
**Wirkung eines postischämisch verabreichten
Calpaininhibitors auf die Größe des Infarktareals und
die Myokardfunktion nach lokaler und zeitlich
begrenzter Ischämie am modifizierten Langendorff-
Modell des Kaninchenherzen.**

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

vorgelegt von Verena Fabiunke
Geburtsort Hünfeld
Gießen 2005

Aus dem Medizinischem Zentrum für Innere Medizin
Medizinische Klinik I
Leiter: Prof. Dr. med. H. Tillmanns

Klinische Pathophysiologie und Experimentelle Medizin
Leiter: Prof. Dr. med. H. Neuhof
des Universitätsklinikums Gießen

Gutachter: Prof. Dr. Neuhof
Gutachter: Prof. Dr. Neuzner
Tag der Disputation: 03.04.2006

Meinen Eltern in Liebe und Dankbarkeit gewidmet

1. Einleitung	1
1.1. Myokardischämie und Reperfusionssyndrom	1
1.2. Calpain-Calpastatinsystem	5
1.2.1. Struktureller Aufbau des Calpains und seine Lokalisation in der Zelle	6
1.2.2. Aktivierung von Calpain und dessen Nachweis	8
1.2.3. Physiologische und pathophysiologische Bedeutung von Calpainen	12
1.2.4. Calpaininhibitoren und deren protektive Wirkung	16
1.3. Der Einfluss des Na ⁺ -H ⁺ -Antiporters auf die Kalziumakkumulation im Zellinneren mit nachfolgender Calpain-aktivierung	17
1.3.1. Der strukturelle Aufbau des Na ⁺ -H ⁺ -Antiporters 1 und seine Lokalisation in der Zelle	18
1.3.2. Der NHE 1-Inhibitor Cariporide [®] und sein kardioprotektiver Effekt	19
2. Fragestellung	22
3. Material, allgemeine und spezielle Methoden	23
3.1. Versuchstiere	23
3.2. Präparationsmethode zur Organentnahme	23
3.3. Versuchsmodell des isoliert perfundierten Herzen	25
3.3.1. Perfusionslösung	28
3.4. Versuchsmonitoring	28
3.4.1. Kontinuierliches Monitoring	28
3.4.2. Diskontinuierliches Monitoring	29

3.4.3.	Bestimmung der Kreatinkinase-Aktivität	29
3.4.4.	Bestimmung der Laktat-Dehydrogenase-Aktivität	30
3.4.5.	Bestimmung des Kaliumionenkonzentration	30
3.5.	Inhibitoren und Reagenzien	30
3.5.1.	Calpaininhibitor A-705253	30
3.5.2.	Cariporide [®]	31
3.5.3.	Evans Blue	31
3.5.4.	2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid	31
3.6.	Anfertigung und Färbung von Gewebsschnitten	31
3.7.	Optische Auswertung der Gewebsschnitte	32
3.8.	Versuchsdurchführung	33
3.9.	Statistische Methoden	35
4.	Ergebnisse	36
4.1.	Ausschluss von Experimenten	36
4.2.	Systolischer linksventrikulärer Druck	36
4.3.	Koronardurchblutung (<i>Flow</i>)	37
4.4.	Herzfrequenz	38
4.5.	Aktivität der Herzenzyme und Konzentration der Kaliumionen	39
4.6.	Infarktgröße	41
5.	Diskussion	43
5.1.	Einleitung	43
5.2.	Reduktion des Infarktareals	45
5.3.	Myokardfunktion	47
5.4.	Spezifität der Kardioprotektion	48

5.5. Ausblick	49
6. Zusammenfassung	50
7. Literaturverzeichnis	52
8. Abbildungsverzeichnis	76
9. Tabellenverzeichnis	77
10. Abstract	78
11. Erklärung	80
12. Danksagung	81
13. Lebenslauf	82

Abkürzungen:

ATP	Adenosintriphosphat
CK	Kreatinkinase
Fa.	Firma
G6P-DH	Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase
HK	Hexokinase
i.v.	intravenös
LDH	Laktatdehydrogenase
min	Minuten
NO	Stickstoffmonoxid
RIVA	Ramus interventricularis anterior

1. Einleitung

1.1. Myokardischämie und Reperfusionssyndrom

Myokardischämien zählen zu den häufigsten Erkrankungen der täglichen Praxis. 1999 erlitten in Deutschland 218.192 Menschen einen Herzinfarkt. Das sind rund 790 Menschen pro Tag (Quelle: Herzinfarkt Register Augsburg). Zerebrovaskuläre Insulte, arterielle Verschlusskrankheiten und Minderperfusionsen während Organtransplantationen spielen neben Herzinfarkten eine weitere wichtige Rolle im Bereich der Ischämien. In 85 % der Fälle entsteht der Myokardinfarkt aufgrund einer Thrombusbildung infolge einer arteriosklerotischen Koronarstenose. In diesem Gefäßgebiet ist das Endothel in seiner Funktion gestört, so dass Vasodilatoren (NO, Prostazyklin) und antithrombotische Substanzen fehlen. Zusätzlich begünstigen Turbulenzen an der verengten Stelle Atheromrupturen mit Kollagenexposition.

Das Myokard deckt seinen Energiebedarf hauptsächlich aus Glukose, freien Fettsäuren und Laktat, die O₂-abhängig zu ATP umgewandelt werden. Während einer Ischämie stagniert die aerobe Energiegewinnung und die Zelle stellt auf anaerobe Glykolyse um, wobei Milchsäure entsteht, die zu Laktat und H⁺-Ionen dissoziiert¹. Die ATP-Ausbeute aus der anaeroben Energiegewinnung ist gering und bei länger anhaltender Ischämie hemmt die Azidose die Glykolyse. Dies führt zum irreversiblen Zellschaden mit Freisetzung von intrazellulären Enzymen.

Die zeitgerechte, vollständige und anhaltende Reperfusion senkt die Infarktletalität bis zu 50 %. Die Senkung der Letalität wird unter anderem durch die Reduktion der linksventrikulären Dysfunktion, die Verringerung des Arrhythmierisikos und die Verbesserung der

¹ Laktat wird unter diesen Bedingungen nicht nur nicht verbraucht, sondern zusätzlich gebildet.

Narbenbildung mit Verringerung des Rupturrisikos erzielt. Reperfusion im akuten Myokardinfarkt kann durch Fibrinolyse und Katheterintervention erreicht werden. Die Katheterintervention ist in spezialisierten Zentren bei fast allen Patienten möglich und hat, unabhängig von der Zeit, eine höhere Erfolgsrate, während die allgemein verfügbare Fibrinolyse nur für einen Teil der Patienten geeignet ist und eine geringere Effektivität bezüglich der vollständigen Wiedereröffnung des Infarktgefäßes aufweist.

Es ist heute bekannt, dass Gewebeschäden nicht allein aufgrund des Sauerstoffmangels, sondern auch als Folge von Reperfusion und Reoxygenation des ischämischen Gewebes auftreten können. Neben dem *myocardial stunning*² und den Reperfusionarrhythmien ist hier im Besonderen der letale Reperfusionsschaden zu nennen.

Der letale Reperfusionsschaden ist definiert als ein Untergang von Zellen während der Reperfusion, die durch die Ischämie lediglich reversibel geschädigt waren. Deutlich wird dieser Schaden, wenn man die Konditionen während Ischämie konstant beibehält und nur in der Reperusionsphase ändert. Drei Ursachen des Reperfusionsschadens werden diskutiert: (I) Ein stark ansteigendes zytosolisches Kalzium, (II) eine rasche Normalisierung des pH-Wertes und (III) eine schnelle Normalisierung der Gewebsosmolarität (Piper und Garcia-Dorado 1999).

Die Membranen des sarkoplasmatischen Retikulums werden durch Ischämie geschädigt und sind somit durchlässig für Kalziumionen. Stark erhöhte Kalziumkonzentrationen im Zytosol, spontane Kalziumoszillationen im Zytosol sowie durch Reoxygenierung neu geliefertes ATP führen zu einer Hyperkontraktur (*hypercontraction*) der Zelle (Hearse et al. 1973, Siegmund et al. 1992). Eine Azidose könnte diese Hyperkontraktur (*hypercontraction*) verhindern, da sie

² Als „stunned myocardium“ bezeichnet man reperfundiertes vitales Myokard, das noch hypo-oder akinetisch ist.

hemmend auf die myofibrillären Elemente wirkt. Ein zu schnell ausgeglichener pH fördert demnach zusätzlich die Zerstörung der Zellen. Ein Anstieg der Osmolarität durch zytosolische Natriumüberladung (Inserte et al. 1997) und Anreicherungen von Endprodukten des anaeroben Stoffwechsels führen zu einem Anschwellen der Zelle. Werden extrazellulär, nach Wiederherstellung des Blutflusses, die osmotischen Moleküle schnell ausgewaschen, steigt der Gradient weiter an.

Die durch Ischämie vorgeschädigte Zelle ist sehr fragil. Die Zellschädigung durch den starken osmotischen Gradienten, den schnellen Ausgleich der Azidose und der Hyperkontraktion ist im Zusammenhang mit den Vorschädigungen zu sehen. Die Schädigung durch diese Mechanismen nennt man den unmittelbaren, innerhalb der ersten Minuten auftretenden, Reperfusionsschaden. Im Unterschied dazu wird ein späterer Reperfusionsschaden diskutiert, der durch Apoptose, Nekrose und vaskuläre Störungen verursacht ist. Ein durch Ischämie vorgeschädigtes Endothel wird durchlässig, so dass es zu einem interstitiellen Ödem und somit zu einer Verminderung des Blutflusses im Gefäß kommt. Zusätzlich produzieren die Endothelzellen zu diesem Zeitpunkt Zytokine und vermehrt Adhäsionsproteine und vermindern die Produktion von NO. Das wiederum führt zu einer Adhäsion und Aktivierung von Neutrophilen und Monozyten, die schließlich Sauerstoffradikale und proteolytische Enzyme freisetzen und so das Gewebe zerstören. Diese Gefäßwiderstandserhöhung bis hin zum totalen Sistieren des Koronarflusses nennt man das „*slow-*“ oder „*noreFlow-Phänomen*“. Ein solch später Reperfusionsschaden findet hauptsächlich in den ersten beiden Stunden nach dem Herzinfarkt statt (Piper et al. 2003).

Für die Annahme, dass auch die Apoptose in der Reperusionsphase eine Rolle spielt, sprechen Experimente zur Messung der DNA-Fragmentation als Apoptose-Indikator. Man fand bei ausschließlicher

Ischämie ohne Reperfusion keine Fragmentation, jedoch bei kurzer Ischämie und langer Reperfusion (Freude et al. 2000).

Sauerstoffradikale sind im Reperfusionsgewebe stärker vorhanden als im normalen Gewebe. Die hochreaktiven Radikale führen zur Peroxidation der sarkolemmalen Phospholipide, zur verminderten Ca^{2+} -Ansprechbarkeit der Myofilamente, zur Beeinträchtigung der Ca^{2+} -Aufnahme in das sarkoplasmatische Retikulum (durch Hemmung der SR- Ca^{2+} -ATPase) und zur Hemmung der oxidativen Phosphorylierung sowie zur direkten Schädigung zytoskelettaler Proteine (Toyo-oka et al. 1989, Vander Heide et al. 1996, Smart et al. 1997, Tavazzi et al. 1998, Goldhaber et al. 2000). Die beschriebenen Effekte nehmen so wiederum Einfluss auf die Ca^{2+} -Homöostase und auf die elektromechanische Kopplung der Herzmuskelzelle. Auch werden Reperfusionsarrhythmien auf das schlagartige Entstehen freier Sauerstoffradikale in der frühen Reperfusionsphase zurückgeführt (Chen et al 1998).

Aufgrund der großen klinischen Relevanz des Ischämie-Reperfusionssyndroms wurden schon zahlreiche Versuche unternommen, neue Weg zur Minimierung des Reperfusionsschadens zu finden. Hierbei handelte es sich beispielsweise um Substanzen, die in der Lage sind, die Bildung freier Radikale zu vermindern (Bolli und Marban 1999). Auch durch Präkonditionierung (Chen et al. 2001) und medikamentöser Blockade von Ca^{2+} -Kanälen (Sandmann et al. 2002) mit konsekutiver Reduktion des Kalziumioneneinstroms konnte das Infarktareal verkleinert werden.

Besondere Aufmerksamkeit gilt der Ca^{2+} -abhängigen Cysteineprotease Calpain, die bei hohen intrazellulären Kalziumkonzentrationen während Ischämie und Reperfusion zu einer Zerstörung von Myokardzellen führt (Kihara et al. 1989, Marban et al. 1990). Durch nachfolgende Kopplung an den Na^+ - Ca^{2+} -Antiporter mit Kalziumakkumulation im Inneren der Zelle führt auch der Na^+ - H^+ -Antiporter 1 zu einer Aktivierung der Protease Calpain (Chen et al. 2002).

Eine spezifischer Calpaininhibitor ist somit ein vielversprechendes Medikament zur Reduktion des Ischämie-Reperfusionsschaden und in der Therapie des Myokardinfarktes von hoher klinischer Relevanz.

1.2. Calpain-Calpastatinsystem

Calpaine sind Kalzium-abhängige, zytosolische Cysteinproteasen mit einem pH-Optimum von 7,2 - 8,2. Man nennt sie entsprechend der zu ihrer Aktivierung erforderlichen Konzentration an freiem Kalzium μ -Calpain³ und m-Calpain⁴ (Cong et al. 1989). In der Literatur bezeichnet man μ -Calpain auch als Calpain-I und m-Calpain als Calpain-II. μ -Calpain und m-Calpain sind die ubiquitären, konventionellen und typischen Calpaine. Ihre Aminosäuresequenzen haben eine 90 % Übereinstimmung in Vertebraten (DeLuca et al. 1993, Smith et al. 2001). Die später als m-Calpain bezeichnete Cysteinprotease wurde erstmals von Gurof und Gurof 1964 beschrieben und 1976 von Ishiura et al. (1980) als gereinigtes Enzym dargestellt. Seit 1989 existiert die Bezeichnung μ - und m-Calpain.

Als Calpain-ähnlich werden solche Cysteinproteasen bezeichnet, die eine 20 - 25 %ige Übereinstimmung mit Domäne II (siehe Abb.1.2.1.-1) aufweisen und nicht zu den übrigen klassischen Cysteinproteasen (Cathepsin B und Papain) gehören. Zeigen diese Calpain-ähnlichen Proteasen zudem die klassische Domänenstruktur der 80kDa Untereinheit, werden sie zu den typischen Calpainen gezählt. Hierunter fallen Calpain 3, 9 und 10, die in Kapitel 1.2.3. mit spezifischen Pathologien in Verbindung gebracht werden können.

Calpastatin, bestehend aus vier Untereinheiten, ist der einzige gefundene natürliche und spezifische Inhibitor des Calpains (Crawford 1990). Die meisten immunhistochemischen Studien zeigen, dass Calpaine und Calpastatin stets zusammen in den Zellen

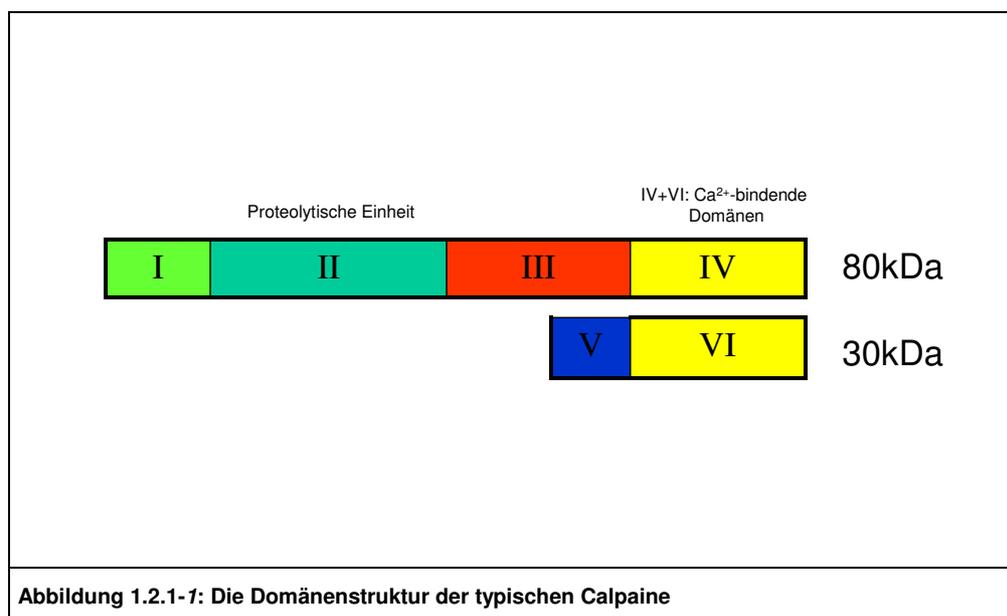
³ Ca²⁺-Bedarf im mikromolaren Bereich.

⁴ Ca²⁺-Bedarf im millimolaren Bereich.

vorkommen (Goll et al. 1992, Kumamoto et al. 1992). Für die Bindung des spezifischen Inhibitors an das Calpain wird Ca^{2+} benötigt (Cottin et al. 1981, Imajoh und Suzuki 1985, Ojha und Wallace 1988), dessen Konzentration vom jeweiligen Calpainmolekül abhängt. Die Calpastatinbindung ist sehr fest, aber reversibel. Eine Lockerung der Bindung ist möglich indem man Ca^{2+} durch Chelatbildner abfängt (Otsuka und Goll 1987, Kapprell und Goll 1989).

