperfusionsphase, zu einer Abnahme des cGMP-Spiegels. Bei Anwesenheit von HMR sowie DEA während der Reperfusion waren die zellulären cGMP-Spiegel signifikant erhöht.

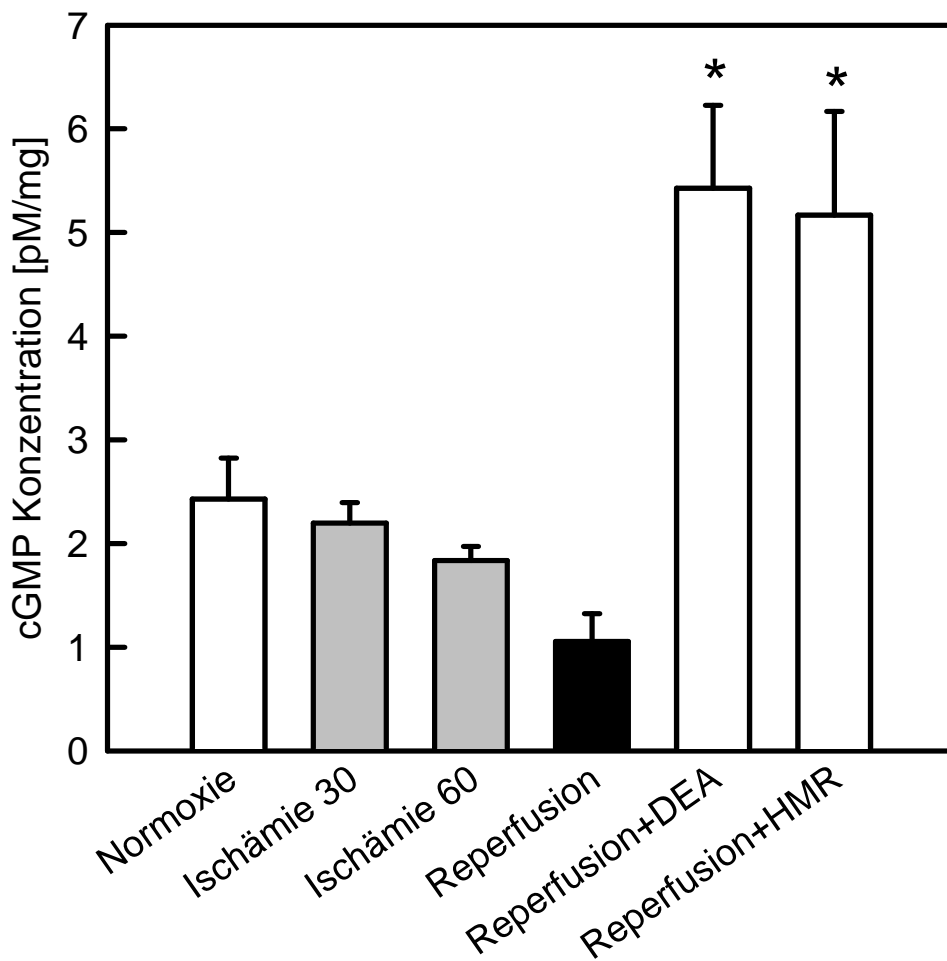


Abb.4.3.1.1 Zytosolische cGMP-Konzentration während Normoxie, nach 30 min Ischämie, nach 60 min Ischämie, während der Reperfusion unter Kontrollbedingungen und bei Anwesenheit von DEA und HMR 1766. Die Daten sind dargestellt als Mittelwerte \pm SEM (n = 10 Zellen je Bedingung aus 6 verschiedenen Präparationen, * p < 0,05 versus Kontroll- Reperfusion).

4.3.2 Hemmung der cGMP- abhängigen Proteinkinase G (PKG)

In den folgenden Versuchen wurde gezeigt, dass HMR und DEA ihren protektiven Effekt über die Aktivierung der Proteinkinase G ausüben. Dabei wurde die PKG durch KT 5823 inhibiert und der Einfluss auf die reoxygenationsinduzierte Hyperkontraktur und die Ca^{2+} -Oszillationen bei Anwesenheit von HMR bzw. DEA untersucht.

4.3.2.1 Beeinflussung der reoxygenationsinduzierten Hyperkontraktur

Die beiden folgenden Abbildungen zeigen u. a. die Zellverkürzungen nach 5–10 minütiger Reoxygenation bei Anwesenheit von DEA (Abb. 4.3.2.1.1) bzw. HMR (Abb. 4.3.2.1.2). Unter Kontrollbedingungen entwickelten die Zellen die reperfusionsinduzierte Hyperkontraktur. Bei Anwesenheit von Aktivatoren der sGC hingegen waren die Zellen geschützt. Dieser protektive Effekt ließ sich, wie in beiden Abbildungen dargestellt ist, durch Hemmung der PKG mittels KT 5823 aufheben. Damit bestätigt sich, dass die Protektion von DEA und HMR gegen die reperfusionsinduzierte Hyperkontraktur auf die Aktivierung des sGC \rightarrow c-GMP \rightarrow PKG-Weges zurückzuführen ist. In den beiden Versuchsreihen wurde KT 5823 (1 μ M) 5 min vor Reperfusionsbeginn eingewaschen. Die Zugabe von HMR (1 μ M) bzw. DEA (1 μ M) erfolgte zu Beginn der Reoxygenation. Wie in den folgenden Abbildungen ersichtlich (Abb. 4.3.2.1.1 und Abb. 4.3.2.1.2) zeigte die alleinige Anwesenheit von KT 5823 (1 μ M) während der Reoxygenationsphase keinen signifikanten Unterschied zur Kontrolle.