1.2.1. Struktureller Aufbau des Calpains und seine Lokalisation in der Zelle

μ - und m-Calpain sind Heterodimere bestehend aus einer identischen 30kDa Untereinheit und einer größeren 80kDa Untereinheit mit 55 - 65 %iger Übereinstimmung zwischen μ - und m-Calpain.



Die 30kDa Einheit wird von einem einzigen Gen auf Chromosom 19 codiert (Ohno et al. 1990) und besteht aus den beiden Domänen V und VI. Die Domäne V der kleinen Untereinheit wird kontrovers diskutiert. Zum einen hält man sie für eine hydrophobe Einheit, die Phospholipide bindet (Imajoh et al. 1986) und so eine Verbindung zur

Zellmembran herstellen kann. Goll et al. (2003) hingegen stufen sie als wenig hydrophob ein und sehen sie als Bindestelle zu anderen Molekülen. Domäne VI, am COOH-Ende der 30kDa Untereinheit hat vier EF-Hände, die Ca^{2+} binden (Ohno et al. 1986). Die Röntgen-Crystallographie hat für diese Untereinheit eine weitere und somit fünf EF-Hände gezeigt (Blanchard et al. 1997, Lin et al. 1997). Folglich werden die Calpaine zur Penta-EF-Hand-Familie der Proteine gezählt (Maki et al. 1997, Xie et al. 2001). Mitglieder dieser Familie bilden Dimere, die eine Verbindung zwischen der fünften EF-Hand und Membranen herstellen (Xie et al. 2001).

Die kleine Untereinheit scheint für den Organismus essentiell zu sein, da in Versuchen mit *knock-out* Mäusen gezeigt werden konnte, dass ein Fehlen der 30kDa Einheit letal ist (Arthur et al. 2000, Zimmermann et al. 2000).

Die 80kDa Untereinheit von μ - und m-Calpain ist auf Chromosom 1 und 11 codiert (Ohno et al. 1990). Krystallographische Untersuchungen zeigen sechs Domänen für das m-Calpain (Hosfield et al. 1999, Strobl et al. 2000). Allerdings ist noch unklar, ob μ -Calpain in krystallographischen Untersuchungen auch sechs Untereinheiten hat. Sicher verfügbar ist für beide Calpaine die Aminosäuresequenz mit vier Domänen für die 80kDa-Untereinheit (Suzuki 1990). Domäne I der Aminosäuresequenz enthält das NH_2 -terminale Ende. Domäne II beinhaltet die katalytische Triade aus den Aminosäuren Cystein, Histidin und Asparagin, die typisch für Cysteinproteasen wie Papain oder Cathepsin B, L und S, sind. Domäne II wird nochmals in IIa mit der Aminosäure Cystein und IIb mit den Aminosäuren Histidin und Asparagin eingeteilt. IIa und IIb binden jeweils ein Atom Ca^{2+} (Moldoveanu et al. 2002). Folglich könnte die Aktivierung durch Kalziumionen direkt in der katalytischen Einheit gelegen sein. Domäne III verbindet die Ca^{2+} -bindende Domäne IV mit der katalytischen Domäne II und könnte an der Bindung von Phospholipiden beteiligt sein (Tompá et al. 2001). Somit ergeben sich zwei potente EF-Hand- Ca^{2+} -bindende Sequenzen.

Hierbei handelt es sich um Domäne IV und Domäne VI. Die fünfte EF-Hand in Domäne IV und VI ist eingebunden in die Verbindung der großen und kleinen Untereinheit und bindet kein Kalzium. Eine Kalziumbindung löst in Domäne IV und VI nur eine sehr geringe Konformitätsänderung aus, was zu der Annahme führt, dass eine Kalziumbindung außerhalb der EF-Hände verantwortlich für die Kalzium vermittelte Aktivierung ist. Hier kämen, wie weiter oben bereits angesprochen, die Domänen IIa und IIb in Frage.

Zumindest eins der drei Mitglieder der Calpainfamilie μ -, m-Calpain oder Calpastatin wurde in jeder Vertebratenzelle gefunden, die man untersucht hat (Murachi 1983, Goll et al. 1992). Die meisten immunhistochemischen Studien konnten zeigen, dass Calpaine und Calpastatin stets zusammen in den Zellen vorkommen (Goll et al. 1989 und 1992, Kumamoto et al. 1992). Calpain und Calpastatin gibt es nur intrazellulär und sie scheinen dort an Myofibrillen, an das Zytoskelett, an Vesikel und an Plasmamembranen gebunden zu sein. Außerhalb der Zelle kommen diese Proteasen nur bei zerstörten Zellen oder schlechter Fixation vor (Suzuki et al. 1990, Kumamoto et al. 1992). In normalen Skelettmuskeln befinden sich Calpain und Calpastatin an oder in der Nähe der Z-Scheibe, wenige Moleküle auch im Bereich der I-Bande und sehr wenige im Bereich der A-Bande (Goll et al. 1989 und 1992, Kumamoto et al. 1992, Spencer und Tidball 1992).

1.2.2. Aktivierung von Calpain und dessen Nachweis

Es bleibt nach wie vor unklar, wie die Regulation des Calpains in der Zelle abläuft. Die verschiedenen Konzepte und Vorschläge werden im Folgenden vorgestellt.

Calpain ist in Abwesenheit von Kalzium sicher inaktiv, da die drei Aminosäuren Cystein, Histidin und Asparagin des aktiven Zentrums ohne Kalzium zu weit voneinander entfernt sind. Kalziumionen könnten eine Verstärkungskette auslösen, die jeweils zu einer kleinen strukturellen Veränderung mit Beginn in Domäne VI führt.

Diese wirkt sich auf Domäne IV und III aus und erreicht schließlich das katalytische Zentrum in Domäne II. Yount (1993) vergleicht es mit der Bindung von ATP an das Myosinköpfchen, wodurch es zu einer kleinen Bewegung relativ zum Actinfilament kommt. Lin et al. (1997) zeigen in diesem Zusammenhang, dass ein Calpaininhibitor in der hydrophoben Tasche bindet und so eine minimale Konformationsänderung verursacht. Goll et al. (2002) folgern, dass der Inhibitor Domäne VI und auch Domäne IV blockt und so die Transmission zu Domäne II verhindert. Wie allerdings die Ca^{2+} -Bindung die Konformationsänderung, die zu proteolytischer Aktivität führt, auslöst, bleibt unklar. Strobl et al. (2000) nehmen an, dass Ca^{2+} Ionenbindungen löst, so dass sich Domäne IIa auf Domäne IIb zubewegt. Leider ist bisher keine Strukturaufklärung mit gebundenem Ca^{2+} möglich. Es konnte lediglich gezeigt werden, dass Ca^{2+} das Molekül öffnet und es anfälliger für eine Proteolyse macht. Viele Cysteinproteasen sind Proenzyme, die durch Autolyse erst aktiviert werden, so dass das sterisch geblockte aktive Zentrum freigegeben wird. Mellgren (1987) und Suzuki et al. (1987) nahmen ebenfalls an, dass Calpaine Proenzyme sind, da μ - und m-Calpain bei Inkubation mit Ca^{2+} autoproteolysieren (Dayton 1982, Cong et al. 1989, Edmunds et al. 1991, Saido et al. 1991, Saido und Shibata et al. 1992). Heute vermutet man, dass bereits die unautolysierten Calpaine in der Lage sind, proteolytisch aktiv zu werden und somit keine Proenzyme sein können (Cong et al. 1989, Goll et al. 1992, Cong et al. 1993, Crawford et al. 1993, Elce et al. 1997). Allerdings zeigen einige wissenschaftliche Arbeiten, dass die Autolyse und die proteolytische Aktivität zur gleichen Zeit auftreten. So bleibt die Frage, ob das nicht-autolysierte Calpain wirklich proteolytisch aktiv sein kann, unbeantwortet (Goll et al. 1992, Kuboki et al. 1992, Saido und Nagao et al. 1992, Saido und Suzuki et al. 1993). Letztlich kann die Autolyse als ein Indikator der Calpainaktivität gewertet werden. Der Umkehrschluss, dass fehlende Autolyse eine Calpainaktivität ausschließt, gilt allerdings nicht.

Eine Schwierigkeit, die auch die Glaubwürdigkeit weiterer Thesen in Frage stellt, ist das Grundproblem der physiologischen Kalziumkonzentration, die mit 50 - 300nM sehr viel niedriger ist als die erforderliche Ca^{2+} -Konzentration zur Aktivierung und Autoproteolyse des Calpains (Jacquemond 1997, Maravall et al. 2000).

Der Verlust der Kalziumhomöostase in der Zelle führt beispielsweise zur Zerstörung von Proteinen und Polypeptiden, die als Substrate der Calpaine bekannt sind. Trotzdem reicht die Konzentration an Kalzium während Ischämie nicht aus, um Calpaine direkt zu aktivieren⁵. Gesucht wird aus diesem Grund nach einem Molekül, das mit Calpain interagiert und so das Kalziumerfordernis senkt. Hierbei stieß man auf Phospholipide wie Phosphatidylinositol (PI) (Coolican und Hathaway 1984) und Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphonate (PIP2) (Saido et al. 1991, Saido und Shibata et al. 1992), die die erforderliche Kalziumkonzentration für μ - (Cong et al. 1989, Saido et al. 1991, Saido und Shibata et al. 1992) und m-Calpain (Cong et al. 1989) reduzieren sollen. Diese Mutmaßung bleibt indes fraglich, da man sehr hohe Konzentrationen von PI und PIP2 zur Reduzierung bräuchte. Hieraus ergab sich jedoch die Annahme, dass Calpaine mit den Phospholipiden an der Plasmamembran in der Nähe von Ca^{2+} -Kanälen reagieren und dass diese Interaktion die notwendige Ca^{2+} -Konzentration senkt. Die Studien von Inomata und Kuboki belegen jedoch, dass Calpaine an Proteine und nicht an Phospholipide der Membran binden (Inomata et al. 1989, Inomata et al. 1990, Kuboki et al. 1990) und Material von Zalewska, Thompson und Goll (Goll et al. 2003) zeigt, dass eine Inkubation von Calpain mit Erythrozythenmembranen keinen Effekt auf das Ca^{2+} -Erfordernis hat. Eine weitere Theorie ist die Aktivierung des Calpains durch eine

⁵ Das ist ganz sicher für m-Calpain. Für μ - Calpain könnte die Konzentration eventuell ausreichen.

Wanderung zur Plasmamembran, da sich Calpain und Calpastatin in unstimulierten Zellen, abgesehen von einer leichten Akkumulation um den Zellkern, eher verstreut im Zytosol befinden (Gil-Parado et al. 2003) und Calpain nach Ca^{2+} -Anstieg zur Plasmamembran wandert während Calpastatin seinen Ort nicht wechselt.

μ - und m-Calpain sind an verschiedenen Stellen phosphoryliert (Cong et al. 2000). Die Tatsache, dass viele Enzyme durch Phosphorylierung aktiviert werden, deutet darauf hin, dass dies der lang gesuchte Aktivator der Calpaine sein könnte oder dass die Phosphorylierung als strukturelle Veränderung Teil einer Signaltransduktion ist. Die Grundfrage der erforderlichen Kalziumkonzentration konnte also bisher nicht gelöst werden.

Für die Bindung von Calpastatin an Calpain wird Ca^{2+} benötigt (Cottin et al. 1981, Imajoh und Suzuki 1985, Otsuka und Goll 1987). Die benötigte Ca^{2+} -Konzentration hängt vom Calpainmolekül ab, die Calpastatin-Hemmung ist reversibel und die Bindung kann gelockert werden, indem man Ca^{2+} durch Chelatbildner abfängt (Kaprell und Goll 1989, Otsuka und Goll 1987). Es bedarf einer geringeren Ca^{2+} -Konzentration zur Inhibition als zur Aktivierung (Kaprell und Goll 1989). Trotzdem ist die Konzentration immer noch höher als in normal existierenden vitalen Zellen (Becker et al. 1989, Berlin und Konishi 1993, Harkins et al. 1993, Kurebayshi et al. 1993). Die Zelle muss also einen Mechanismus besitzen, der die Aktivität von Calpain in der Gegenwart von Calpastatin zulässt, andernfalls würde bei steigender Ca^{2+} -Konzentration immer zuerst Calpastatin inhibierend wirken, bevor Calpain proteolytisch aktiv werden kann. Eventuell könnte eine räumliche Trennung eine Calpainaktivität durch Kalziumanstieg erzeugen. Oder die Konzentration von Kalzium wird so verändert, dass sie nicht in den Konzentrationsbereich der Calpastatine fällt. Es wäre auch möglich, dass eine Phosphorylierung Calpain vor einer Hemmung durch Calpastatin schützt.

Es wurde angenommen, dass das Substrat selbst einen Einfluss auf die Ca^{2+} -Konzentration hat, die für die Aktivierung von Calpain benötigt wird. Sieben verschiedenen Substrate wurden untersucht, die These konnte nicht bestätigt werden (Andresen et al 1991).

1.2.3. Physiologische und pathophysiologische Bedeutung von Calpainen

Die Struktur der Calpaingene lässt auf „*housekeeping*“-Gene schließen, die immer exprimiert werden und vermutlich eine Funktion im basalen Routinestoffwechsel der Zelle haben. Dennoch sind ihre physiologischen und pathophysiologischen Funktionen bisher noch immer unklar. Im Folgenden werden die wichtigsten Thesen betrachtet.

Calpaine scheinen in die Umwandlung des Zytoskeletts und die Anheftung des Zytoskeletts an Membranen, in die Signaltransduktion und in die Apoptose eingebunden zu sein. Desweiteren haben sie Einfluss auf den Abbau von Enzymen des Zellzyklus, auf die *Longterm Potentiation* der neuronalen Erregung und auf die Regulation der Genexpression.

Über 100 Calpainsubstrate wurden bereits gefunden (Croall und Demartino 1991, Wang und Yuen 1999), die man in folgende Kategorien einteilen kann:

- Zytoskelettproteine, besonders solche, die an der Interaktion zwischen Zytoskelett und Plasmamembran beteiligt sind,
- Kinasen und Phosphatasen,
- Membran-assoziierte Proteine, auch Rezeptoren und Ionen-Kanäle,
- Transkriptionsfaktoren.

In vitro-Spaltung bedeutet natürlich nicht gleichzeitig auch eine in vivo-Spaltung dieser Moleküle. Wenn die Spaltung jedoch hauptsächlich durch einen Ca^{2+} -Influx ausgelöst wird und durch Calpaininhibitoren gedrosselt werden kann, ist dieses Molekül als Substrat sehr wahrscheinlich.

Die Einwirkung auf das Zytoskelett ist bisher am gründlichsten untersucht. Es scheint wahrscheinlich, dass Calpain notwendig ist, um die Zytoskelettverbindung zur Plasmamembran zu lösen, so dass beispielsweise eine Myoblastenfusion möglich ist. Es bleibt allerdings unklar, warum die Zelle den Weg der Proteolyse mit späterer Resynthese wählen sollte, um die Zytoskelett-Plasmamembran-Regulation durchzuführen. Energetisch günstiger wäre eine einfache Phosphorylierung. Möglich wäre natürlich eine eigene Funktion der Spaltprodukte.

Die Spaltung von Proteinkinase C und damit die Produktion eines aktiven Enzyms (Kishimoto et al. 1989) führte zu der Annahme, dass Calpaine in die Signaltransduktion involviert sind. Es zeigte sich, dass verschiedene Kinasen, Phosphatasen und Zytoskelettproteine, die sicher Zwischenglied einer Signaltransduktion sind, sehr schnell durch Calpaine gespalten werden. Neuere Studien zeigen, dass Calpaine in die *Integrin-mediated* Signal-Kette eingebunden sind (Fox und Saido 1999). Ihre Funktion besteht nicht nur in der Modifizierung von Zwischenprodukten der Signaltransduktion, sondern auch in der Interaktion zwischen Zytoskelett und Membran. Eine Vielzahl von Studien, die synthetische Inhibitoren verwenden, zeigen, dass Calpainaktivität für den Zellzyklus notwendig ist, besonders in der G1 - S-Phase. Eine Überexpression von Calpastatin unterdrückt beispielsweise das Fortschreiten des Zellzyklus in G1 bei Hühnerembryonen (Carragher et al. 2002). Auch mit der Meiose wurden Calpaine in Verbindung gebracht (Watanabe et al. 1989, Malcov et al. 1997, Santella et al. 2000).

Die genaue Funktion der Calpaine im Bereich der Genexpression ist noch nicht geklärt. Die Vermutung basiert auf der Beobachtung, dass Calpaine verschiedene Transkriptionsfaktoren in vitro spalten können (Hirai et al. 1991, Gonen et al. 1997, Kubbutat und Vousden 1997, Pariat et al. 2000).

Die exakte Rolle des Calpains im Bezug auf die Apoptose wird kontrovers diskutiert. Ca^{2+} -unabhängige Cysteinproteasen wie

Caspase und lysosomale Cathepsine sowie das Proteasom haben eine führende Rolle im Bereich der Apoptose. Einige der synthetischen Calpaininhibitoren, die in experimentellen Studien zur Klärung dieser Frage verwendet wurden, hemmen unglücklicherweise auch Cathepsin B und L sowie das Proteasom und können demzufolge keine hinreichende Auskunft geben. Neuere Studien hingegen, die den spezifischen Calpaininhibitor Calpastatin verwendet haben (Chi et al. 1997, Squier et al. 1999, Ruiz-Vela et al. 2001, Lu et al. 2002) und mit Antikörpern gegen Spaltprodukte des Apoptoseweges arbeiten (Saido und Yokota et al. 1993), können einen Einfluss des Calpains auf den programmierten Zelltod sicher belegen. Es zeigt sich außerdem, dass Calpain durch Aktivierung der Caspase (Nakagawa und Yuan 2000) die Apoptose fördern kann und durch Proteolyse der Caspase (Chua et al. 2000) den programmierten Zelltod gleichermaßen hemmen könnte. Wahrscheinlich ist die Rolle der Calpaine spezifisch für bestimmte Zelltypen und Stimuli (Kidd et al. 2000).

Es ist wahrscheinlich, dass μ - und m-Calpaine die gleichen physiologischen Funktionen übernehmen können, aber auf unterschiedliche Signale in der Zelle reagieren. Menschliche Thrombozyten enthalten beispielsweise nur μ -Calpain und Rinder-Thrombozyten nur m-Calpain (Taylor et al. 1991). Man kann davon ausgehen, dass sie in der Zelle die gleiche Funktion ausüben.

Calpaine werden mit den verschiedensten Erkrankungen in Verbindung gebracht. Hierbei ist es wichtig, zwischen Gendefekten und Erkrankungen infolge eines Homöostaseverlustes des Kalziums mit sukzessiver Calpainaktivierung zu unterscheiden.

Ein Defekt des Calpainhomologons 3a führt beispielsweise zur LGMD Typ 2a (Dystrophia musculorum progressiva) und eine genetische Veränderung von Calpain 10 wird als Auslöser für einen Diabetes mellitus Typ 2 diskutiert (Reverter et al 2001).

Muskeldystrophien wurden als erstes mit Calpain in Verbindung gebracht (Ishiura et al. 1980), wobei Typ Becker und Typ Duchenne am gründlichsten untersucht sind. Der Verlust von Dystrophin führt zu einer Lockerung der Plasmamembran der Skelettmuskelzelle und zum Einstrom von extrazellulärem Kalzium in die Muskelzelle mit folgender Calpainaktivierung. Calpaininhibitoren führen zu einer Besserung der Symptome der Muskeldystrophie (Badalamente und Stracher 2000).

Gestörte Calpain-Aktivität durch Verlust der Kalziumhomöostase findet sich bei Gewebsdefekten wie Herzinfarkt, Hirninfarkt und Schädeltraumen. In der ischämischen Herzmuskelzelle kommt es zu einem messbaren Anstieg des Calpain-Proteins und seiner mRNA (Iizuka et al. 1991, Sandmann et al. 2002). Außerdem konnte aktiviertes Calpain mittels spezifischer Antikörper im Infarktareal des menschlichen Herzen nachgewiesen werden (Kunimatsu et al. 1999).

Folgende Mechanismen der calpainabhängigen Herzmuskelzellschädigung werden diskutiert: (I) Calpastatin fällt Calpain in der frühen Phase von Ischämie und Reperfusion zum Opfer, so dass sich der protektive Effekt des natürlichen Calpaininhibitors verringert. (II) Es kommt zu einer Spaltung von Strukturproteinen der Zelle wie Desmin, Alpha-Spectrin und Troponin IA durch Calpain (Maekawa et al. 2003) und somit zu kardialer Dysfunktion und zum *Low-Output-Failure* (Yoshida et al. 2003). (III) Desweiteren wird der calpainabhängige Apoptoseweg als Mechanismus diskutiert. Calpaininhibition hingegen vermindert den myokardialen Gewebschaden und die mitochondriale Dysfunktion entstanden durch Ischämie und Reperfusion (Neuhof et al. 2003 und 2004). Auch durch Präkonditionierung (Chen et al. 2001) und medikamentöser Blockade von Ca^{2+} -Kanälen (Sandmann et al. 2002) mit konsekutiver Reduktion des Kalziumioneneinstroms konnte das Infarktareal verkleinert werden.

1.2.4. Calpaininhibitoren und deren protektive Wirkung

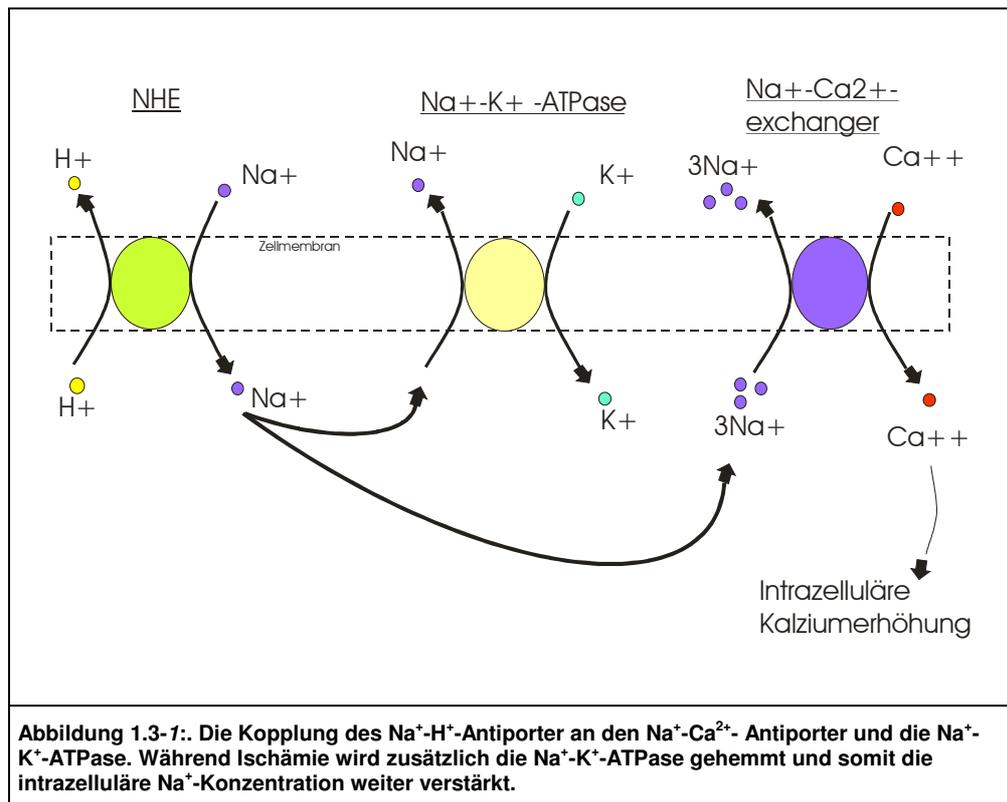
Angesichts der vielfältigen Funktionen des Calpainsystems und seiner diversen Einflüsse auf physiologische und pathophysiologische Abläufe ergeben sich durch Calpaininhibition neue Therapiemöglichkeiten. Calpastatin, als der bisher einzige natürliche und spezifische Inhibitor des Calpains (Crawford 1990), wäre für diese Funktion ideal. Durch sein großes Molekulargewicht und die damit verbundene schlechte Membrangängigkeit (Biswas et al. 2004) ist er zur exogenen Beeinflussung des zytosolischen Calpains leider ungeeignet.

Endogenen Inhibitoren wie Kininogen und α_2 -Makroglobulin, die als Calpainhemmer getestet wurden, mangelte es an Spezifität (Saido et al. 1994, Bradford et al. 1990). Zusammenfassend kann man sagen, dass es den bisherigen untersuchten Inhibitoren wie Leupeptin, Calpain-I-Inhibitor, Calpain-II-Inhibitor und E-64 stets an ausreichender Spezifität, Gewebegängigkeit und Pharmakokinetik fehlte.

Lubisch et al. ist es 2003 erstmals gelungen, einen neuartigen nicht-peptischen Calpaininhibitor mit einer guten Selektivität, Kinetik sowie metabolischer Stabilität, guter Wasserlöslichkeit, oraler Bioverfügbarkeit und guter Zellpenetration zu entwickeln. Dieser neue Inhibitor hemmt Calpain und Cathepsin B reversibel im nanomolaren Bereich, während das Proteasom, Papain und Caspase 3 bis zu einer Konzentration von $10\mu\text{M}$ nicht gehemmt werden. Dieses vom Benzoylalanin abgeleitete Ketoamid N-(1-benzyl-2-carbamoyl-2-oxoethyl)-2-[E-2-(4-ethylaminomethyl-phenyl)-ethen-1-yl]benzamide und dessen verwandter Abkömmling N-(1-carbamoyl-1-oxohex-1-yl)-2-[E-2-(4-dimethylaminomethyl-phenyl)-ethen-1-yl]benzamide tragen an der P2-P3-Region Vinyl-benzyl-Aminoreste, die sich gut in die große hydrophobe Tasche im Calpainmolekül einfügen und es dort hemmen können. Verabreicht nach experimentellem Hirntrauma verringert der Inhibitor die Zahl der geschädigten Neuronen um 41% (Lubisch et al. 2003).

1.3. Der Einfluss des $\text{Na}^+\text{-H}^+$ -Antiporters auf die Kalziumakkumulation im Zellinneren mit nachfolgender Calpainaktivierung

Die myokardialen $\text{Na}^+\text{-H}^+$ -Antiporter (NHE) sind neben den $\text{Na}^+\text{-HCO}_3^-$ -Symportern die Hauptmechanismen zur intrazellulären pH-Regulation während physiologischer Prozesse, vorzugsweise auch während Ischämie und früher Reperfusion.



Wasserstoffionen werden in einem elektroneutralen Prozess gegen Natriumionen in den Extrazellulärraum transportiert. Neben der pH-Regulation kommt dem Antiporter somit eine Rolle der Zellvolumenregulation und der Regulation der Natriumhomöostase in verschiedenen Geweben zu. Seine Aktivierung führt zu einer paradoxen Zellschädigung, die durch die nachfolgende Kopplung an den $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$ -Antiporter mit Kalziumakkumulation im Inneren der Zelle und konsekutiver Hyperkontraktur (*hypercontraction*) sowie Aktivierung von Ca^{2+} -abhängigen Cysteinproteasen, den Calpainen, erklärbar ist. Desweiteren wird bei ischämischer Stoffwechsellage die

$\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ gehemmt. Ein Mechanismus, der über die intrazelluläre Anhäufung von Natriumionen die Anhäufung der Kalziumionen im Inneren der Zelle zusätzlich verstärkt.

Der $\text{Na}^+\text{-H}^+\text{-Antiporter}$ wird ausschließlich durch intrazelluläre Azidose aktiviert. Wasserstoffionen führen hierbei zu einem allosterischen Effekt am Antiporter (Haworth et al. 2003). Dennoch können auch andere Stimuli, beispielsweise Endothelin-I (Meyer et al. 1996) und Alpha-1-Adrenorezeptor-Agonisten (Fliegel 1999) über Phosphorylierungswege auf den Transporter einwirken und ihn sensibler für H^+ -Ionen machen.

8 Isoformen wurden bisher gefunden, die sich, bis auf die Isoformen NHE 6 und 7, am Sarkolemm befinden. NHE 1 kommt ubiquitär in allen Zellen vor. Aus diesem Grund wird dieser Isoform eine zentrale Rolle in der pH-Regulation und Zellvolumenhomöostase zugesprochen (Orlowski und Grinstein 1997). In den Myokardzellen der Säugetiere ist NHE 1 vorherrschend.

1.3.1. Der strukturelle Aufbau des $\text{Na}^+\text{-H}^+\text{-Antiporters 1}$ und seine Lokalisation in der Zelle

Die NHE Isoform 1 ist ein Glykoprotein bestehend aus 815 Aminosäuren, einem Gesamtgewicht von 110kDa und aufgebaut aus 2 Domänen. Domäne 1 (500 Aminosäuren und 12 Segmente) mit dem N-terminalen hydrophoben Ende ist der transmembranöse Anteil und verantwortlich für den Ionenaustausch. Domäne 2 (315 Aminosäuren) enthält das COOH-Ende und ragt als hydrophiler Teil ins Zytoplasma. An dieser Stelle kann die Aktivierung des Transportproteins bei sinkenden pH-Werten erfolgen (Fliegel und Frohlich 1993, Orlowski und Grinstein 1997, Wakabayashi et al 1997, Kinsella et al. 1998).

Die zytoplasamtische Domäne 2 wird wiederum in 4 Subdomänen unterteilt. Subdomäne 1 ist in die ATP-abhängige Regulation mittels Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat involviert (Aharonovitz et al. 2000). Subdomäne 2 weist eine Bindungsstelle für ein Calcineurin

homologes Protein auf (Lin und Barber 1996), Subdomäne 3 bindet Calmodulin (Wakabayashi et al 1997) und Subdomäne 4 wird durch eine Protein-Kinase phosphoryliert und auf diesem Weg aktiviert (Moor und Fliegel 1999). Durch immunhistochemische Untersuchungen konnte der Transporter an der Z-Scheibe in der Nähe der *gap-junction* und in der Nähe der Transversalen Tubuli lokalisiert werden (Petrecca et al. 1999).

1.3.2. Der NHE 1-Inhibitor Cariporide[®] und sein kardioprotektiver Effekt

Cariporide[®] (HOE 642) ist 4-isopropyl-3-methylsulfonyl-benzoyl-guanidin-methansulfonat und spezifischer Inhibitor der NHE Isoform 1 (Scholz et al. 1995). Der neuartige NHE 1-Inhibitor Cariporide[®] ist ein Nachfolger des kaliumsparenden Diuretikums Amiloride, einem NHE-Inhibitor der ersten Generation mit noch mangelnder NHE 1 Spezifität und geringer Inhibitionspotenz (Karmazyn 1988). Cariporide[®] reduziert die Infarktgröße im Ischämie-Reperfusionmodell (Linz et al. 1998, Thompson et al. 2003), mindert die Hyperkontraktur (*hypercontraction*) (Klein et al. 2000) und senkt die Apoptoserate nach Myokardinfarkt (Otani et al. 2000). Cariporide[®] (HOE 642) reduziert den Ischämie-Reperfusionsschaden durch die Reduktion des zytosolischen Kalziums, ohne den intrazellulären pH-Wert nachteilig in Richtung Azidose zu verschieben (Avkiran 2003), verursacht aber eine signifikante Verzögerung der Realkalisierung während der Reperfusion (Portman et al. 2001). Es zeigt sich außerdem, dass Cariporide[®] über die Hemmung des leukozytenabhängigen entzündlichen Geschehens nach Ischämie und Reperfusion kardioprotektiv wirkt (Redlin et al. 2001). Cariporide[®] erhöht die Laktatclearance, verändert aber nicht die Laktatakkumulation während globaler Ischämie. Das schnellere Ausscheiden des Laktats könnte ebenfalls ein Grund für den kardioprotektiven Effekt sein (Lin et al. 2003).

Desweiteren senkt Cariporide[®] die Gefahr des Kammerflimmerns während Ischämie und Reperfusion. Es zeigte sich nämlich, dass eine verstärkte Aktivität des Na⁺-H⁺-Antiporters durch eine Verkürzung des Aktionspotentials während der frühen Reperfusionsphase das Herz anfällig für *reentry* Arrhythmien macht (Wirth et al. 2001). Cariporide[®] wäre folglich ein geeignetes Mittel, um bei Reanimation Kammerflimmern zu vermeiden (Gazmuri et al. 2001, Wann et al. 2002).

Man nimmt an, dass der Na⁺-H⁺-Antiporter am molekularen Pathomechanismus der kardialen Hypertrophie mitbeteiligt ist. Eine NHE 1 Inhibition wäre somit eine potentielle Therapie zur Prävention des *remodeling* und der Hypertrophie und folglich ein geeignetes Mittel zur Prävention des Herzversagens nach Myokardinfarkt (Yoshida und Karmazyn 2000). Bei chronischer Stimulation der β_1 -Zellen, was bekanntlich zur Hypertrophie mit sukzessivem Herzversagen führt, soll NHE 1 essentiell für die Schädigung des Myokards sein (Engelhardt et al. 2002, Baartscheer et al. 2003). Eine Langzeitexposition gegenüber Mineralokortikoiden verursacht Herzfibrose und Hypertrophie. Auch dieser Mechanismus konnte durch Cariporide[®] verhindert werden (Fujisawa et al. 2003).

Die Verabreichung von Cariporide[®] wurde bereits klinisch getestet. *The Guard During Ischemia Against Necrosis (GUARDIAN) trial* untersuchte, ob Cariporide[®] die Mortalität und das Wiederauftreten eines Myokardinfarktes derer senkt, die ein erhöhtes Risiko für myokardiale Nekrosen hatten. Desweiteren wurde die Sicherheit und Tolerabilität geprüft. Einen sicheren Benefit ergab sich nur für Patienten nach koronarer *Bypass* Operation. Hierbei wurde bei einer Dosis von 120mg Cariporide[®] alle acht Stunden eine Verminderung der Mortalität und der Myokardinfarktinzidenz erreicht (Chaitman 2003). Keinen kardioprotektiven Effekt zeigte die Studie ESCAMI. Hier verabreichte man Eniporide als Zusatz in der Reperfusionsphase nach Myokardinfarkt (Avkiran und Marber 2002).

Gegen die regelmäßige Einnahme des Inhibitors spricht eine mögliche *Up*-regulation des Na⁺-H⁺-Transporters bei chronischer Behandlung mit NHE-Inhibitor 1 Cariporide®. Somit bestünde die Gefahr einer übersteigerten Reaktion bei Aktivierung (Camilion de Hurtado et al. 2002). Zusätzlich führen Thompson et al. an, dass Cariporide® zwar die frühe Wiederherstellung der Herzmuskelfunktion nach Ischämie und Reperfusion verbessert indem es die Normalisation des pH Wertes verzögert, sich aber nicht auf die Langzeitverbesserung der Myokardfunktion auswirkt. Sie beobachteten eine 10 tägige Reperfusion nach zweistündiger Ischämie am Hundeherzen (Thompson et al. 2003).