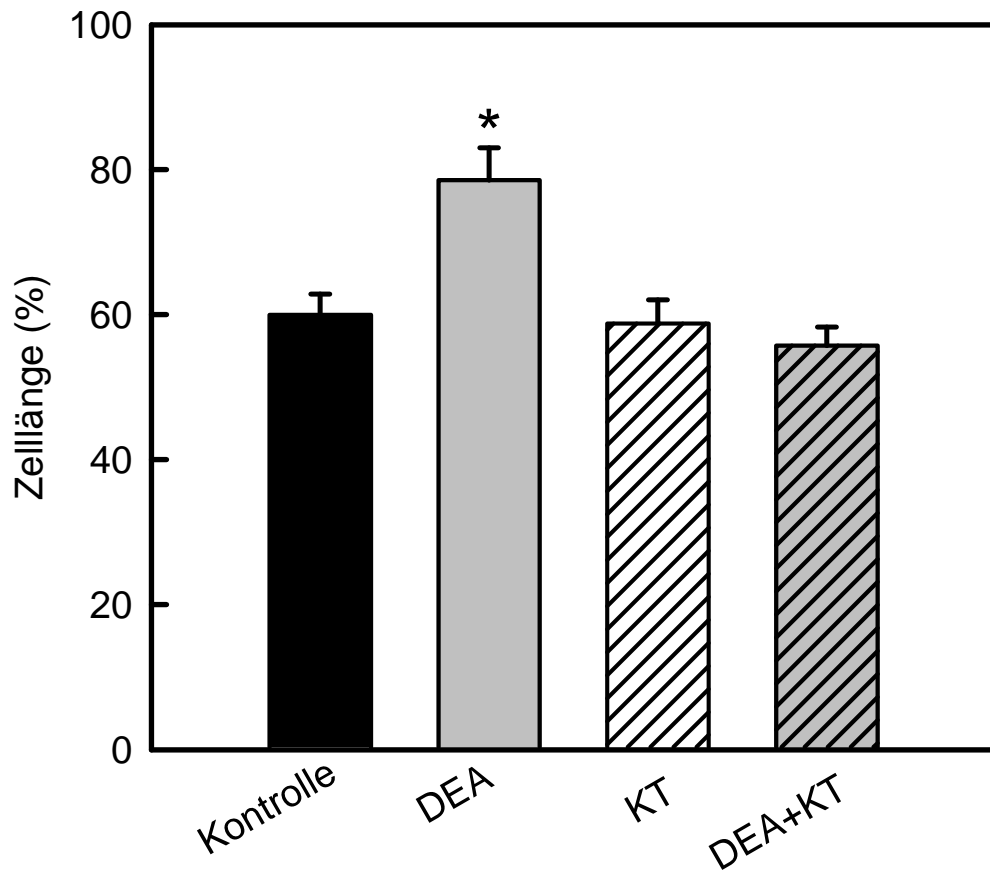


Abb.4.3.2.1.1 Zelllänge in % der endanoxischen Länge nach 10 minütiger Reoxygenation bei Anwesenheit von DEA (1 μ M), KT 5823 (1 μ M) oder DEA (1 μ M) und KT 5823 (1 μ M) im Vergleich zur Kontrolle. Die Daten sind dargestellt als Mittelwerte \pm SEM (n = 10 Zellen je Bedingung aus 6 verschiedenen Präparationen, * p < 0,05 versus Kontrolle).

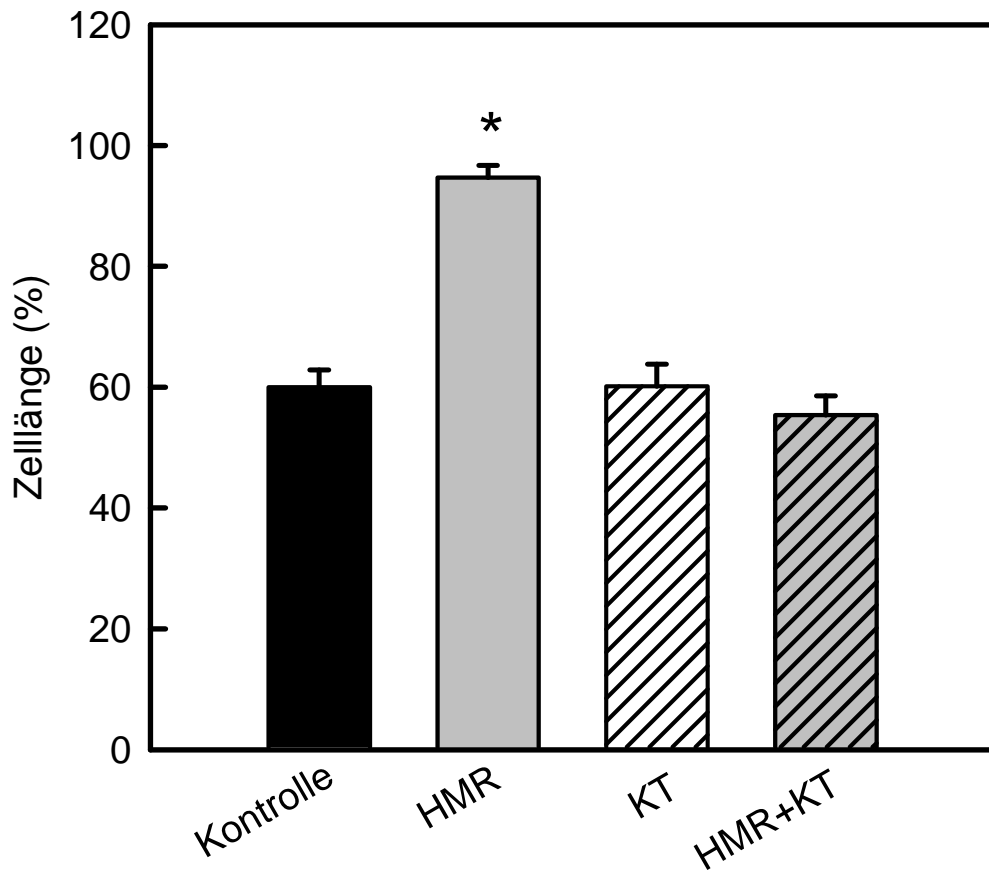


Abb.4.3.2.1.2 Zelllänge in % der endanoxischen Länge nach 10 minütiger Reoxygenation bei Anwesenheit von HMR 1766 (1 μ M), KT 5823 (1 μ M) oder HMR 1766 (1 μ M) und KT 5823 (1 μ M) im Vergleich zur Kontrolle. Die Daten sind dargestellt als Mittelwerte \pm SEM (n = 10 Zellen je Bedingung aus 6 verschiedenen Präparationen, * p < 0,05 versus Kontrolle).

4.3.2.2 Beeinflussung der reoxygenationsinduzierten Ca²⁺- Oszillationen

Der beschriebene Schutz gegen die Hyperkontraktur durch DEA und HMR korrelierte mit einer Reduktion der Frequenz der zytosolischen Ca²⁺-Oszillationen. Dieser protektive Effekt konnte ebenfalls durch Applikation des PKG-Inhibitors KT 5823 bei Anwesenheit von DEA (Abb. 4.3.2.2.1) und HMR (Abb. 4.3.2.2.2) aufgehoben werden. In den folgenden Versuchsreihen wurde KT 5823 (1 μ M) 5 min vor Reperfusionbeginn eingewaschen. Die Zugabe von HMR (1 μ M) bzw. DEA (1 μ M) erfolgte mit Beginn der Reoxygenation.