2. Fragestellung

Diese experimentelle Arbeit untersucht den Einfluss des spezifischen Calpaininhibitors A-705253 als alleiniges Pharmakon auf die Schädigung des Herzmuskels zu Beginn der Reperfusionphase und in Kombination mit dem Na⁺-H⁺-Antiporter-Inhibitor Cariporide[®]. Am Versuchsmodell des isoliert perfundierten Kaninchenherzen nach Langendorff wird eine linksventrikuläre Ischämie durch Verschluss eines Koronarastes provoziert. Geprüft werden soll der Einfluss der beiden Inhibitoren in unterschiedlicher Konzentration und Kombination auf die Ausdehnung der Infarktnekrosezone (totes Gewebe) im Vergleich zum gesamten von der Durchblutung ausgeschlossenen Bereich (*area at risk*). Hierbei soll außerdem die linksventrikuläre Druckentwicklung, das Verhalten der Herzfrequenz und die Freisetzung der Laktatdehydrogenase, Kreatinkinase und der Kaliumionen untersucht werden. Der besondere Schwerpunkt dieser Arbeit wird auf die Gabe der Inhibitoren zu Beginn der Reperfusionphase gelegt; im Hinblick auf die größere klinische Relevanz einer postischämischen Infarkttherapie.

3. Material, allgemeine und spezielle Methoden

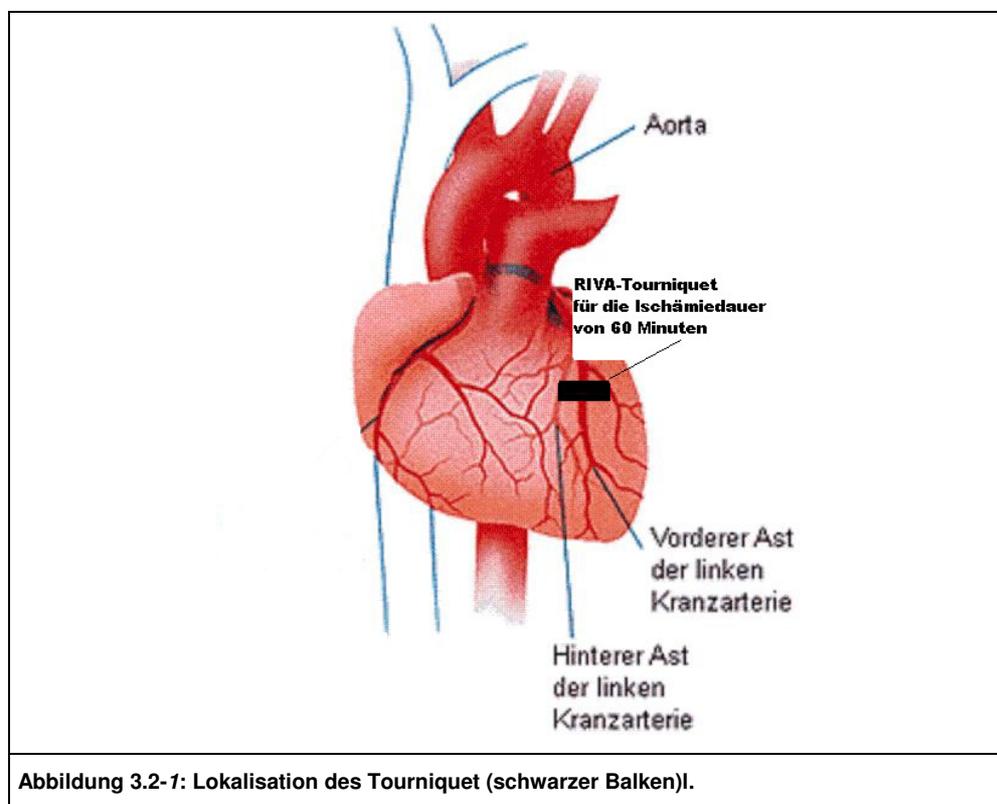
3.1. Versuchstiere

Als Organspender dienten 75 Bastard-Kaninchen beiderlei Geschlechts mit einem Körpergewicht von 2,8 bis 3,2 kg. Die Versuchstiere wurden über die Firma Behring-Werke Marburg bezogen. Die Organentnahmen wurden dem Regierungspräsidium Gießen angezeigt und gemäß dem Tierschutzgesetz durchgeführt.

3.2. Präparationsmethode zur Organentnahme

Zur Koagulationsprophylaxe wurde den Kaninchen 1000 I.E. Heparin pro kg Körpergewicht (Liquemin[®], Hoffmann-La Roche AG) über die Ohrtrandvene injiziert. Daraufhin folgte die Gabe von etwa 1ml 0,25%iger Narcoren[®]-Lösung (Pentobarbital-Natrium, Merial GmbH, Halbergmoos) zur leichten Sedierung ohne Atemdepression. In Rückenlage auf dem Präparationstisch fixiert, wurde die Kehlkopfregion der Kaninchen mit Xylocain[®] (Astra Chemicals GmbH, Wedel, Lidocain) überspritzt. Nach kurzer Einwirkzeit des Lokalanästhetikums konnte die Luftröhre freigelegt und ein Tubus unterhalb des Ringknorpels eingeführt werden. Die kontinuierliche Beatmung mit Raumluft (40 Atemzüge/Minute, 25ml Atemzugvolumen, PEEP von 1cm H₂O) erfolgte über eine Starling-Pumpe (Fa. Braun Melsungen). Die beatmeten Kaninchen wurde nun bis zur Reaktionslosigkeit mit 0,25%iger Narcoren[®]-Lösung sediert. Nachdem die Bauchdecke mit einem kleinen Schnitt knapp unterhalb des Xiphoids eröffnet, das Peritoneum durchtrennt und die Aa.mammillariae abgeklemmt waren, wurde der Thorax eröffnet. Die Thorakotomie erfolgte durch einen beiderseitigen Rippenbogenrandschnitt, ventro-laterale Diaphragma-Ablösung und mediane Sternotomie. Im Anschluss daran wurden die großen Gefäße freipräpariert, die Vv.cavae sowie die Aorta mit einem Faden angeschlungen, das Perikard inzidiert und zum Teil reseziert. Sodann wurde der Katheterschlauch zur retrograden aortokoronaren Perfusion, gefüllt

mit 4°C kalter Kardioplegie nach Brettschneider (Custodiol[®], Dr. Köhler Chemie GmbH, Alsbach), in die inzidierte Aorta ascendens eingeführt, wobei zuvor die Vv. cavae fest ligiert und nach Einbinden des Schlauches Entlastungsschnitte in die V. pulmonalis und in die Lunge gesetzt wurden. Nachdem die Herzaktionen erloschen waren, wurden Herz und Lunge hinter der Trachea entlang der Wirbelsäule freipräpariert und Hohlvenen sowie Trachea durchtrennt. Die Fixation des Herzens in der Apparatur wurde zum einen durch eine Krokodilklemme im herznahen Bindegewebe und zum anderen durch den Perfusionsschlauch gewährleistet. Nun folgte die Abpräparation der Lunge entlang der Trachea, die Eröffnung des linken Vorhofs im NaCl-Bad, die Entfernung der Mitralklappen und die Einführung eines komprimierten Latex-Ballons (Größe 12, Volumen 1,3ml, Hugo Sachs Elektronik KG, March) in den linken Ventrikel. Zur späteren Ligatur des Ramus interventrikularis anterior (RIVA) direkt unterhalb des Abgangs des ersten Diagonalastes wurde dieser bereits zu diesem Zeitpunkt mit Nahtmaterial Mersilene[®] (SH 26mm, 1/2c Ethicon[®], Johnson and Johnson.) angeschlungen.



Anschließend wurde das Herz in einen Organbehälter mit einer Volumenkapazität von 40ml eingetaucht, der wiederum in einen Wärmebehälter (37,5°C) überführt wurde. Nun wurde der Katheterschlauch mit dem übrigen Perfusionssystem verbunden und das isolierte Herz mit 70mmHg perfundiert. Bis zu diesem Zeitpunkt waren etwa 20 – 30 Minuten vergangen, wobei die durchschnittliche Kardioplegiezeit etwa 4 – 5 Minuten in Anspruch nahm. Zum kontinuierlichen Monitoring wurde ein bipolares EKG mit einer Elektrode an der Krokodilklemme und einer zweiten Elektrode im Perfusatbad auf Höhe der Herzspitze angebracht. Sobald die Temperatur, gemessen im Organbehälter, auf 33°C angestiegen war, wurde der Ballon mit einer Vorlast von 7mmHg gebläht und bei 37°C die Versuchsdokumentation begonnen.

Verwendet wurden Schlauchsysteme aus Polyethylen (Bentley By Pass[®], Tubings Inc.) und Silikon (Deutsch und Neumann).

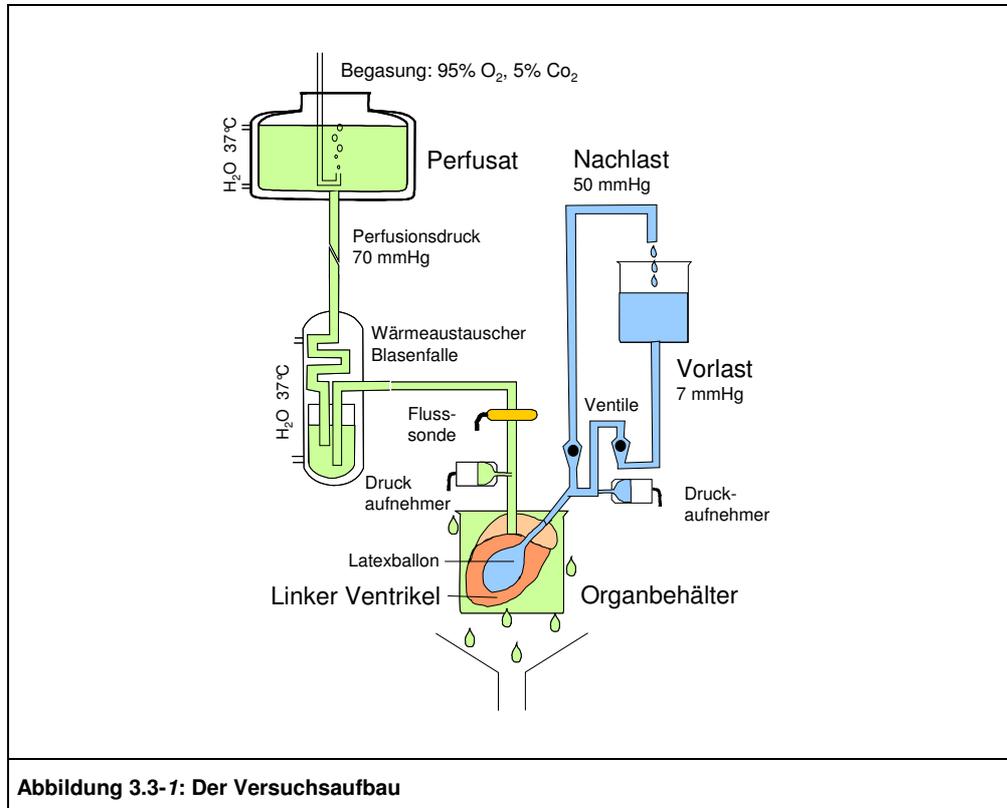
3.3. Versuchsmodell des isoliert perfundierten Herzen

Als Vorlage unseres Versuches diente das von Langendorff entwickelte Herzmodell. Hierbei ist es möglich, den *Flow* (Durchfluss pro Zeit) oder den Druck konstant zu halten. Da der *Flow* umgekehrt proportional zum Gefäßradius, damit ein Messparameter für den Gefäßwiderstand und somit ein Ischämieindikator ist, wurde mit einem konstanten Druck von 70mmHg perfundiert.

Der Perfusionskatheter wurde mit einem Combitrans[®] Monitoring-Set (Fa.Braun, Melsungen) zur Aortenperfusionsdruckmessung verbunden. Mit Hilfe dieses Messwertes des geeichten Elektromanometers wurde die Höhe des Perfusatbehälters angepasst und ein hydrostatischer Druck von 70mmHg zur Versorgung des Herzens eingestellt.

Ein *Bubbler* zur Anreicherung der Flüssigkeit mit O₂ und CO₂ sorgte für einen Sauerstoffpartialdruck von 500 - 600 mmHg und ein variabler Kohlenstoffdioxidpartialdruck für einen konstanten pH von 7,4 - 7,45. Partialdruck- und pH-Messungen wurden in regelmäßigen

Abständen mit dem ABL 330 (Radiometer GmbH, Kopenhagen, Willich) durchgeführt. Zwischen dem Perfusatbehälter und dem Perfusatkatheter im Aortenstumpf befand sich eine Blasenfalle und ein *Flowmeter* (Messkopf: *Blood Flow Transducer* 300A, Fa. Empco, USA; Verstärker: *Blood Flowmeter* SP 2202, Fa. Gould, USA) zur phasischen Durchflussmessung basierend auf dem Messprinzip der elektromagnetischen Induktion. In diesem Experiment wurde eine Variante des Langendorff-Modells, das „*working heart*“ nach Bardenheuer und Schrader (Bardenheuer und Schrader 1983) angewandt, da sich dieses Verfahren in Vorversuchen als schonender erwiesen hatte (weniger Herzversagen und Kontraktionen) als die klassische Langendorff Methode. Hierzu wurde der über den linken Vorhof und Mitralklappe in den linken Ventrikel eingeführte Ballon über einen Katheter und eine Ventileinheit mit einem mit Wasser gefüllten, geschlossenen, extrakorporalen Kreislaufsystem verbunden.



Während der Ventrikelkontraktion entleerte sich der mit Wasser gefüllte Ballon über ein höhenverstellbares Steigrohr in ein höhenverstellbares Reservoir, wobei sich das Ventil zum Steigrohr hin öffnete und das zum Reservoir hin schloss. Aus diesem Reservoir wurde der Ballon bei jetzt umgekehrtem Ventilverhalten während der Diastole gefüllt. Die Nachlast (*after load*) wurde auf 50mmHg und die Vorlast (*preload*) auf 7mmHg, durch Höhenverstellung von Steigrohr bzw. Reservoir, eingestellt. Bei systolischen linksventrikulären Drücken über 50mmHg entsprach somit das Kontraktionsverhalten einer auxotonischen Kontraktion. Bei Drücken unter diesem Druckniveau einer isovolumetrischen Kontraktion. Der linksventrikuläre Druck wurde kontinuierlich über einen mit dem Ballonkatheter seitlich verbundenen Druckwandler (Combitrans[®], Fa. Braun, Melsungen) aufgenommen.

Das Perfusat floss aus dem Katheter in die Koronarien und bis zum Sinus coronarius im eröffneten rechten Ventrikel. Von dort gelangte es in den Organbehälter, in dem das Herz frei beweglich aufgehängt war. Um den Organbehälter befand sich ein Glasbehälter mit einer Öffnung, durch die das Perfusat in großen Standzylindern aufgefangen, die Menge pro Zeit gemessen⁶ und die Proben für die Enzymbestimmung gewonnen wurden. Der Rest wurde verworfen.

Die doppelwandigen Gefäße zur Thermostabilisierung, bestehend aus dem Glasbehälter um den Organbehälter, dem Perfusatreervoir und der Blasenfalle wurden mit Aqua dest. durchströmt und durch ein Thermostatsystem (Thermomix UB, Fa. Braun, Melsungen) auf konstante 37°C erwärmt.

Aortenperfusionsdruck, Ventrikelkontraktionsamplitude, *Flow* und EKG wurden kontinuierlich erfasst und mit Hilfe eines Acht-Kanal-EKG-Schreibers UD210 (Uniscript, Fa. Picker, München) registriert.

⁶ Die Messung der Perfusatsmenge pro Zeit diente der Kontrolle des *Flowmeters*.

3.3.1. Perfusionslösung

Das Perfusat, eine Krebs-Henseleit-HAES-Pufferlösung, wurde aus vier Stammlösungen unter Zusatz von Pyruvat (Pyruvatnatriumsalz) angesetzt und während des Versuchs mit Hilfe der CO₂-Zufuhr auf konstante pH Werte von 7,4 - 7,45 gehalten.

Zusammensetzung des Krebs-Henseleit-HAES Puffers	
Hydroxyethylstärke 10 %	650ml
Glucose 10 %	25ml
Natriumbicarbonat 0,9 %	86,6ml
Pyruvat	0,5g
Elektrolytlösung*	200ml
*Zusammensetzung der Elektrolytlösung:	
NaCl	7,16g/l Aqua dest.
CaCl ₂ ·2H ₂ O	1,75 g/l Aqua dest.
KH ₂ PO ₄	0,75g/l Aqua dest.
MgCl ₂ ·6H ₂ O	1,35 g/l Aqua dest.
KCl	1,26 g/l Aqua dest.

Tabelle 3.3.1-1: Die Perfusionslösung

3.4. Versuchsmonitoring

3.4.1. Kontinuierliches Monitoring

Folgende Parameter wurden während der Versuche mit Hilfe der Druckmesseinheit und des Acht-Kanal-EKG-Schreibers UD210 kontinuierlich gemessen und registriert:

- Herzfrequenz (hr; Schläge/min)
- Systolischer Blutdruck (p_{sys} ; mmHg)
- Diastolischer Blutdruck (p_{dia} ; mmHg)
- Aortenperfusionsdruck (pp; mmHg)
- Koronardurchblutung (*Flow*; ml/min)

Ausgewertet wurden die Messprotokolle dann zu 15 definierten Versuchszeitpunkten⁷ und mit Hilfe von Statgraphics Plus für Windows 3.1 statistisch aufgearbeitet.

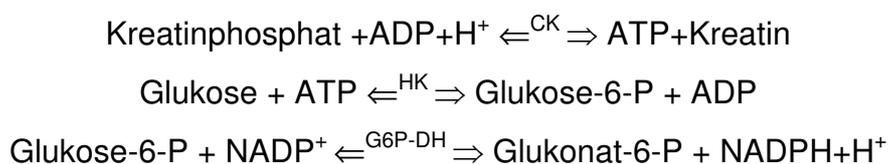
Im Organbehälter wurde überdies die Temperatur (temp; °C) mit Hilfe eines Thermometers (Testotherm, 1100 sec-thermometer) erfasst.

3.4.2. Diskontinuierliches Monitoring

Präkardiale Perfusatproben zur pH-, PO₂-und PCO₂-Analyse wurden in regelmäßigen Abständen, sieben mal pro Versuch, entnommen und mit Hilfe des Blutgasanalysegerätes ABL 330 (Radiometer GmbH, Willich) ausgewertet. Die Entnahme der postkardialen Proben zur Bestimmung der Kaliumionenkonzentration (K⁺) sowie der Aktivität der Herzenzyme Laktatdehydrogenase (LDH) und Kreatinkinase (CK) erfolgte zu vier festgelegten Zeitpunkten (Abbildung 3.8.-1); die Proben wurden zur späteren Auswertung bei -25°C eingefroren.

3.4.3. Bestimmung der Kreatinkinase-Aktivität

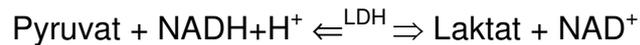
Die in vitro Auswertung der Kreatinkinaseaktivität (CK) erfolgte im Institut für Klinische Chemie mit der Standardmethode 94 nach den Empfehlungen der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie (1977) und der *International Federation of Clinical Chemistry* (1990). Der klinisch-chemische Analyseautomat (Boehringer Mannheim/Hitachi) misst photometrisch die Entstehung von NADPH+H⁺, das nach folgender Reaktionsgleichung der CK-Aktivität proportional ist:



⁷ Minute 0, 10, 20, 35, 50, 65, 80, 90, 95, 110, 140, 150, 170, 200 und 210.

3.4.4. Bestimmung der Laktat-Dehydrogenase-Aktivität

Die in vitro Auswertung der Laktat-Dehydrogenase (LDH) erfolgte ebenfalls im Institut für Klinische Chemie mit der „Optimierten Standard-Methode“ nach den Empfehlungen der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie (1972) mit Hilfe des klinisch-chemischen Analyseautomaten (Boehringer Mannheim/Hitachi) nach folgender Formel:



Die $\text{NADH} + \text{H}^+$ Abnahme kann photometrisch bestimmt werden und ist proportional zur LDH-Aktivität.

3.4.5. Bestimmung des Kaliumionenkonzentration

Mit Hilfe des Hitachi-917-Analysesystems wurde die Kaliumionenkonzentration (K^+) in der Perfusionslösung bestimmt. Die Kalium-Methode basiert auf der indirekten Potentiometrie mit einer ionenselektiven Elektrode (ISE) und nachfolgender Berechnung der Ionenkonzentration entsprechend der Nernst-Gleichung. Die mit ISE-Puffer gemischte Lösung wandert durch die für Kaliumionen selektive Elektrode. Das gemessene Potential wird mit dem konstanten Potential einer Referenzelektrode verglichen und so der Analogwert für diese Probe abgeleitet.

3.5. Inhibitoren und Reagenzien

3.5.1. Calpaininhibitor A-705253

Der Calpaininhibitor A-705253 (Abott GmbH & Co. KG, Ludwigshafen, Germany) wurde von Lubisch et al. (2003) synthetisiert und gehört zur Klasse der nicht-peptischen Calpaininhibitoren, bei denen es sich um vom Benzoylalanin abgeleitete Ketoamide mit Vinylbenzylamino-Resten handelt. Der Inhibitor ist gut wasserlöslich, zellpermeabel, metabolisch stabil und oral verfügbar. A-705253 hemmt Calpain in nanomolaren Konzentrationen mit einem K_i von $27 \pm 2,5$ nM und Cathepsin B und

L mit einem K_i von 62 ± 9 bzw. 149 ± 15 nM. Hefe-Proteasom, Papain und humane ICE/Caspase1 werden bei Konzentrationen bis $10 \mu\text{M}$ nicht inhibiert. Nach guter Zellpenetration sind die Inhibitoren sofort intrazellulär verfügbar. Der Plasmaspiegel nach oraler Applikation verhält sich linear zur Dosis und es zeigt sich eine 5 – 10 fache Anreicherung in Herz, Leber, Lunge und Nieren gegenüber dem Plasmaspiegel.

3.5.2. Cariporide[®]

Cariporide[®] (4-isopropyl-3-methylsulfonyl-benzoylguanidin-methansulfonat), ein Na^+ - H^+ -Antiporter-Inhibitor (Scholz et al. 1999), wurde von der Hoechst-Marion-Roussel AG (Frankfurt/Main, Germany) entwickelt und zur Verfügung gestellt.

3.5.3. Evans Blue

Evans Blue, eine wasserlösliche Diazo-Verbindung, die fest an Plasmaalbumin bindet und nur langsam das Gefäßsystem verlässt, wurde von Merck & Co. (NJ, USA) bezogen.

3.5.4. 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid

2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid, ein zellpermeabler Reduktionsindikator zum Nachweis von Dehydrogenasen in vitalen Zellen (Jestädt und Sandritter, 1959), wurde von Sigma-Aldrich (München, Germany) geliefert.

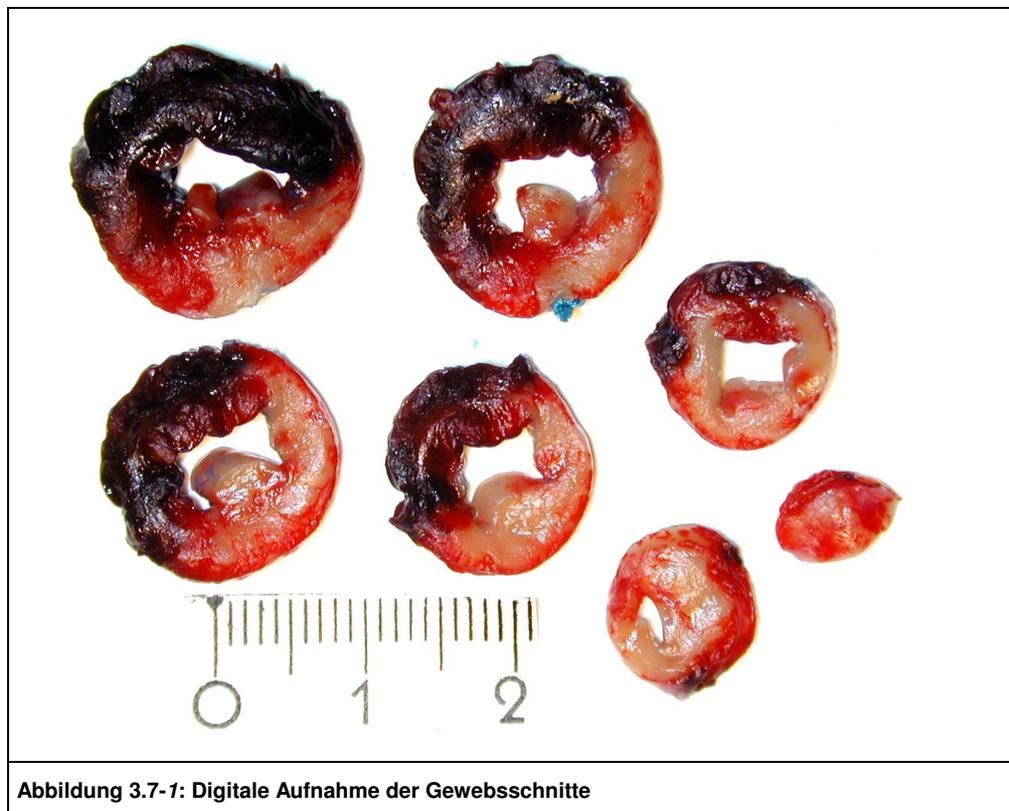
3.6. Anfertigung und Färbung von Gewebsschnitten

Nach 120-minütiger Reperfusion und nachfolgender 10-minütiger Perfusatabnahme wurde zur Versuchsbeendigung die Perfusion gestoppt und erneut der Ramus interventrikularis der linken Koronararterie mittels des noch liegenden Tourniquets unterbunden. Über den in die Aorta ascendens eingebundenen Perfusionskatheter wurden dann 5ml Evans blue 0,5 % (in Aqua dest. gelöst) unter einem Druck von 70mmHg zur Färbung des Myokards injiziert, das nicht von der vorausgegangenen Perfusionsunterbrechung

betroffenen war. Anschließend wurde der linke Ventrikel vom rechten Ventrikel und den Vorhöfen getrennt und von der Herzspitze zur Basis in 7 - 8 waagerechte Scheiben von ca. 3mm Dicke zerlegt, die dann zur Differenzierung von abgestorbenem und überlebendem Gewebe im Infarktareal für 15 Minuten bei 37°C in 2,3,5 Triphenyltetrazoliumchlorid 1 % (in Phosphatpuffer 0,01 mmol/l, pH 7,4) inkubiert wurden. Die verwendete Methode beruht auf grundlegenden, klinisch-pathologischen und experimentellen Studien von Jestädt und Sandritter (1959), Nachlas und Schnitka (1963), Klein et al. (1981), Fishbein et al. (1981) und Ytrehus et al. (1994). Nach Ablauf der Färbepériode wurde mit Filterpapier das noch anhaftende Inkubationsmedium von den Herzschnitten entfernt und diese beidseitig mit einer Digitalkamera (Coolpix 950, Nikon Corp., Tokyo, Japan) auf weißem Hintergrund zur weiteren Bearbeitung fotografiert.

3.7. Optische Auswertung der Gewebsschnitte

Die Auswertung der digitalen Aufnahmen erfolgte am Computer.



In dunkelblauer Farbe (durch Evans blue) stellt sich der nicht von der Perfusionsunterbrechung betroffene Gewebsbereich (*non-risk area*) dar. In dem mit 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid inkubierten Gewebe färbt sich das tote Gewebe blassgelb (Infarkt-/ Nekrose-Bereich) und das überlebende Gewebe rot. Die Auftrennung der Gewebsschnitte in die drei Farbbereiche erfolgte mit Hilfe des Programms Paint Shop Pro 6 (Jasc Software inc., Eden Prairie, MN, USA) und ihre Planimetrie mit Hilfe von Image J (National Institute of Health, USA). Es wurden jeweils Vor- und Rückseiten der Schnitte ausgewertet und die jeweiligen Farbflächen addiert. Das Infarktareal (blassgelbes, totes Gewebe) wurde in Prozent des vom Infarkt bedrohten Areals (*area at risk* = blassgelbes + rotes Gewebe) ausgedrückt.

3.8. Versuchsdurchführung

Sechs Versuchsreihen (VR1-6) wurden nach folgendem Schema durchgeführt:

Versuchsreihenübersicht			
VR1	n=10	60min Ischämie	Keine Inhibitorgabe
VR2	n=10	60min Ischämie	A-705253 10^{-8} M ab der 80.min
VR3	n=10	60min Ischämie	A-705253 10^{-7} M ab der 80.min
VR4	n=10	60min Ischämie	A-705253 10^{-6} M ab der 80.min
VR5	n=9	60min Ischämie	Cariporide® 10^{-6} M ab der 80.min
VR6	n=11	60min Ischämie	A-705253 10^{-6} M + Cariporide® 10^{-6} M ab der 80.min

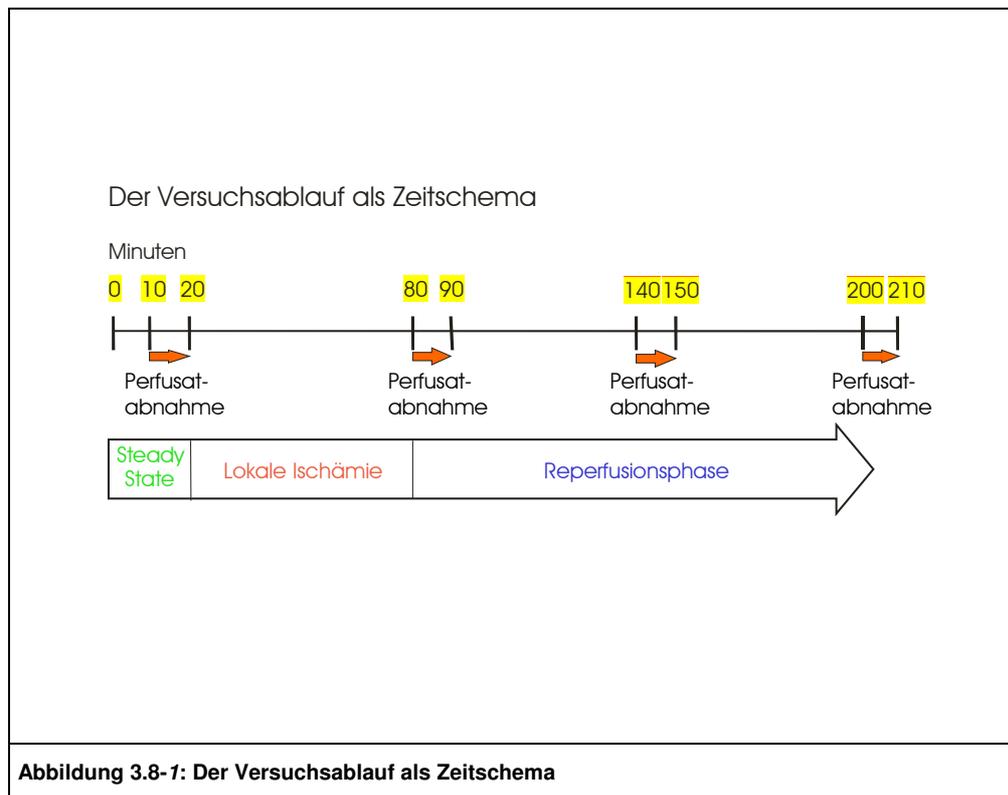
Tabelle: 3.8-1: Versuchsreihenübersicht

Insgesamt belief sich die Anzahl der Versuche auf 60.

VR1 wurde einer 60-minütigen Ischämie ohne Inhibitorgabe ausgesetzt, um die unbeeinflusste Regenerationsfähigkeit des Herzmuskels mit der Inhibitorwirkung vergleichen zu können.

Die Versuchsdokumentation begann, sobald eine Temperatur von 37°C erreicht war, der pH zwischen 7,4 und 7,45 und der PO₂ bei 500 - 600mmHg lag, mit der Versuchszeit 0 Minuten. Zwischen

Versuchsbeginn und Beginn der Ischämie lag eine 20 minütige *steady-state*-Phase (Messparameter innerhalb definierter Grenzen). In der 20. Minute wurde der Ramus interventrikularis anterior der linken Koronararterie (LAD) direkt unterhalb des Abgangs des ersten Diagonalastes mittels eines Tourniquets fest ligiert und so $42,4 \pm 1,3\%$ des linken Ventrikels einer Ischämie ausgesetzt.



Nach einer Stunde wurde das ligierte Gefäß eröffnet und mit der Inhibitorgabe über die Perfusatlösung begonnen. Beendet wurde der Versuch in der 200. Minute. Eine letzte Perfusatabnahme erfolgte noch bis zur 210. Minute.

Versuche, die vor der Inhibitorgabe wegen Kammerflimmern, Asystolie oder einem linksventrikulären Druck unter 60mmHg abgebrochen werden mussten, fielen nicht in die Auswertung. Nicht in die Wertung fielen auch die Versuche, die nach erfolgreicher Beendigung des Versuches wegen zu dunkler digitaler Aufnahme und somit wegen eines technischen Fehlers morphologisch nicht beurteilbar waren. Die Anzahl der Versuche, die während der

Inhibitorgabe wegen Kammerflimmern, Asystolie oder zu geringem Druck beendet werden mussten, wurde registriert. Diese Ausfallquoten wurden statistisch ausgewertet. Eine planimetrische Aufarbeitung jener Versuche erfolgte nicht

Die Abnahme des postkardialen Perfusats zur Bestimmung der Herzenzyme (CK und LDH) erfolgte vier mal in Sammelperioden von jeweils zehn Minuten (siehe Abbildung 3.8-1: Der Versuchsablauf als Zeitschema). Das gewonnene Perfusat wurde in Eppendorf-Hütchen bei -25°C eingefroren und am Ende der Versuchsreihen im Institut für Klinische Chemie ausgewertet.

3.9. Statistische Methoden

Die statistische Analyse wurde mittels einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA) und nachfolgendem Fisher's multiple-comparison Test (least significant differences, LSD) mit Hilfe des Programmes Statgraphics Plus für Windows 3.1 durchgeführt. Die Ergebnisse sind dargestellt durch Mittelwert \pm Standardfehler (SE). Ein p-Wert < 0.05 wurde als signifikant gewertet. Die graphische Aufarbeitung erfolgte mit dem Programm Stanford Graphics Version 3.0.

4. Ergebnisse

4.1. Ausschluss von Experimenten

Versuchsreihe	Anzahl der Experimente	Ausschlüsse wegen Arrhythmien oder Kammerflimmern	Ausschluss aufgrund technischer Mängel ⁸	Anzahl der Versuche in der Endauswertung
VR1 (Kontrolle)	10	2	0	8
VR2 (A-705253 10 ⁻⁸)	10	2	0	8
VR3 (A-705253 10 ⁻⁷)	10	2	0	8
VR4 (A-705253 10 ⁻⁶)	10	2	1	7
VR5 (Cariporide®)	9	1	1	7
VR6 (A-705253 10 ⁻⁶ +Cariporide®)	11	3	0	8

Tabelle 4.1-1: Ausschlussübersicht

48 Versuche wurden bezüglich systolischem Druck, *Flow*, Herzfrequenz, der Aktivität Herzenzyme und Kaliumionenkonzentration ausgewertet. Aufgrund technischer Mängel konnten nur 46 Versuche planimetrisch berücksichtigt werden. Statistisch ergab sich hierbei kein Unterschied zwischen den einzelnen Kollektiven.