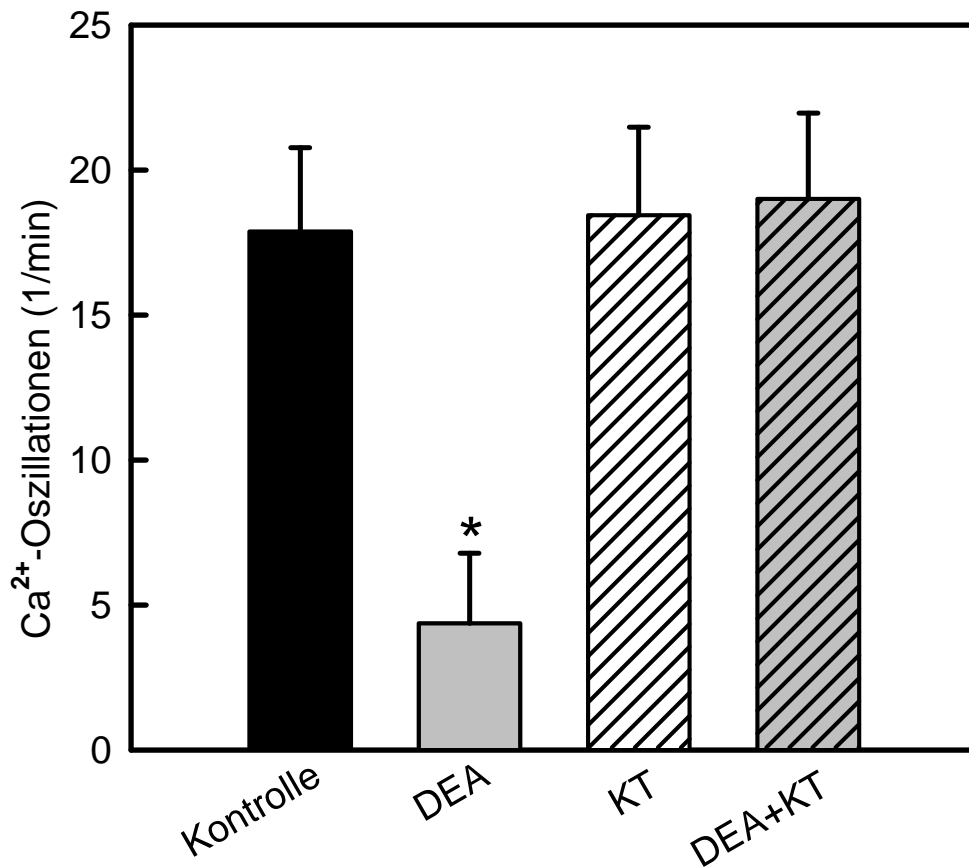


Abb.4.3.2.2.1 Ca²⁺-Oszillationen (1/min) nach 10 minütiger Reoxygenation bei Anwesenheit von DEA (1 μ M), KT 5823 (1 μ M) oder DEA (1 μ M) und KT 5823 (1 μ M) im Vergleich zur Kontrolle. Die Daten sind dargestellt als Mittelwerte \pm SEM (n = 9 Zellen je Bedingung aus 6 verschiedenen Präparationen, * p < 0,05 versus Kontrolle).

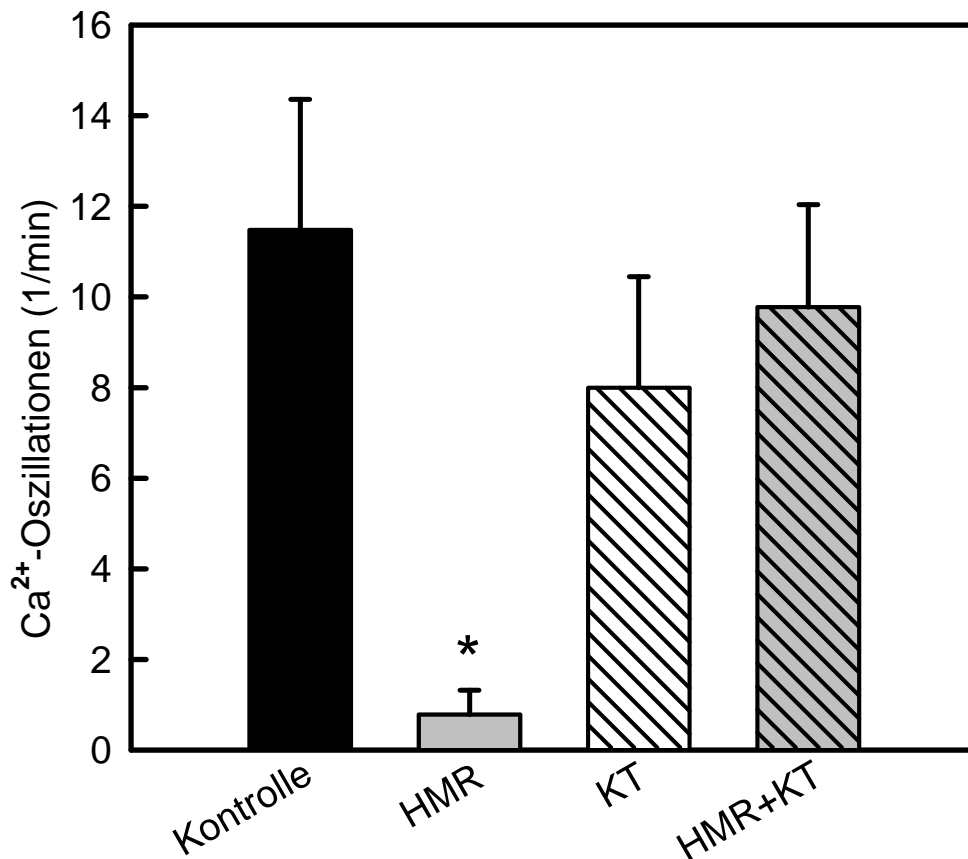


Abb.4.3.2.2.2 Ca²⁺-Oszillationen (1/min) nach 10 minütiger Reoxygenation bei Anwesenheit von HMR 1766 (1µM), KT 5823 (1µM) oder HMR 1766 (1µM) und KT 5823 (1µM) im Vergleich zur Kontrolle. Die Daten sind dargestellt als Mittelwerte +/- SEM (n = 10 Zellen je Bedingung aus 6 verschiedenen Präparationen, * p < 0,05 versus Kontrolle).

4.3.3 Beeinflussung der Funktion des sarkoplasmatischen Retikulums durch sGC-Aktivatoren

Bei Aktivierung der sGC durch DEA oder HMR wurden die Ca²⁺-Oszillationen bei gleicher Überladung der Kardiomyozyten mit Ca²⁺ signifikant im Vergleich zur Kontrolle reduziert. Die Zellen waren vor zytosolischen Ca²⁺-Spitzenkonzentrationen, der Aktivierung des kontraktile Apparates und der Hyperkontraktur geschützt. Wir nahmen an, dass dieses Ca²⁺ im sarkoplasmatischen Retikulum verblieb. Um dies zu überprüfen wurde in den folgenden Versuchen am Ende der Reoxygenationsphase

Koffein hinzugegeben und die maximale Ca^{2+} -Freisetzung in Anwesenheit von DEA und HMR im Vergleich zur Kontrolle gemessen. Durch Koffein werden die Ca^{2+} -Kanäle des SR (Ryanodin-Kanäle) aktiviert und es folgt eine maximale Entleerung des SR von Ca^{2+} . Wie die Abbildungen 4.4.3.1 und 4.4.3.2 veranschaulichen, wurde bei Anwesenheit von Aktivatoren der sGC signifikant mehr Ca^{2+} aus dem SR freigesetzt. Damit bestätigt sich die Annahme, dass die Speicherkapazität des sarkoplasmatischen Retikulums für Ca^{2+} -Ionen durch Aktivierung der sGC erhöht war und dadurch dem myokardialen Reperfusionsschaden entgegenwirkte.

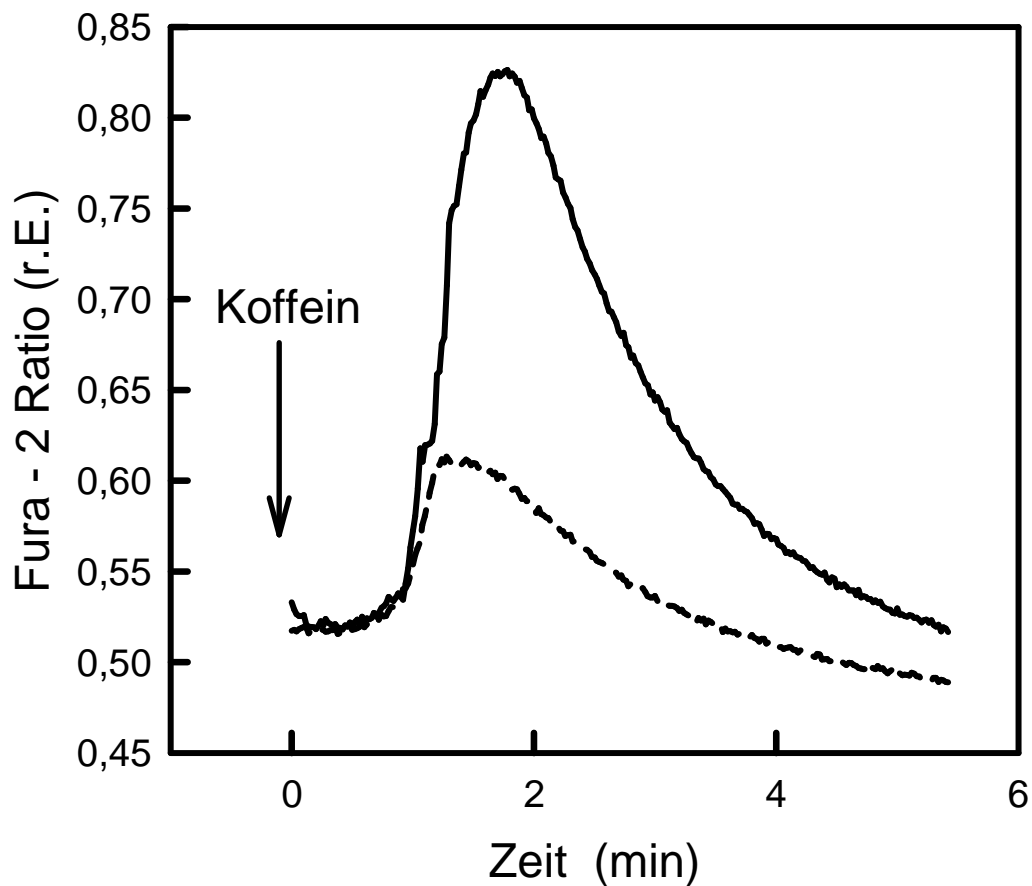


Abb.4.4.3.1 Exemplarischer Verlauf des zytosolischen Calciumanstiegs am Ende der Reperfusion nach Zugabe von Koffein bei Anwesenheit von DEA (durchgezogene Kurve) und unter Kontrollbedingungen (getrichelte Kurve).

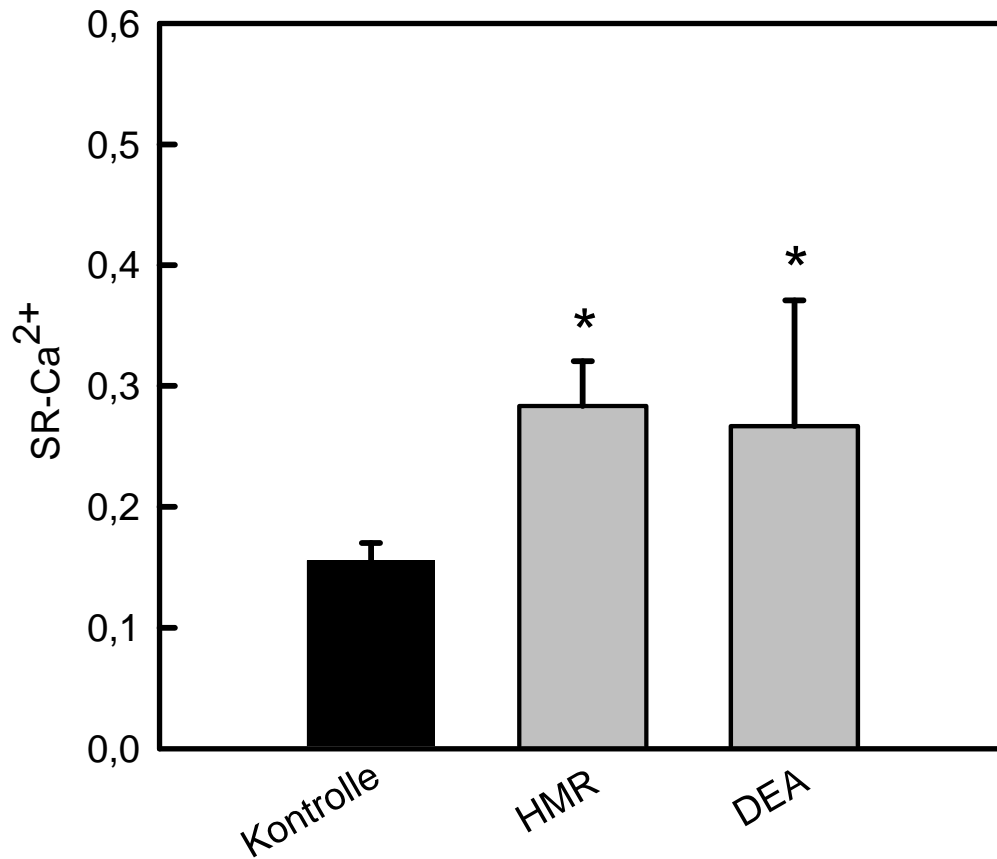


Abb.4.4.3.2 Calciumfreisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum durch Koffein am Ende der Reoxygenation unter Kontrollbedingungen und in Anwesenheit von HMR 1766 (1 μ M) und DEA (1 μ M). Die Daten sind dargestellt als Mittelwerte \pm SEM (n = 11 Zellen je Bedingung aus 6 verschiedenen Präparationen, * p < 0,05 versus Kontrolle).

5 DISKUSSION

5.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen,

- 1.) dass die Aktivatoren der löslichen Guanylatzyklase, HMR und DEA, die reperfusionsinduzierte Hyperkontraktur isolierter Kardiomyozyten reduzieren,
- 2.) dass dieser protektive Effekt auf einer signifikanten Verminderung der zytosolischen Ca^{2+} -Oszillationen, bedingt durch eine Sequestration von Ca^{2+} ins sarkoplasmatische Retikulum, beruht,
- 3.) dass diese verstärkte Ca^{2+} -Sequestration ins sarkoplasmatische Retikulum auf eine Erhöhung der zytosolischen cGMP-Konzentration und konsekutiver PKG-vermittelter SERCA-Aktivierung zurückgeführt werden kann.