4.2. Systolischer linksventrikulärer Druck

Unmittelbar nach dem Verschluss des Ramus interventrikularis anterior fiel bei allen perfundierten Herzen ($n = 48$) der systolische Druck im Mittel signifikant ($p < 0,01$) um 26,3 % des Ausgangswertes im *steady state* von $81,4 \pm 2,1$ auf $69,0 \pm 2,0$ mmHg ab.

⁸ Die digitalen Aufnahmen waren zu dunkel, so dass eine Auftrennung in die drei Farbbereiche nicht möglich war.

Mit der Reperfusion kam es jedoch nicht mehr zu einem Wiederanstieg des auf signifikant unterschiedliche Höhen abgesunkenen Ventrikeldruckes, der im weiteren Verlauf kein unterschiedliches Verhalten zwischen den Versuchsreihen zeigte. Die höchsten Druckwerte erreichte Versuchsreihe sechs (A-705253 10^{-6} + Cariporide[®]) während Versuchsreihe fünf (ausschließlich Cariporide[®]) die niedrigsten Ventrikeldrücke erzeugte.

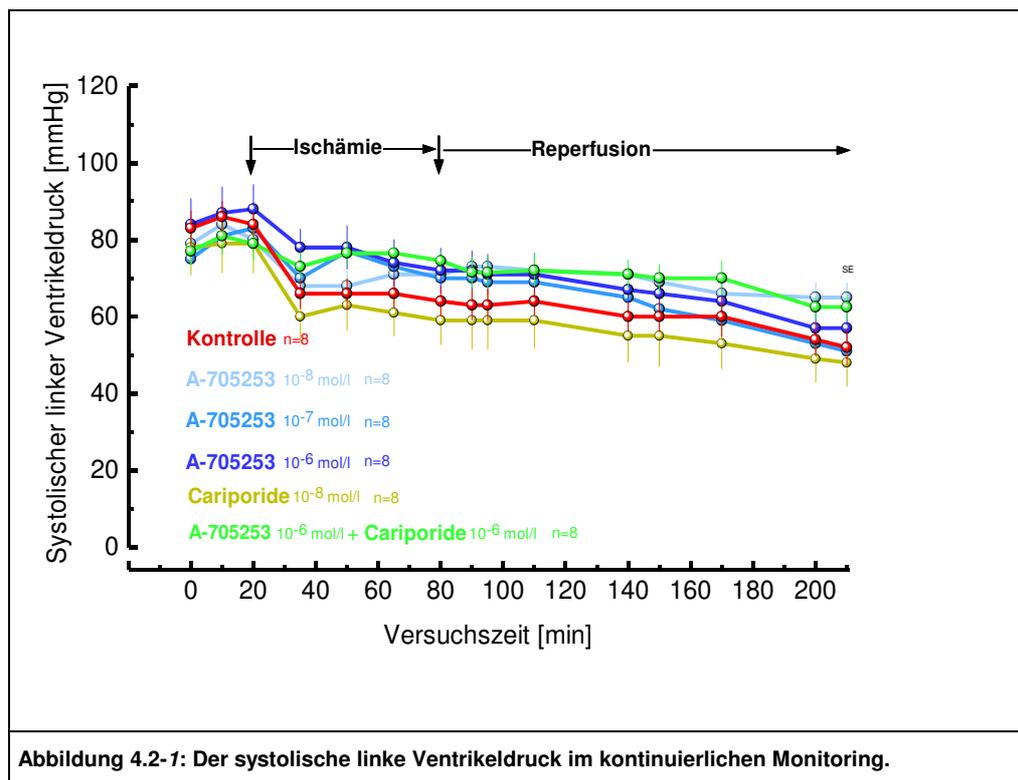
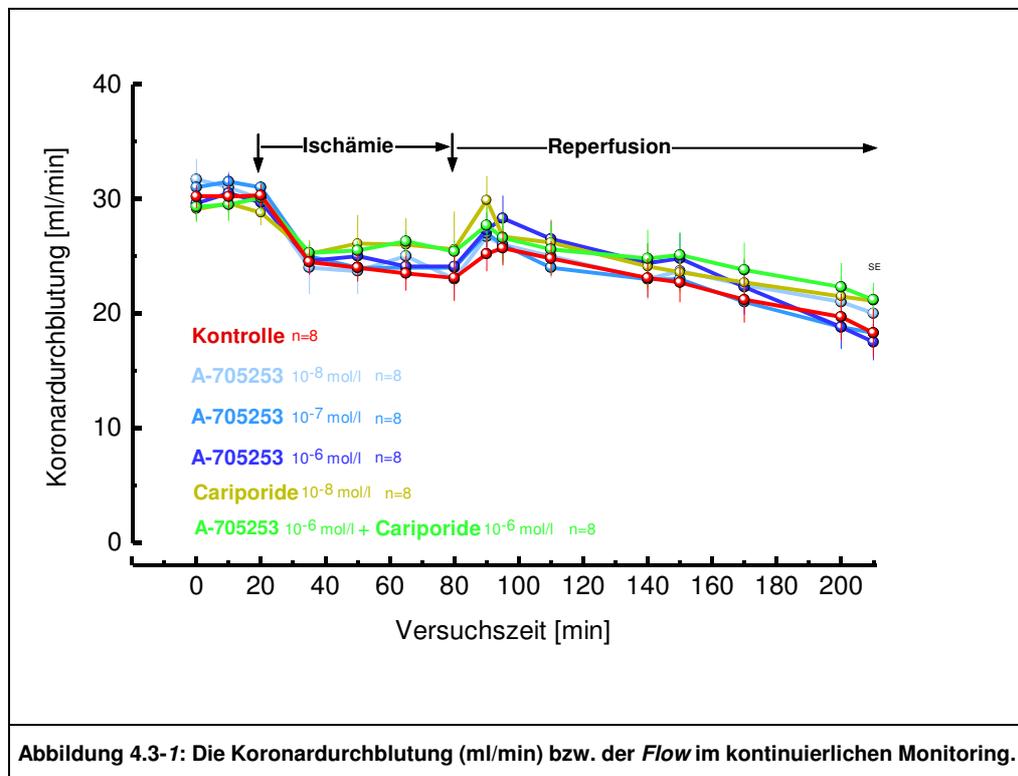


Abbildung 4.2-1: Der systolische linke Ventrikeldruck im kontinuierlichen Monitoring.

4.3. Koronardurchblutung (*Flow*)

Der Verschluss des Ramus interventricularis anterior verursachte bei allen perfundierten Herzen ($n = 48$) im Mittel einen akuten, signifikanten ($p < 0,01$) Abfall der Koronardurchblutung um 16,9 % von $29,7 \pm 0,6$ auf $24,7 \pm 0,5$ ml/min. Mit Beginn der Reperfusion stieg diese sofort wieder ($p < 0,01$) um 6,7 % von $24,5 \pm 0,7$ zur 80. Minute auf $26,2 \pm 0,7$ ml/min zur 90. Minute hin an. Bis Versuchsende

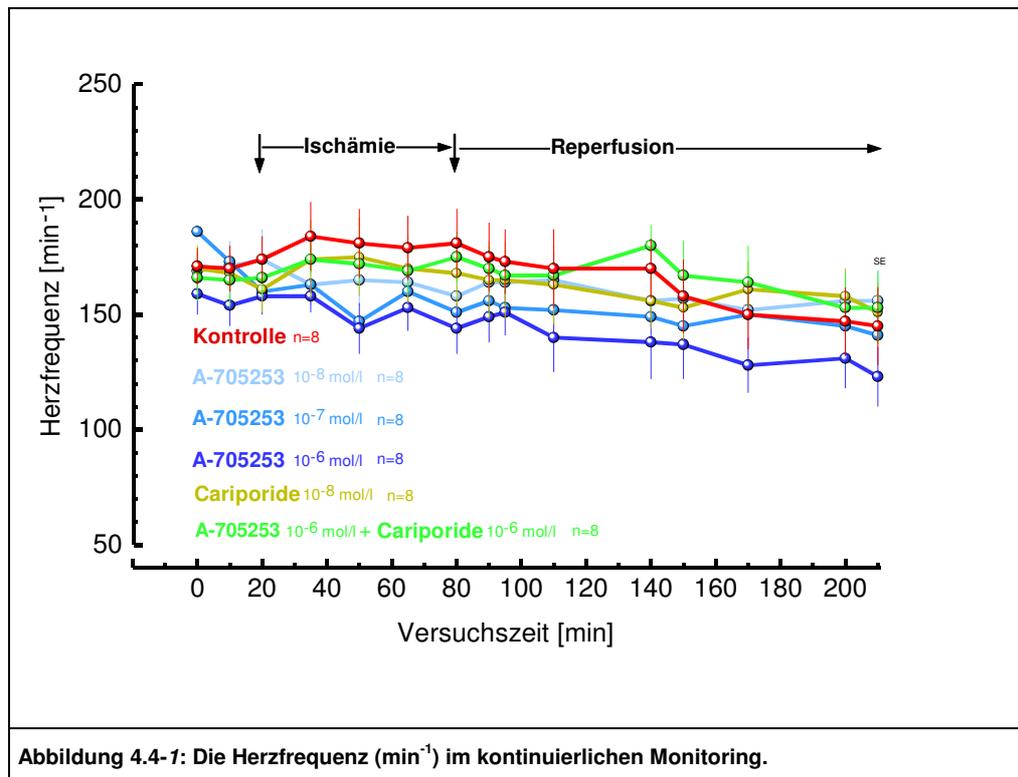
reduzierte sich die Koronardurchblutung auf Werte zwischen 18,3 und 21,1 ml/min. Es fand sich kein statistischer Unterschied im Verhalten der Koronardurchblutung zwischen den einzelnen Versuchsgruppen.



4.4. Herzfrequenz

Während der Experimente schlugen die perfundierten Herzen mit einer Frequenz im *steady state* zwischen 186/min und 154/min. Bis Versuchsende war ein Rückgang der Werte auf 156/min bis 123/min

zu verzeichnen. Im Frequenzverlauf fanden sich keine statistischen Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen.



4.5. Aktivität der Herzenzyme und Konzentration der Kaliumionen

Mit beginnender Reperfusion stiegen in allen Perfusatproben die Aktivitäten der Laktatdehydrogenase und der Kreatinkinase signifikant ($p < 0,001$) im Mittel um Werte zwischen 28,8 und 57,3 U/l für die Laktatdehydrogenase und zwischen 65,0 und 109,8 U/l für die Kreatinkinase an. Im Vergleich zu übrigen Versuchsgruppen wies Versuchsgruppe sechs (A-705253 10^{-6} + Cariporide[®]) eine signifikant ($p < 0,05$) geringere Freisetzung von Laktatdehydrogenase auf. Sonst ergab sich bei der großen Streuung der Messwerte kein

statistischer Unterschied zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen

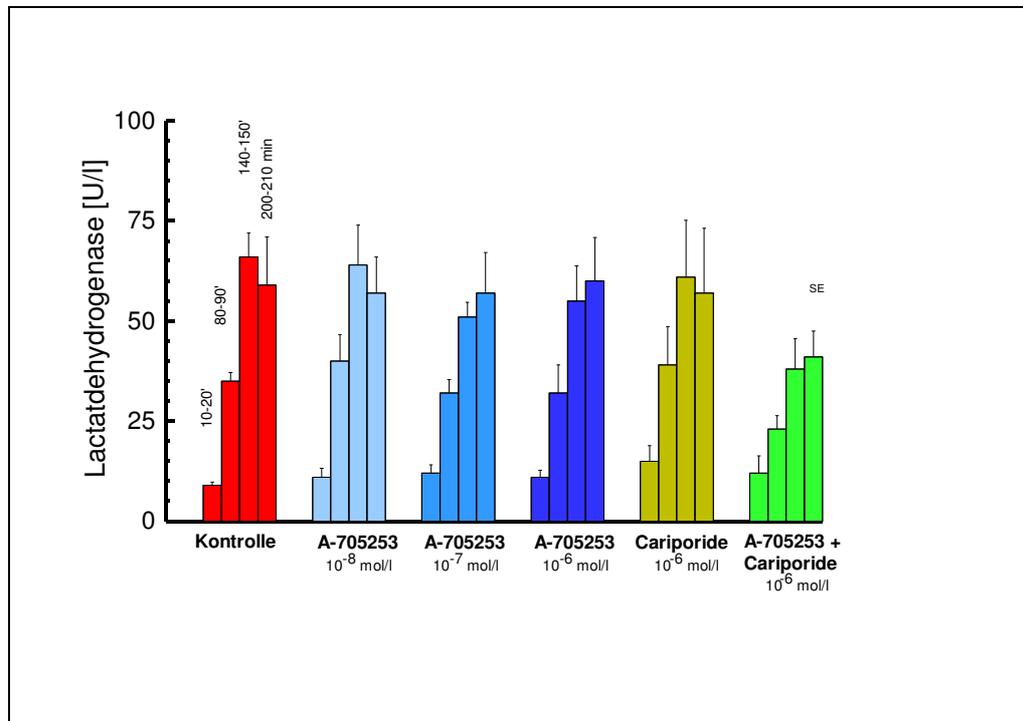


Abbildung 4.5-1: Die Freisetzung der Laktatdehydrogenase, gemessen zu vier definierten Zeitpunkten im Perfusat.

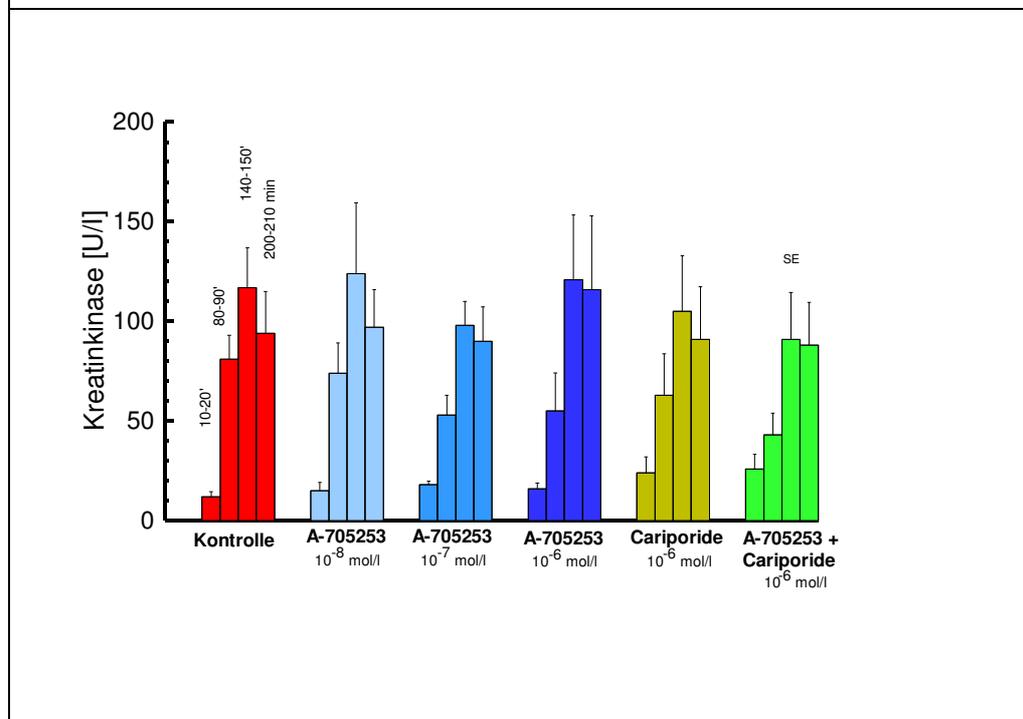
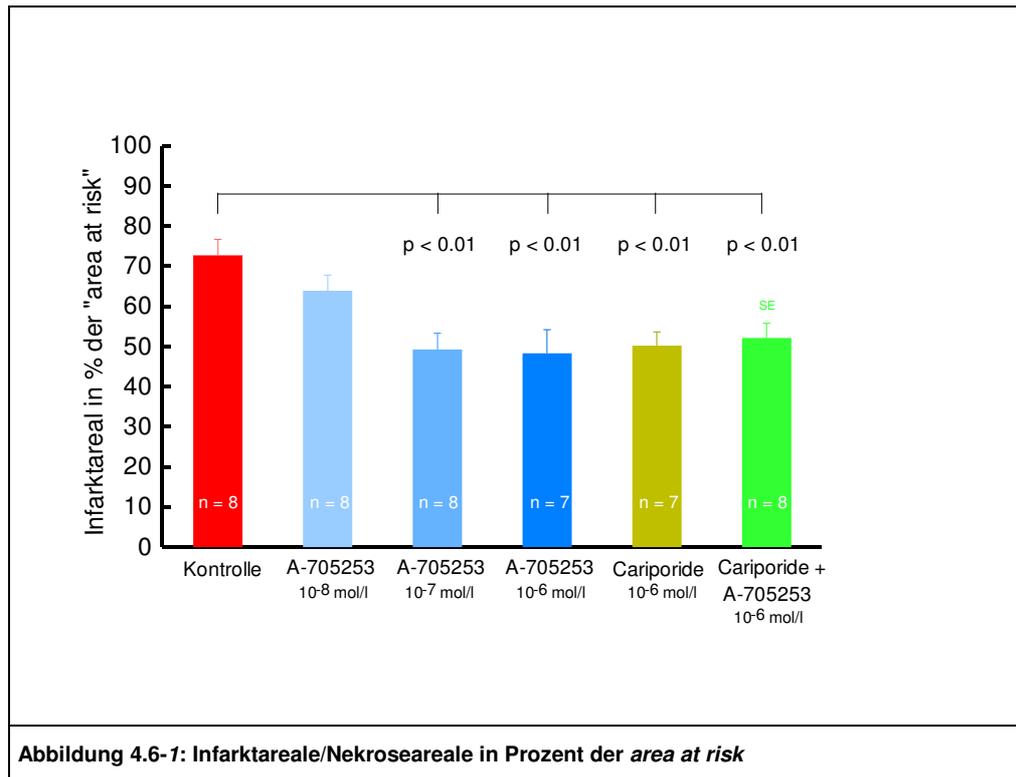


Abbildung 4.5-2: Die Freisetzung der Kreatinkinase, gemessen zu vier definierten Zeitpunkten im Perfusat.