5.2 Der myokardiale Reperfusionsschaden unter simulierten Reperusionsbedingungen

Die Hyperkontraktur stellt die wesentliche Ursache für einen durch die Reperfusion ausgelösten akuten Zelltod dar (Inserte et al., 2002; Siegmund et al., 1992, 1994; Schäfer et al., 2001; Abdallah et al., 2005) und ist auch in vivo nachweisbar (Garcia-Dorado et al., 1992; Garcia-Dorado et al., 1997). Als eigentlicher Auslöser der Hyperkontraktur werden die durch eine Fehlfunktion des SR während der Reperusionsphase verursachten zytosolischen Ca^{2+} -Oszillationen angesehen. Man weiß bereits, dass sich über eine Erhöhung des zellulären cGMP-Spiegels der myokardiale Reperfusionsschaden vermindern lässt (Brunner et al., 2003; Abdallah et al., 2005). Eine Erhöhung des zellulären cGMP-Spiegels kann entweder durch eine Aktivierung der partikulären Guanylatzyklase z.B. durch den Rezeptoragonisten ANP (Sangawa et al., 2004) oder durch eine Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase, wie Agulló et al. 2003 durch sGC Stimulation mittels SNAP, einem NO-Donator gezeigt, erreicht werden. Am Modell isolierter Kardiomyozyten wurde bereits gezeigt, dass durch Agonisten der pGC über eine Aktivierung der SR-Ca-ATPase die Ausbildung von Ca^{2+} -Oszillationen gehemmt werden kann und dadurch die Zellen vor der Hyperkontraktur geschützt sind (Abdallah et al. 2005). Neu in dieser Arbeit war der Versuch, durch Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase den zellulären cGMP-Spiegel in Herzmuskelzellen zu erhöhen und die Auswirkungen auf den Reperfusionsschaden auf Zellebene zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurden zwei verschiedene Aktivatoren der sGC eingesetzt, einerseits HMR 1766, ein NO-unabhängiger Aktivator der oxidierten Form der sGC, und andererseits der NO-Donator DEA, ein konventioneller sGC-Aktivator.

5.3 Protektion gegen den Reperfusionsschaden durch sGC-Aktivatoren

Es wurde untersucht, ob sich die Aktivierung der sGC auf den Reperfusionsschaden von Herzmuskelzellen protektiv auswirkt. Dies konnte durch die Versuchreihen mit HMR 1766 und DEA gezeigt werden, da bei Anwesenheit von HMR sowie auch bei Anwesenheit von DEA während der Reperfusion, die Ausbildung der Hyperkontraktur signifikant reduziert war. cGMP-Analoga bewirken einen ähnlichen protektiven Effekt in reperfundierten Kardiomyozyten (Abdallah et al., 2005). Um zu überprüfen, ob der protektive Effekt von sGC-Aktivatoren auf die Hyperkontraktorentwicklung ebenfalls über den zytosolischen cGMP-Spiegel vermittelt wurde, wurden cGMP-Messungen mittels Radioimmunassay durchgeführt. Wie in Kapitel 4.3.1 dargestellt, konnten bei der Applikation von HMR und DEA während der Reperfusion im Vergleich zur Kontrolle signifikant erhöhte zytosolische cGMP-Spiegel in den reperfundierten Kardiomyozyten gemessen werden.

Um zu untersuchen, ob dieser Effekt durch Aktivierung der sGC zustande kommt, wurden Hemmstoffversuche mit NS 2028, einem spezifischen Inhibitor der sGC, durchgeführt. Es wurde festgestellt, dass der protektive Effekt gegen die reperfusionsinduzierte Hyperkontraktur ausblieb. Aktivatoren der löslichen Guanylatzyklase wirken also über Aktivierung des sGC/cGMP-Weges protektiv gegen den myokardialen Reperfusionsschaden.

Im nächsten Schritt wurde die cGMP-abhängige Proteinkinase G (PKG) mit KT 5823 (einem spezifischen Inhibitor der PKG) gehemmt, um zu untersuchen, ob die Protektion über PKG-Aktivierung vermittelt wird. Die Ergebnisse der Versuchreihen zeigten, dass durch Hemmung der PKG der protektive Effekt gegen die Hyperkontraktur von beiden hier angewendeten sGC-Agonisten aufgehoben werden konnte. Die Protektion der reperfundierten Kardiomyozyten war demnach sGC/cGMP/PKG vermittelt.

In allen Versuchsreihen war der Schutz vor der reperfusionsinduzierten Hyperkontraktur von einer signifikanten Reduktion der reperfusionsinduzierten

Oszillationen begleitet. Diese Reduktion ließ sich ebenfalls durch Hemmung der sGC oder der PKG aufheben. Wie bereits beschrieben, stellen die zytosolischen Ca^{2+} -Oszillationen den eigentlichen Auslöser für die ungezügelte Aktivierung des kontraktiles Apparates und damit der Hyperkontraktur dar (s. o.).

Es stellt sich nun die Frage, warum die Ca^{2+} -Oszillationen durch die sGC/PKG-Aktivierung gedämpft wurden. In früheren Arbeiten, u. a. der eigenen Arbeitsgruppe, wurden Interaktion zwischen cGMP/PKG und der SR-CA-ATPase (SERCA) beschrieben. Ähnlich wie bei den Aktivatoren der partikulären Guanylatzyklase könnte auch in dieser Arbeit durch die Aktivierung der PKG die Aktivität der SERCA (SR-CA-ATPase des SR) gesteigert sein. Abdallah et al. zeigten 2005, dass Aktivatoren der pGC durch eine Erhöhung des cGMP-Spiegels die SERCA über die Proteinkinase G und konsekutiver Phosphorylierung von Phospholamban die reperfusioninduzierte Hyperkontraktur reduzieren können. Die Phosphorylierung von Phospholamban spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation der SERCA und beeinflusst dadurch die Kinetik der zellulären Ca^{2+} -Homöostase (Cornwell et al., 1991; Brusq et al., 1999; MacLennan et al., 2003; Yang et al., 2006; Sangawa et al., 2004; Pirkes et al., 2002; Zhang et al. 2005). In der nichtphosphorylierten Form hemmt Phospholamban die SERCA. Wird Phospholamban jedoch phosphoryliert, wird diese Hemmung aufgehoben und die SERCA dadurch aktiviert. Dies hat eine Erhöhung der Ca^{2+} -Speicherung im sarkoplasmatischen Retikulum zur Folge (Weiss et al., 1999; Abdallah et al., 2006). Auf diesen Mechanismus dürfte auch die in dieser Arbeit beschriebene Reduzierung der Ca^{2+} -Oszillationen unter dem Einfluss von cGMP zurückzuführen sein.

Um zu überprüfen, ob durch die Aktivierung der sGC tatsächlich mehr Ca^{2+} im sarkoplasmatischen Retikulum als unter Kontrollbedingungen gespeichert wurde, wurden die Versuche mit Koffein durchgeführt. Koffein öffnet die Ryanodin-Kanäle des SR und bewirkt dadurch eine maximale Entleerung von Ca^{2+} aus dem SR in das Zytosol (Lukyanenko et al., 2001). Bei den Versuchen mit HMR und DEA konnte im Vergleich zur Kontrolle durch Koffeinapplikation signifikant mehr Ca^{2+} aus dem SR reperfundierter Kardiomyozyten freigesetzt werden. Das zeigt, dass durch die Aktivierung der sGC während der Reoxygenation mehr Ca^{2+} im SR gespeichert wurde. Dies stellt die Ursache für die hier beschriebene Reduktion der Ca^{2+} -Oszillationen dar. Die folgende Abbildung (Abb.5.3) zeigt das Ischämie–

Reperfusionsgeschehen in Kardiomyozyten unter Einbeziehung der in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse. Die Ischämie bewirkt eine zytosolische Ca^{2+} -Überladung. Die in der Ischämie lahmgelegte SERCA wird während der Reperfusion durch die Bereitstellung von ATP wieder aktiviert. Da die Speicherkapazität des SR für Ca^{2+} jedoch begrenzt ist, kommt es zur repetitiven Freisetzung und Wiederaufnahme von Ca^{2+} in das SR. Als Folge dieser Ca^{2+} -Oszillationen kommt es zur Ausbildung der Hyperkontraktur/Nekrose. Hier greifen HMR und DEA ein, indem sie durch Aktivierung des sGC/cGMP/PKG – Weges die Speicherkapazität des SR für Ca^{2+} erhöhen und so der Kontraktur entgegenwirken.

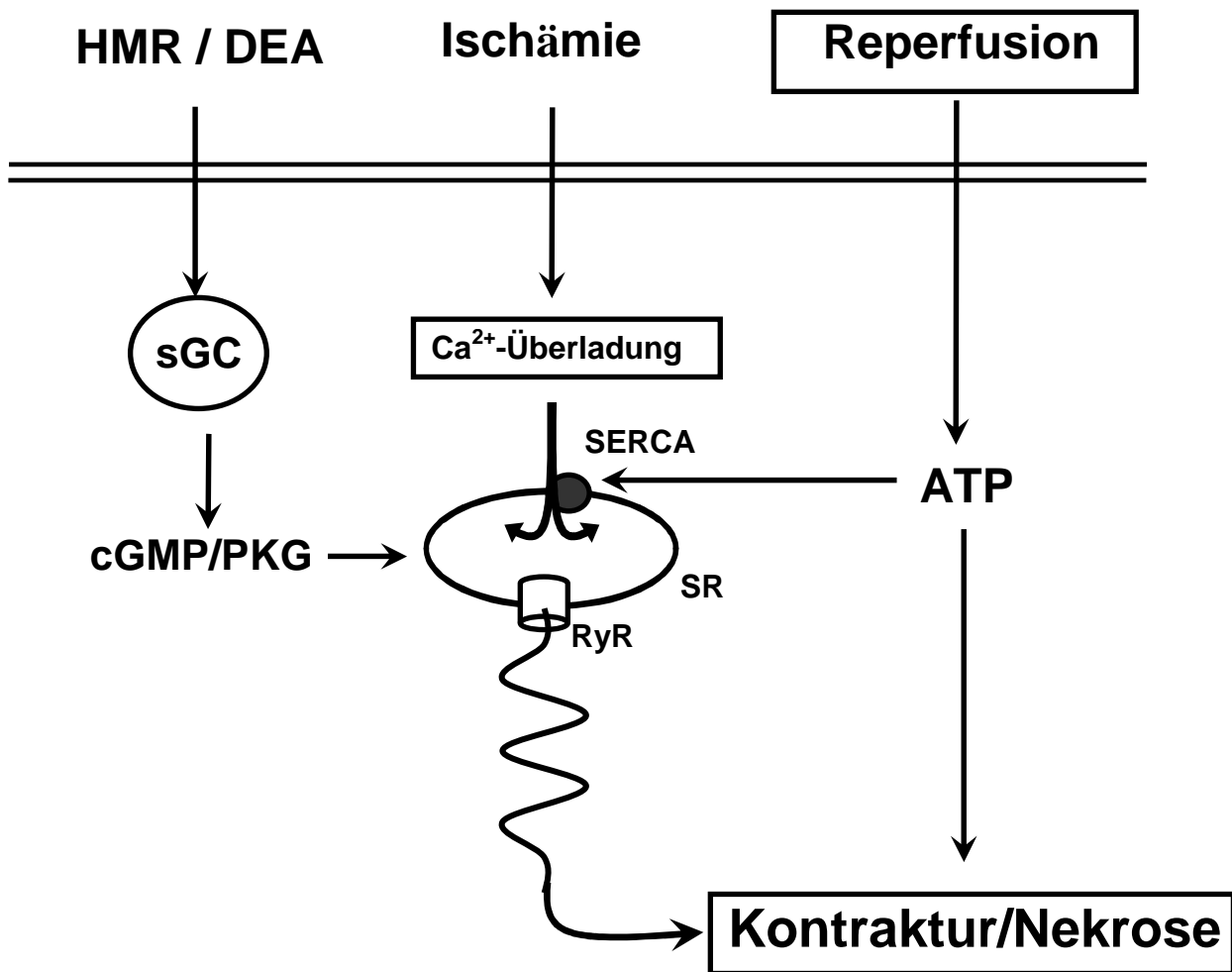


Abb. 5.3 Schematische Darstellung des Ischämie–Reperfusionsgeschehens in Kardiomyozyten mit Einbeziehung der sGC-Agonisten mit Aktivierung des cGMP/PKG-Weges (SR = Sarkoplasmatisches Retikulum, SERCA = SR-Ca²⁺-ATPase, RyR = Ryanodin – Rezeptor, PKG = Proteinkinase G, sGC = lösliche Guanylatzyklase).

5.4 Klinische Therapieoptionen

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass eine Erhöhung des zellulären cGMP-Spiegels durch Aktivierung der sGC vor dem myokardialen Reperfusionsschaden schützt. Ähnliche Ergebnisse erlangte man bei Aktivierung der partikulären Guanylatzyklase (Abdallah et al., 2005). Auch Untersuchungen an Patienten mit primärer Angioplastie eines Koronarverschlusses zeigten mit Agonisten der pGC wie ANP protektive Effekte (Kitakaze et al. 2006; Kuga et al. 2003). Zu diesem Thema wurde 2007 eine bahnbrechende klinische Studie in Japan durchgeführt. In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass die intravenöse Applikation von ANP bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt und stattgehabter Reperfusionstherapie, die Infarktgröße reduziert und die linksventrikuläre Ejektionsfraktion erhöht. Außerdem konnte die Sterberate des akuten Herztodes und die erneute stationäre Aufnahme der Patienten gesenkt werden (Kitakaze et al., 2007). Diese Protektion ist vermutlich auf den hier beschriebenen zellulären Mechanismus zurückzuführen. Es gibt bisher keine klinische Studie mit Aktivatoren der löslichen Guanylatzyklase an Patienten mit akutem Myokardinfarkt. Von großem Interesse wäre es auch diesen Ansatz klinisch zu prüfen, denn durch diese Arbeit wird deutlich, dass auch Aktivatoren der sGC von besonderem therapeutischem Interesse für eine Protektion des ischämisch-reperfundierten Myokards sein könnten. Um die bei einer intravenösen Gabe möglichen systemischen Wirkungen zu umgehen, könnte man in einer solchen Studie die sGC-Aktivatoren gezielt intrakoronar im Rahmen einer PTCA applizieren.

6 Zusammenfassung

Die Hauptaufgabe der vorliegenden Arbeit war zu klären,

- 1.) ob Aktivatoren der löslichen Guanylatzyklase reperfundierte Kardiomyozyten vor dem myokardialen Reperfusionschaden schützen können und
- 2.) ob diese Protektion gegen den myokardialen Reperfusionschaden auf eine Beeinflussung der zytosolischen Ca^{2+} -Homöostase zurückzuführen ist, und
- 3.) ob dieser Protektion eine veränderte Funktion des sarkoplasmatischen Retikulum zugrunde liegt.

Die Ergebnisse der Arbeit zeigen:

- 1.) Die Aktivatoren der löslichen Guanylatzyklase, HMR und DEA, reduzieren die reperfusionsinduzierte Hyperkontraktur isolierter Kardiomyozyten.
- 2.) Dieser protektive Effekt beruht auf einer signifikanten Verminderung der Frequenz und Amplitude der zytosolischen Ca^{2+} -Oszillationen, bedingt durch eine Sequestration von Ca^{2+} ins sarkoplasmatische Retikulum.
- 3.) Die vermehrte Ca^{2+} -Sequestration ins sarkoplasmatische Retikulum kann auf eine Erhöhung des zytosolischen cGMP-Spiegels und konsekutiver PKG-vermittelter SERCA-Aktivierung zurückgeführt werden.