Die Kalium-Konzentration im Perfusat lag bei allen Versuchsgruppen während der gesamten Versuchszeit konstant zwischen $4,587 \pm 0,078$ und $4,812 \pm 0,044$ mmol/l.

4.6. Infarktgröße

Der durch die Koronarokklusion für 60 Minuten von der Durchblutung ausgeschlossene Myokardbereich (*area at risk*) betrug im Mittel $42,4 \pm 1,3$ % ($n = 46$) der gesamten linken Ventrikelmuskulatur unterhalb der Ebene der Koronarokklusion ohne statistischen Unterschied zwischen den einzelnen Versuchsgruppen. Bei den unbehandelten Kontrollen konnte nach zweistündiger Reperfusion eine Infarzierung (totes Gewebe bzw. Nekrose) von $72,7 \pm 4,0$ % der *area at risk* nachgewiesen werden. In Gegenwart des Calpaininhibitors A-705253 in einer Konzentration von 10^{-8} mol/l im Perfusat war das Infarktareal nicht signifikant auf $63,9 \pm 3,9$ % der *area at risk* reduziert. Mit ansteigenden Inhibitorkonzentrationen verkleinerte sich jedoch das Infarktareal signifikant ($p < 0,01$) weiter auf $49,2 \pm 4,1$ % bei 10^{-7} mol/l und auf $48,3 \pm 2,3$ % der *area at risk* bei 10^{-6} mol/l, was einer Verkleinerung des Infarktes um 66,4 % entspricht. Die Zugabe von Cariporide® (10^{-6} mol/l) zum Perfusionsmedium als alleiniges Pharmakon oder in der Kombination mit A-705253 (10^{-6} mol/l) bewirkte in beiden Fällen eine signifikante ($p < 0,01$) Abnahme des Infarktareals auf $50,2 \pm 3,4$ %, bzw. $52,1 \pm 3,7$ % der *area at risk*. Somit zeigten alle Therapiegruppen, mit Ausnahme der Versuche mit dem niedrigst dosierten Calpaininhibitor (10^{-8} mol/l), eine signifikante Reduktion des Infarktareals im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen.



5. Diskussion

5.1. Einleitung

Am modifizierten Langendorff-Modell mit lokaler und zeitlich begrenzter Ischämie untersucht diese Arbeit den Einfluss des spezifischen Calpaininhibitors A-705253 als alleiniges Pharmakon und in Kombination mit dem Na⁺-H⁺-Antiporter-Inhibitor Cariporide[®] auf die Schädigung des Herzmuskels. Der besondere Schwerpunkt liegt hierbei auf der Gabe der Medikamente zu Beginn der Reperfusionphase im Hinblick auf die große klinische Relevanz einer postischämischen Infarkttherapie. Geprüft wurde der Einfluss der beiden Inhibitoren in unterschiedlicher Konzentration und Kombination auf die Ausdehnung der Infarktnekrosezone (totes Gewebe) im Vergleich zum gesamten von der Durchblutung ausgeschlossenen Bereich (*area at risk*).

Während Ischämie und Reperfusion führt eine zytosolische Konzentrationserhöhung der Kalziumionen zur Aktivierung der Cysteinprotease Calpain (Kihara et al. 1989, Marban et al. 1990). Dies zeigt sich in einem messbaren Anstieg des Calpainproteins und seiner mRNA (Iizuka et al. 1991, Sandmann et al. 2001). Calpain schädigt auf verschiedene Arten die myokardialen Proteine. Zum einen durch die *downregulation* des Calpastatins (Sorimachi et al. 1997, Enns et al. 2002) mit Reduktion des protektiven Effekts durch den natürlichen Calpaininhibitor. Zum anderen spaltet die Ca²⁺-abhängige Cysteinprotease Strukturproteine der Zelle wie Desmin, Alpha-Spectrin und Troponin IA (Maekawa et al. 2003) und verursacht somit die kardiale Dysfunktion (Yoshida et al. 2003). Die Aufspaltung der Myofilamente während Ischämie und Reperfusion konnte in diesem Zusammenhang elektronenmikroskopisch nachgewiesen werden (Gao et al. 1997, Goette et al. 2002). Der calpainabhängige Apoptoseweg (Chi et al. 1997, Squier et al. 1999, Ruiz-Vela et al. 2001, Lu et al. 2002) sowie die mitochondriale

Dysfunktion (Lesnefsky et al. 2001) sind als weitere Mechanismen zu nennen. Eine Calpaininhibition (Neuhof et al. 2003) oder die Hemmung der Calpainaktivierung durch einen Na^+ - H^+ -Antiporter-Inhibitor (Chen et al. 2002) vermag die mitochondriale Dysfunktion und somit den Ischämie-Reperfusionsschaden zu mindern.

Unter Calpaininhibition kam es bei Ikeda et al. (Ikeda et al. 2002) zu verminderter endotheliale Adhärenz und nachfolgende Infiltration ins postischämische Myokard. Da Perfusion und Reperfusion in unserem Experiment ausschließlich mit einer modifizierten Krebs-Henseleit-HAES-Pufferlösung in Abwesenheit von neutrophilen Granulozyten durchgeführt wurde, ist dieser Effekt nicht an der kardioprotektiven Wirkung in unserem Infarktmodell beteiligt.

Cariporide[®], Inhibitor des Na^+ - H^+ -Antiporters 1 (NHE 1), wirkt ebenfalls kardioprotektiv. Eine Aktivierung des Na^+ - H^+ -Antiporters führt zu einer paradoxen Zellschädigung, die durch die nachfolgende Kopplung an den Na^+ - Ca^{2+} -Antiporter mit Kalziumakkumulation im Inneren der Zelle und Aktivierung der Calpaine erklärbar ist (siehe Abbildung 1.3-1). Chen et al. (Chen et al. 2002) zeigen in diesem Zusammenhang, dass Ethylisopropylamilorid, ein Na^+ - H^+ -Antiporter-Inhibitor, die Calpainaktivität innerhalb eines Ischämie-Reperfusionsmodells mit 30 minütiger globaler Ischämie und zweistündiger Reperfusion auf den Wert der Kontrollgruppe ohne Ischämie reduzieren kann. Gemessen wurde neben der Calpainaktivität auch die Konzentration des Calpainspaltproduktes Alpha-Spektrin.

Die kardioprotektive Wirkung der Hemmung des Na^+ - H^+ -Antiporters 1 wurde bereits in mehreren experimentellen Studien nachgewiesen. So fanden Klein et al. (2000) bei Gabe von Cariporide[®] während der Ischämie eine Verkleinerung der Infarktausdehnung bei reperfundierten Schweineherzen nach lokaler Ischämie und Otani et al. (2000) eine verbesserte linksventrikuläre Funktion und verminderte Enzymfreisetzung nach globaler Ischämie am Rattenherzen. Kardioprotektive Effekte, wie eine Infarktverkleinerung

nach regionaler Ischämie bei Kaninchen (Knight et al. 2001) oder eine Verminderung von funktionellen und metabolischen Störungen nach globaler Ischämie bei Rattenherzen (Lee et al. 2005), sind inzwischen auch für andere Inhibitoren des Na⁺-H⁺-Antiporters 1 beschrieben.

Bezüglich des Zeitpunktes der Cariporide[®]-Verabreichung findet man unterschiedliche Resultate in der Literatur. Bei Toyoda et al. (2001) heißt es, dass NHE-1 Inhibition am wirkungsvollsten sei, wenn man es vor der Ischämie verabreicht. Zu Beginn der Reperfusion konnte aber auch ein protektiver Effekt erzielt werden. Muraki et al. (2003) können lediglich bei Gabe vor und während Ischämie eine Reduktion der Infarktgröße und eine Minderung der endothelialen Dysfunktion erzielen. Yarbrough et al. (2003) zeigen, dass Cariporide[®] gegeben am Ende der Ischämie oder zu Beginn der Reperfusion zwar einen positiven Effekt auf die Myokardkontraktilität nicht aber auf die Infarktgröße und die Freisetzung der myokardspezifischen Enzyme nach Infarkt hat. Während Castella et al. (2003) Cariporide[®] als Zusatz zur Blutkardioplegie in der Reperfusion verabreichten und somit die funktionelle, biochemische und endotheliale Dysfunktion im gefährdeten Herzen senken konnten.

5.2. Reduktion des Infarktareals

Unsere Untersuchungen zeigt nun zum ersten Mal den kardioprotektiven Effekt eines neuentwickelten Calpaininhibitors A-705253 in einem Ischämie-Reperfusionsmodell gegeben zu Beginn der Reperfusion und in Kombination mit Cariporide[®].

Nachdem der Calpaininhibitor A-705253 in einer Konzentration von 10⁻⁸ mol/l bei präischämischer Gabe bereits eine Reduktion des Infarktareals um 61,8 % der *area at risk* erzielte (Neuhof et al. 2004), konnte in unserem Versuchsmodell mit postischämischer Gabe gezeigt werden, dass mit ansteigenden Inhibitorkonzentrationen größer als 10⁻⁸ mol/l sich das Infarktareal signifikant ($p < 0,01$) auf $49,2 \pm 4,1$ % bei 10⁻⁷ mol/l und auf $48,3 \pm 2,3$ % der *area at risk* bei

10^{-6} mol/l verkleinert, was einer Verkleinerung des Infarktes um 66,4% entspricht. Diese Befunde zeigen, dass die Größe der Infarktausdehnung bei vorhandenem kollateralen Flow (Becker et al. 1999) wesentlich durch das Ausmaß der noch während der Reperfusion andauernden myokardialen Schädigung bedingt ist (Farb et al. 1993).

Im Gegensatz zu den eigenen Ergebnissen fanden Iwamoto et al. (Iwamoto et al. 1999) keine Beeinflussung der Infarktausdehnung, wenn der verwendete Inhibitor erst zehn Minuten vor der Reperfusion appliziert wurde. Eine Erklärung für die Diskrepanz unserer Ergebnisse könnte einerseits in der geringeren Selektivität, einer unzureichenden Dosierung und schlechteren Gewebegängigkeit des von ihnen verwendeten Inhibitors liegen. Der von uns eingesetzte Inhibitor A-705253 weist eine verbesserte Selektivität und eine hohe Wasserlöslichkeit und Zellpermeation auf, die zu seiner schnellen Anreicherung um das 16-fache im Herzmuskel führt (Lubisch et al. 2003) und somit bei ausreichender Ausgangskonzentration schon mit Beginn der Reperfusion eine effektive Calpainhemmung bewirken kann. Trotzdem ist im Vergleich zur präischämischen Gabe eine geringere Anreicherung im Gewebe möglich. Dies erklärt die um zwei Zehnerpotenzen höhere Konzentration zur bestmöglichen Kardioprotektion in den postischämischen Versuchsreihen.

Unsere Versuchsreihen endeten mit einer Inhibitorkonzentration von 10^{-6} mol/l. Es stellt sich die Frage, ob eine weitere Erhöhung eine zusätzliche Infarktverkleinerung erbringen könnte. Dies ist jedoch bei einer Reduktion des Infarktes um 66,4 % im postischämischen Modell und einer Infarktreduktion um 61,8 % bei präischämischer Gabe eher unwahrscheinlich.

Die Zugabe von Cariporide[®] (10^{-6} mol/l) zum Perfusionsmedium als alleiniges Pharmakon oder in der Kombination mit A-705253 (10^{-6} mol/l) bewirkte in beiden Fällen eine signifikante ($p < 0,01$) Abnahme des Infarktareals auf $50,2 \pm 3,4$ %, bzw. $52,1 \pm 3,7$ % der *area at risk*.

Somit zeigt sich, dass die Kombination aus Cariporide[®] und dem Calpaininhibitor A-705253 keinen additiven Effekt erbringt. Dies führt uns entsprechend der Ergebnisse von Chen et al. (Chen et al. 2002) zu der Annahme, dass Cariporide über die Reduktion des intrazellulären Kalziums eine Calpaininhibition bewirkt.

5.3. Myokardfunktion

Koronardurchfluss/*Flow* und Herzfrequenz weisen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen auf.

Zeitpunkt und Dauer der Anlage des Tourniquets zum Verschluss eines Koronarastes wurden in der Kontrollgruppe und bei den Versuchen mit Inhibitorgabe völlig gleich gewählt, so dass keine Unterschiede des Koronardurchflusses zu erwarten waren. Der langsam sinkende *Flow* bis zum Ende des Experimentes erklärt sich durch den steigenden Gefäßwiderstand (Endothelanschwellung), wie er auch bei normal perfundiertem Herzen ohne Ischämie auftritt.

Die mit Calpaininhibitor behandelten Herzen zeigen trotz signifikant verkleinerter Infarktausdehnung während der 120 minütigen Reperfusion keine verbesserte Ventrikelfunktion im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen. Dieses Verhalten steht in Übereinstimmung mit Beobachtungen von Theroux et al. (1976), Lavallee et al. (1983) und Ellis et al. (1985), die zeigen konnten, dass die Nekroseprävention durch Reperfusion nach lokaler Ischämie eine geringe sofortige Wirkung auf die systolische Ventrikelfunktion hat. Die funktionelle Erholung des vorher ischämischen Myokards dauert vielmehr bis zu 4 Wochen.

In unseren Experimenten mit räumlich und zeitlich begrenzter Ischämie zeigt die Calpaininhibition, mit Ausnahme der Versuchsgruppe sechs (A-705253 10⁻⁶ + Cariporide[®]), keine hemmende Wirkung auf die Freisetzung der Kreatinkinase und Laktatdehydrogenase aus dem Herzmuskel, wie unter globaler Ischämie zu beobachten (Chen et al. 2002; Neuhof et al. 2003, Liu und Schnellmann 2003). Die Erklärung hierfür dürfte in der mengenmäßig

geringen Enzymfreisetzung aus den zur globalen Ischämie vergleichsweise kleinen Gewebearealen liegen, die sich unserer Nachweismethode entzieht.

Etwa 2 - 3 Versuche wurden pro Versuchreihe ausgeschlossen. Hierbei ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsgruppen. Gleichmaßen hohe Ausschlussraten aufgrund von Arrhythmien und Kammerflimmern werden im Tierexperiment häufig beobachtet (Ravn et al. 1999, Waagstein et al. 1999).

Zuletzt ist zu betonen, dass der Schwerpunkt unserer Untersuchung auf dem Nachweis der Reduktion der Nekrosezone als morphologische Veränderung liegt. Eine genaue Aussage über die funktionelle Erholung des Myokards unter der Gabe von A-705253 ist somit in weiteren Versuchen zu testen.

5.4. Spezifität der Kardioprotektion

A-705253 hemmt auch die lysosomalen Cysteinproteasen Cathepsin B und L⁹. Aus diesem Grund ist zu diskutieren, ob nicht die Hemmung dieser Enzyme für den kardioprotektiven Effekt verantwortlich ist. Über die pathophysiologische Rolle beider Cathepsine im Herzen ist bisher wenig bekannt. Turski und Zaslanka (2000) fanden zwar eine Aktivierung von Cathepsin L im intralysosomalen Kompartiment von Kardiomyozyten während aortokoronarem Bypass. Die von Tsuchida et al. (1986) und Shibata et al. (1992) in Ischämie-Reperusionsmodellen gesehene Verbesserung der funktionellen Erholung, die Abnahme der Aktivitäten von Cathepsin B und L und der verminderte Proteinabbau in Gegenwart von Cysteinproteasen-Inhibitoren, lässt sich jedoch nicht auf die Hemmung beider Cathepsine zurückführen, da die von den Autoren verwendeten Inhibitoren ebenfalls Calpain hemmen. Die Beobachtung, dass die Hemmung des Na⁺-H⁺-Antiporters 1 die

⁹ A-705253 hemmt Calpain in nanomolaren Konzentrationen mit einem K_i von 27 ± 2,5 nM und Cathepsin B und L mit einem K_i von 62 ± 9 bzw. 149 ± 15 nM.

gleiche kardioprotektive Wirkung wie die Calpaininhibition zeigte, spricht gegen eine pathogenetische Rolle von Cathepsinen in unserem Infarktmodell. Cathepsin B und L sind keine Ca^{2+} -aktivierten Proteasen und als solche auch nicht in ihrer Aktivierung bzw. Wirkung durch die Verhinderung eines intrazellulären Ca^{2+} -overloads mittels Hemmung des Na^+ - H^+ -Antiporters 1 zu beeinflussen.