7 Summary

The aim of the present study was to investigate,

- 1.) whether activation of the soluble guanylyl cyclase (sGC) with Hmr or Dea protect cardiomyocytes against myocardial reperfusion injury, and
- 2.) whether the sGC-activation may influence the cytosolic Ca^{2+} kinetic in reoxygenated cardiac myocytes, and
- 3.) whether this depends on a sGC-mediated modification of the SR-function.

The major findings of the study are:

- 1.) Activation of the soluble guanylyl cyclase with Hmr or Dea, reduces the reoxygenation-induced hypercontracture of isolated cardiomyocytes.
- 2.) This protective effect relies on reduction of cytosolic Ca^{2+} -oscillations due to augmented storage of Ca^{2+} in the sarcoplasmic reticulum.
- 3.) The increased SR- Ca^{2+} storage seems to be the result of a cGMP/PKG-dependent activation of SERCA.

8 Literatur

Abdallah Y (2003).

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

Inaugural-Dissertation

Abdallah Y, Gkatzoflia A, Pieper H, Zoga E, Walther S, Kasseckert S, Schäfer M, Schlüter KD, Piper HM, Schäfer C (2005).

Mechanism of cGMP-mediated protection in a cellular model of myocardial reperfusion injury.

Cardiovasc Res. 66:123-131

Abdallah Y, Gkatzoflia A, Gligorievski D, Kasseckert S, Euler G, Schlüter KD, Schäfer M, Piper HM, Schäfer C (2006).

Insulin protects cardiomyocytes against reoxygenation-induced hypercontracture by a survival pathway targeting SR Ca²⁺ storage.

Cardiovasc Res 70(2):346-353

Agullo´ L, Garcia-Dorado D, Inserte J et al., (1999).

L-Arginine limits myocardial cell death secondary to hypoxia-reoxygenation by GMP-dependent mechanism.

Am J Physiol 276:H1574-1580

Agulló L, Garcia-Dorado D, Escalona N, Ruiz-Meana M, Inserte J, Soler-Soler J (2003).

Effect of ischemia on soluble and particulate guanylyl cyclase-mediated cGMP synthesis in cardiomyocytes.

Am J Physiol Heart Circ Physiol. 284:H2170-2176

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

Brunner F, Maier R, Andrew P, Wölkart G, Zechner R, Mayer B (2003).

Attenuation of myocardial ischemia/reperfusion injury in mice with myocyte-specific overexpression of endothelial nitric oxide synthase.

Cardiovasc Res 57(1):55-62

Brusq JM, Mayoux E, Guigui L, Kirilovsky J (1999).

Effect of C-type natriuretic peptide on rat cardiac contractility.

Br J Pharmacol 128:206-212

Cornwell TL, Pryzwansky KB, Wyatt TA, Lincoln TM (1991).

Regulation of sarcoplasmic reticulum protein phosphorylation by localized cyclic GMP-dependent protein kinase in vascular smooth muscle cells.

Mol Pharmacol 40:923-931

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

D'Souza SP, Davis M, Baxter GF (2004).

Autocrine and paracrine actions of natriuretic peptides in the heart.

Pharmacol Ther 101:113-129

Duranski MR, Elrod JW, Calvert JW, Bryan NS, Feelisch M, Lefer DL (2006).

Genetic overexpression of eNOS attenuates hepatic ischemia-reperfusion injury.

Am J Physiol Heart Circ Physiol 291:H2980-2986

Evgenov OV, Pacher P, Schmidt PM, Haskó G, Schmidt HH, Stasch JP (2006).

NO-independent stimulators and activators of soluble guanylate cyclase: discovery and therapeutic potential.

Nat Rev Drug Discov 5(9):755-768

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

Garcia-Dorado D (2004).

Myocardial reperfusion injury: a new view.

Cardiovasc Res 61:363-4

Garcia-Dorado D, Theroux P, Duran JM, Solares J, Alonso J, Sanz E, Munoz R, Elizaga J, Botas J, Fernandez-Aviles F (1992).

Selective inhibition of the contractile apparatus: a new approach to modification of infarct size, infarct composition, and infarct geometry during coronary artery occlusion and reperfusion.

Circulation 85:1160-74

Garcia-Dorado D, Insete J, Ruiz-Meana M et al. (1997).

Gap junction uncoupler heptanol prevents cell-to-cell progression of hypercontracture and limits necrosis during myocardial reperfusion.

Circulation 96:3579-3586

Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY(1985).

A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties.

J Biol Chem 260:3440-3450

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 278:1805-1813

Inserte J, Garcia-Dorado D, Agullo` I, Paniagua A, Soler-Soler J (2000).

Urodilatin limits acute reperfusion injury in the isolated rat heart.

Cardiovasc Res 45:351-359

Inserte J, Garcia-Dorado D, Ruiz-Meana M et al. (2002).

Effect of inhibition of Na⁽⁺⁾/Ca⁽²⁺⁾ exchanger at the time of myocardial reperfusion on hypercontracture and cell death.

Cardiovasc Res 55:739-748

Kitakaze M, Asakura M, Shintani Y et al. (2006).

Large-scale trial using natriuretic peptide or nicorandil as an adjunct to percutaneous coronary intervention for ST-segment elevation acute myocardial infarction.

Circulation 114: 2425-2426

Kitakaze M, Asakura M, Kim J et al. (2007).

Human atrial natriuretic peptide and nicorandil as adjuncts to reperfusion treatment for acute myocardial infarction (J-WIND): Two randomised trials.

Lancet 370(9597):1483-1492

Kuga H, Ogawa K, Oida A et al. (2003).

Administration of atrial natriuretic peptide attenuates reperfusion phenomena and preserves left ventricular regional wall motion after direct coronary angioplasty for acute myocardial infarction.

Circ J 67:443-448

Kuhn M (2003).

Structure, regulation, and function of mammalian membrane guanylyl cyclase receptors, with a focus on guanylyl cyclase-A.

Circ Res 93:700-709

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

Ladilov YV, Siegmund B, Piper HM (1997).

Simulated ischemia increases the susceptibility of rat cardiomyocytes to hypercontracture.

Circ Res 80:69-75

Langer M, Lüttecke D, Schlüter KD (2003).

Mechanism of the positive contractile effect of nitric oxide on rat ventricular cardiomyocytes with positive force/frequency relationship.

European Journal of Physiology 10.1007/s00424-003-1187-8

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

Liu X, Huang Y, Pokreisz P, Vermeersch P, Marsboom G, Swinnen M, Verbeken E, Santos J, Pellens M, Gillijns H, Van de Werf F, Bloch KD, Janssens S (2007).

Nitrit oxide inhalation improves microvascular flow and decreases infarction size after myocardial ischemia and reperfusion.

J Am Coll Cardiol 50(8):808-817

Lipton SA (1996).

Distinctive chemistries of NO-Related species.

Neurochem Int 29(2):111-114

Löffler, Petrides (1998).

Biochemie und Pathobiochemie, 6. Auflage;

Springer Verlag Heidelberg

Lukyanenko V., Viatchenko-Karpinski S, Smirnov A, Wiesner TF, Györke S (2001).

Dynamic Regulation of Sarcoplasmic Reticulum Ca^{2+} Content and Release by Luminal Ca^{2+} -Sensitive Leak in Rat Ventricular Myocytes.

Biophysical Jour 81:785-798

MacLennan DH, Kranias EG (2003).

Phospholamban: a crucial regulator of cardiac contractility.

Nat Rev Mol Cell Biol 4:566-577

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 rapid hearts. Experimental Working Group.

Circulation 94 (1):10-13

Padayatti PS, Pattanaik P, Ma X, van den Akker F (2004).

Structural insights into the regulation and the activation mechanism of mammalian guanylyl cyclases.

Pharmacol Ther 104:83-99

Padilla F, Garcia-Dorado D, Agullò L, Barrabas 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.

Pierkes M, Gambaryan S, Boknik P, Lohmann SM, Schmitz W, Potthast R, Holtwick R, Kuhn M (2002).

Increased effects of C-type natriuretic peptide on cardiac ventricular contractility and relaxation in guanylyl cyclase A-deficient mice.

Cardiovasc Res 53:852-861

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

Piper HM, Abdallah Y, Schäfer C (2004).

The first minutes of reperfusion: a window of opportunity for cardioprotection.

Cardiovasc Res 61:365-367

Pyriochou A, Papapetropoulos A (2005).

Soluble guanylyl cyclase: more secrets revealed.

Cellular Signalling 17:407-413

Ramzy D, Rao V, Weisel RD (2006).

Clinical applicability of preconditioning and postconditioning: the cardiothoracic surgeons's view.

Cardiovasc Res May 1;70(2):174-80

Sangawa K, Nakanishi K, Ishino K, Inoue M, Kawada M, Sano S (2004).

Atrial natriuretic peptide protects against ischemia-reperfusion injury in the isolated rat heart.

Ann Thorac Surg 77:233-237

Saxenhofer H, Fitzgibbon WR, Paul RV (1993).

Urodilatin: Binding properties and stimulation of cGMP generation in rat kidney cells.
Am J Physiol 264:F267-273

Schäfer C, Ladilov Y, Inserte J, Schäfer M, Haffner S, Garcia-Dorado D, Piper HM (2001).

Role of the reverse mode of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger in reoxygenation-induced cardiomyocyte injury.
Cardiovasc Res 51:241-50

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

Schindler U, Strobel H, Schönafinger K, Linz W, Löhn M, Martorana PA, Rütten H, Schindler PW, Busch AE, Sohn M, Töpfer A, Pistorius A, Jannek C, Mülsch A (2006).

Biochemistry and pharmacology of novel anthranilic acid derivatives activating heme-oxidized soluble guanylyl cyclase.
Mol Pharmacol 69(4):1260-8

Schlüter KD, Weber M, Schraven E, Piper HM (1994).

NO donor SIN-1 protects against myocardial reoxygenation-induced cardiomyocyte injury by dual action.
Am J Physiol 267:H1461-1466

Siegmund B, Kliez T, Schwartz P, Piper HM (1991).

Temporary contractile blockade prevents hypercontracture in anoxic-reoxygenated cardiomyocytes.

Am J Physiol 260:H426-35

Siegmund B, Zude R, Piper HM (1992).

Recovery of anoxic-reoxygenated cardiomyocytes from severe Ca²⁺ overload

Am J Physiol 263:H1262-9

Siegmund B, Ladilov YV, Piper HM (1994).

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

Am J Physiol 267:H506-13

Siegmund B, Schlack W, Ladilov YV, Balsler C, Piper HM, (1997).

Halothan protects cardiomyocytes against reoxygenation-induced hypercontracture.

Circulation 96:4372-4379

Wang P, Zweier JL(1996).

Measurement of nitric oxide and peroxynitrite generation in the postischemic heart. Evidence for peroxynitrite-mediated reperfusion injury.

J Biol Chem 271(46):29223-30

Weiss HR, Gong GX, Straznicka M., Yan L, Tse J, Scholz PM (1999).

Cyclic GMP and cyclic AMP induced changes in control and hypertrophic cardiac myocyte function interact through cyclic GMP affected cyclic-AMP phosphodiesterases.

Can J Physiol Pharmacol 77:422-431

Witte K, Hachenberger J, Castell MF, Vahl CF, Haller C (2004).

Nitric oxide-sensitive soluble guanylyl cyclase activity is preserved in internal mammary artery of type 2 diabetic patients.

Diabetes 53(10):2640-2644

Yang XM, Philipp S, Downey JM, Cohen MV (2006).

Atrial natriuretic peptide administered just prior to reperfusion limits infarction in rabbit hearts.

Basic Res Cardiol 101:311-318

Zhang Q, Scholz PM, He Y, Tse J, Weiss HR (2005).

Cyclic GMP signalling and regulation of SERCA activity during cardiac myocyte contraction.

Cell Calcium 37:259-266

9 Erklärung

Ich erkläre: „Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig, 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.“

(Julia Kristin Tillmann)

10 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.

Herrn Dr. Yaser Abdallah danke ich für die intensive Unterstützung und die engagierte Betreuung dieser Arbeit und für seine wertvollen Anregungen.

Recht herzlich möchte ich mich auch bei Dr. Sascha A. Kasseckert für die zahlreichen guten Ratschläge bedanken.

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

11 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Julia Kristin Tillmann
Geburtsdatum: 28.05.1982
Nationalität: deutsch
Familienstand: ledig
Konfession: evangelisch

Schulbildung

08.1988 – 06.1992 Besuch der Grundschule Niederlaasphe
08.1992 – 06.2001 Besuch des Städtischen Gymnasiums Bad Laasphe mit
Abschluss der Allgemeinen Hochschulreife

Studium

10.2001 – 01.2008 Studium der Humanmedizin an der Justus-Liebig
Universität Gießen
02.09.2003 Ärztliche Vorprüfung
01.2004 – 04.2006 Forschungstätigkeit im Physiologischen Institut der JLU-
Gießen als Doktorandin
08.2006 – 08.2007 Praktisches Jahr
Innere Medizin
Universitätsklinikum Gießen
Chirurgie
Spitalzentrum Oberwallis Visp/Brig; Schweiz
Urologie
Hospital de Puerto Real, Universitätsklinikum Cadiz;
Spanien

05.12.2007	Ärztliche Prüfung
08.01.2008	Approbation als Ärztin
01.2008 – 05.2008	Tätigkeit im Rahmen der Promotionsarbeit
seit 01.07.2008	Assistenzärztin für Urologie des UKSH Lübeck

Erfahrungen

10.2000 – 10.2001	Tätigkeit als Aushilfe in der Emmaburg Klinik Bad Laasphe
04.2005 – 07.2005	Betreuung des physiologischen Praktikums; Physiologisches Institut der Universität Gießen

Kenntnisse

Sprachen	Englisch – gute Sprachkenntnisse Spanisch – gute Sprachkenntnisse Französisch – gute Grundkenntnisse
EDV	MS Office, Sigmaplot, SPSS



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

ISBN 3-8359-5339-7

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



9 17 8 3 8 3 5 1 9 5 3 3 9 0 1