5.5. Ausblick

Die postischämische Infarkttherapie ist von höchster klinischer Relevanz. Unser neuartiger Calpaininhibitor A-705253 zeigt zum ersten Mal eine Reduktion der Ausdehnung des Infarktareals verabreicht zu Beginn der Reperfusionphase und könnte folglich in der Zukunft erheblich zur Reduktion der Infarktletalität beitragen. Aus diesem Grund ist weiter zu überprüfen, ob A-705253 über unser kurzes Ischämie-Reperfuionsmodell hinaus, eine kardioprotektive Langzeitwirkung besitzt. Hierbei könnte der programmierte Zelltod eine Rolle spielen, der bekanntlich nach moderaten Zellverletzungen oder Einfluss von Cytokinen auftritt.

Des Weiteren ist, aufgrund seiner hohen Selektivität und Potenz, die Anwendung von A-705253 an anderen Organsystemen vielversprechend.

6. Zusammenfassung

Ein Anstieg der zytosolischen Kalziumionenkonzentration während Ischämie und Reperfusion führt zur Aktivierung der Cysteinprotease Calpain, die die myokardialen Proteine schädigt und somit ausschlaggebend für den Ischämie-Reperfusionsschaden ist. Untersucht wurde der kardioprotektive Einfluss des spezifischen Calpaininhibitors A-705253 auf die Degeneration des Herzmuskels als alleiniges Pharmakon zu Beginn der Reperfusionsphase und in Kombination mit dem Na^+ - H^+ -Antiporter-Inhibitor Cariporide[®], der zu einer Reduktion der intrazellulären Kalziumionenkonzentration führt. Am Versuchsmodell des isoliert perfundierten Kaninchenherzen nach Langendorff wurde eine linksventrikuläre Ischämie durch Verschluss eines Koronarastes provoziert. Der Calpaininhibitor A-705253 in den Konzentrationen 10^{-6}M und 10^{-7}M , gegeben zu Beginn der Reperfusion, verkleinerte die Infarktnekrosezone im Vergleich zur Kontrollgruppe um 66,4 %. Da die Reduktion bei präischämischer Gabe von 10^{-8}M einen Wert von 61,8 % erreichte, ist von einer Schädigung auszugehen, die im Wesentlichen in der Reperfusion stattfindet.

In der Kombination mit Cariporide[®], dem Na^+ - H^+ -Antiporter-Inhibitor, ergab sich kein additiver Effekt. So dass anzunehmen ist, dass die Wirkung von Cariporide[®] über die Reduktion der Calpainaktivierung zu erklären ist. Desweiteren ist bei fehlendem additivem Effekt in unserem Modell eine kardioprotektive Wirkung durch die Hemmung von Cathepsin B und L, die in den oben genannten Konzentrationen ebenfalls durch A-705253 gehemmt werden, aber bekanntlich keine Ca^{2+} -abhängigen Proteasen sind, unwahrscheinlich.

Die postischämische Infarkttherapie ist von höchster klinischer Relevanz. Unser neuartiger Calpaininhibitor A-705253 zeigt zum ersten Mal eine Reduktion der Ausdehnung des Infarktareals

verabreicht zu Beginn der Reperfusionphase und könnte folglich in der Zukunft erheblich zur Reduktion der Infarktletalität beitragen.

7. Literaturverzeichnis

Aharonovitz O, Zaun HC, Balla T, York JD, Orlowski J, Grinstein (2000). Intracellular pH regulation by $\text{Na}^+\text{-H}^+$ exchange requires phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J Cell Biol.* 150(1), 213-24.

Andresen K, Tom TD, Strand M (1991). Characterization of cDNA clones encoding a novel calcium-activated neutral proteinase from *Schistosoma mansoni*. *J Biol Chem.* 266(23), 15085-90.

Arthur JS, Elce JS, Hegadorn C, Williams K, Greer PA (2000). Disruption of the murine calpain SC subunit gene, *Capn4*: Calpain is essential for embryonic development but not for cell growth and division. *Mol Cell Biol.* 20(12), 4474-81.

Avkiran M and Marber MS (2002). $\text{Na}^+\text{-H}^+$ exchange inhibition for cardioprotective therapy: progress, problems and prospects. *J Am Coll Cardiol.* 39(5), 747-53.

Avkiran MJ (2003). $\text{Na}^+\text{/H}^+$ exchange inhibitors for cardioprotective therapy: progress, problems and prospects. *Card Surg.* 18(1), 3-12.

Baartscheer A, Schumacher CA, van Borren MM, Belterman CN, Coronel R, Fiolet JW (2003). Increased $\text{Na}^+\text{/H}^+$ exchange activity is the cause of increased $[\text{Na}^+]_i$ and underlies disturbed calcium handling in the rabbit pressure and volume overload heart failure model. *Cardiovasc Res.* 57(4), 1015-24.

Badalamente MA and Stracher A (2000). Delay of muscle degeneration and necrosis in mdx mice by calpain inhibition. *Muscle Nerve.* 23(1), 106-11.

Bardenheuer H and Schrader J (1983). Relationship between myocardial oxygen consumption, coronary Flow, and adenosine release in an improved isolated working heart preparation of guinea pigs. *Circ Res.* 52(3), 263-71.

Becker PL, Singer JJ, Walsh JV JR, Fay FS (1989). Regulation of calcium concentration in voltage clamped smooth muscle cells. *Science.* 244(4901), 211-14.

Becker LC, Jeremy RW, Schapper J, Schaper W (1999). Ultrastructural assessment of myocardial necrosis occurring during ischemia and 3-h reperfusion in the dog. *Am J Physiol.* 277, H243-52.

Berlin JR and Konishi M (1993). Ca^{2+} transients in cardiac myocytes measured with high and low affinity Ca^{2+} indicators. *Biophys J.* 65(4), 1632-47.

Biswas S, Harris F, Dennison S, Singh J, Phoenix DA (2004). Calpains: targets of cataract prevention? *Trends Mol Med.* 10(2), 78-84.

Blanchard H, Grochulski P, LI Y, Arthur JSC, Davis PL, Elce JS, Cygler M (1997). Structure of a calpain Ca^{2+} -binding domain reveals a novel EF-hand and Ca^{2+} -induced conformational changes. *Nat Struct Biol.* 4(7), 532-8.

Bolli R and Marban E (1999). Molecular and cellular mechanisms of myocardial stunning. *Physiol Rev.* 79(2), 609-34.

Bradford HN, Schmaier AH, Colman RW (1990). Kinetics of inhibition of platelet calpain by human kininogens. *Biochem J.* 270(1), 83-90.

Camilion de Hurtado MC, Ennis IL, Perez NG, Chiappe de Cingolani GE, Morgan P, Cingolani HE (2002). Upregulation of myocardial Na⁺/H⁺ exchanger induced by chronic treatment with a selective inhibitor. *J Mol Cell Cardiol.* 34(11), 1539-47.

Carragher NO, Westhoff MA, Riley D, Potter DA, Dutt P, Elce JS, Greer PA, Frame MC (2002). v-Src-induced modulation of the calpain/calpastatin proteolytic system regulates transformation. *Mol Cell Biol.* 22(1), 257-69.

Castella M, Buckberg GD, Tan Z (2003). Blood cardioplegic protection in profoundly damaged hearts: role of Na⁺-H⁺ exchange inhibition during pretreatment or during controlled reperfusion supplementation. *Ann Thorac Surg.* 75(4),1238-45.

Chaitman BR (2003). A review of the GUARDIAN trial results: clinical implications and the significance of elevated perioperative CK-MB on 6-month survival. *J Card Surg.* 18 (1),13-20.

Ch`en FF, Vaughan-Jones RD, Clarke K, Noble D (1998). Modelling myocardial ischaemia and reperfusion. *Prog Biophys Mol Biol.* 69(2-3), 515-38.

Chen M, He H, Zhan S, Krajewski S, Reed JC, Gottlieb RA (2001). Bid is cleaved by calpain to an active fragment in vitro and during myokardial ischemia/reperfusion. *J Biol Chem.* 276 (33),30724-8.

Chen M, Won DJ, Krajewski S, Gottlieb AR (2002). Calpain and mitochondria in Ischemia/Reperfusion Injury. *J Biol Chem.* 277(32), 29181-6.

Chi XJ, Hiwasa T, Maki M, Sugaya S, Nomura J, Kita K, Suzuki N (1999). Suppression of okadaic acid-induced apoptosis by overexpression of calpastatin in human UVR-1 cells. FEBS Lett. 459(3), 391-4.

Chua BT, Guo K, Li P (2000). Direct cleavage by the calcium-activated protease calpain can lead to inactivation of caspases. J Biol Chem. 275, 5131-5.

Cong JY, Goll DE, Peterson AM, Kapprell HP (1989). The role of autolysis in activity of the Ca^{2+} -dependent proteinases (μ -calpain and m-calpain) J Biol Chem. 264(17), 10096-10103.

Cong J, Thompson VF, Goll DE (1993). Effect of monoclonal antibodies specific for the 28-kDa subunit on catalytic properties of the calpains. J Biol Chem. 268(34), 25740-7.

Cong J, Thompson VF, Goll DE (2000). Phosphorylation of the Calpains Abstract. Mol Biol Cell. 11, 386a.

Coolican SA and Hathaway DR (1984). Effect of L-phosphatidylinositol on a vascular smooth muscle Ca^{2+} -dependent protease. J Biol Chem. 259(19), 11627-30.

Cottin P, Vidalence PL, Ducastaing A (1981). Ca^{2+} -dependent association between a Ca^{2+} -activated neutral proteinase (CaANP) and its specific inhibitor. FEBS Lett. 136(2), 221-4.

Crawford C (1990). Protein and peptide inhibitors of calpains. In: Intra-cellular Calcium-Dependent Proteolysis. Boca Raton,FL: CRC p. 75-89.

Crawford C, Brown NR, Willis AC (1993). Studies of the active site of m-calpain and the interaction with calpastatin. *Biochem J.* 296, 135-42.

Croall DE and Demartino GN (1991). Calcium-activated neutral protease (calpain) systems structure, function, and regulation. *Physiol Rev.* 71(3), 813-47.

Dayton WR (1982). Comparison of low- and high-calcium-requiring forms of the calcium-activated protease with their autocatalytic breakdown products. *Biochim Biophys Acta.* 709(2), 166-72.

De Luca CI, Davies PL, Samis JA, Elce JS (1993). Molecular cloning and bacterial expression of cDNA for rat calpain II 80-kDA subunit. *Biochim Biophys Acta.* 1216(1), 81-93.

Edmunds T, Nagainis PA, Sathe SK, Thompson VF, Goll DE (1991). Comparison of the autolyzed and unautolyzed forms of μ - and m-calpain from bovine skeletal muscle. *Biochim Biophys Acta.* 1077(2), 197-208.

Elce JS, Hegadorn C, Arthur JSC (1997). Autolysis, Ca^{2+} -requirement, and heterodimer stability in m-calpain. *J Biol Chem.* 272(17), 11268-75.

Ellis SG, Henschke CI, Sandor T, Wynne J, Kloner RA (1985). Relation between the transmural extent of acute myocardial infarction and associated myocardial contractility two weeks after infarction. *Am. J. Cardiol.* 55(11), 1412-6.

Engelhardt S, Hein L, Keller U, Klambt K, Lohse MJ (2002). Inhibition of $\text{Na}^{(+)}\text{-H}^{(+)}$ exchange prevents hypertrophy, fibrosis, and heart

failure in beta(1)-adrenergic receptor transgenic mice. *Circ Res.* 90(7),814-9.

Enns D, Karmazyn M, Mair J, Lercher A, Kountchev J, Belcastro, A (2002). Calpain, calpastatin activities and ratios during myocardial ischemia-reperfusion. *Mol Cell Biochem.* 241, 29-35.

Farb A, Kolodgie FD, Jenkins M, Virmani R (1993). Myocardial infarct extension during reperfusion after coronary artery occlusion: pathologic evidence. *J Am Coll Cardiol.* 21(5),1245-53.

Fishbein MC, Meerbaum S, Rit J, Lando U, Kanmatsuse K, Mercier JC, Corday E, Ganz W (1981). Early phase acute myocardial infarct size quantification: validation of the triphenyl tetrazolium chloride tissue enzyme staining technique. *Am Heart J.* 101(5),593-600.

Fliegel L and Frohlich O (1993). The Na⁺-H⁺-exchanger: an update on structure, regulation and cardiac physiology. *Biochem J.* 296, 273-85.

Fliegel L (1999). Functional and cellular regulation of the myocardial Na⁺-H⁺-exchanger. *J. Thromb Thrombolysis.* 8(1), 9-14.

Freude B, Masters TN, Robicsek F, Fokin A, Kostin S, Zimmermann R, Ullmann C, Lorenz-Meyer S, Schaper J (2000). Apoptosis is initiated by myocardial ischemia and executed during reperfusion. *J Mol Cell.* 32(2), 197-208.

Fujisawa G, Okada K, Muto S, Fujita N, Itabashi N, Kusano E, Ishibashi S (2003). Na⁺/H⁺ exchange isoform 1 is involved in mineralocorticoid/salt-induced cardiac injury. *Hypertension.* 41(3),493-8.

Gao WD, Atar D, Liu Y, Perez NG, Murphy AM, Marban E (1997). Role of troponin I proteolysis in the pathogenesis of stunned myocardium. *Circ Res.* 80(3), 393-9.

Gazmuri RJ, Ayoub IM, Hoffner E, Kolarova JD (2001). Successful ventricular defibrillation by the selective sodium-hydrogen exchanger isoform-1 inhibitor cariporide. *Circulation.* 104(2),234-9.

Gil-Parrado S, Popp O, Knoch TA, Zahler S, Bestvater F, Felgenträger M, Holloschi A, Fernández-Montalván A, Auerswald EA, Fritz H, Fuentes-Prior P, Machleidt W, Spiess E (2003). Subcellular localization and in vivo subunit interactions of ubiquitous μ -calpain. *J Biol Chem.* 278(18),16336-46.

Goette A, Arndt M, Röcken C, Staack T, Bechtloff R, Reinhold D, Huth C, Ansorge S, Klein HU, Lendeckel U (2002). Calpains and cytokines in fibrillating human atria. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 283(1), H264-72.

Goldhaber JL, Qayyum MS (2000). Oxygen free radicals and excitation-contraction coupling. *Antioxid Redox Signal.* 2(1), 55-64.

Goll DE, Thompson VF, Taylor RG, Zalewska T (1992). Is calpain activity regulated by membranes and autolysis or by calcium and calpastatin? *Bioessays.* 14, 549-556.

Goll DE, Thompson VF, Li H, Wei W, Cong J (2003). The Calpain System. *Physiol Rev.* 83(3), 731-801.

Gonen H, Shkedy D, Barnoy S, Kosower NS, Ciechanover A (1997). On the involvement of calpains in the degradation of the tumor suppressor protein p53. *FEBS Lett.* 406, 17-22.

Harkins AB, Kurebayashi N, Baylor SM (1993). Resting myoplasmic free calcium in frog skeletal muscle fibers estimated with fluo-3. *Biophys J.* 65(2), 865-881.

Haworth RS, McCann C, Snabaitis AK, Roberts NA, Avkiran M (2003). Stimulation of the plasma membrane Na^+/H^+ exchanger NHE1 by sustained intracellular acidosis. Evidence for a novel mechanism mediated by the ERK pathway. *J Biol Chem.* 278(34),31676-84.

Hearse DJ, Humphrey SM, Chain EB (1973). Abrupt reoxygenation of the anoxic Potassium-arrested perfused rat heart: a study of myocardial enzyme release. *J Moll Cell Cardiol.* 5(4), 395-407.

Hirai S, Kawasaki H, Yaniv M, Suzuki K (1991). Degradation of transcription factors, c-Jun and c-Fos, by calpain. *FEBS Lett.* 287, 57-61.

Hosfield CM, Elce JS, Davies PL, Jia Z (1999). Crystal structure of calpain reveals the structural basis for Ca^{2+} -dependent protease activity and a novel mode of enzyme activation. *EMBO J.* 18(24), 6880-9.

Iizuka K, Kawaguchi H, Yasuda H (1991). Calpain is activated during hypoxic myocardial cell injury. *Biochem Med Metab Biol.* 46(3), 427-31

Ikeda Y, Young LH, Lefler AM (2002). Attenuation of neutrophil-mediated myocardial ischemia-reperfusion injury by a calpain inhibitor. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*282(4),H1421-6.

Imajoh S and Suzuki K (1985). Reversible interaction between Ca^{2+} -activated neutral protease (CANP) and its endogenous inhibitor. FEBS Lett. 187(1), 47-50.

Imajoh S, Kawasaki H, Suzuki K (1986). The amino-terminal hydrophobic region of the SC subunit of calcium-activated neutral protease (CANP) is essential for its activation by phosphatidylinositol. J Biochem .99(4), 1281-1284.

Inomata M, Hayashi M, Nakamura M, Saito Y, Kawashima S (1989). Properties of erythrocyte membrane binding and autolytic activation of calcium-activated neutral protease. J Biol Chem. 264(31), 18838-43.

Inomata M, Saito Y, Kon K, Kawashima S (1990). Binding sites for calcium-activated neutral protease on erythrocyte membranes are not membrane phospholipids. Biochem Biophys Res Commun. 171(2), 625-32.

Inserte J, Garcia-Dorado D, Ruiz-Meana M (1997). The Na^+ - H^+ exchange occurring during hypoxia in the genesis of reoxygenation-induced myocardial oedema. J Mol Cell Cardiol. 29(4),1167-75.

Ishiura S, Nonaka I, Sugita H (1980). Calcium-activated neutral protease: its degradative role in muscle cells. In: Proceedings of International Symposium on Muscular Dystrophy, edited by Ebashi S. Tokyo: Univ. of Tokyo Press. p. 265-282.

Iwamoto H, Miura T, Okamura T, Shirakawa K, Iwatate M, Kawamura S, Tatsuno H, Ikeda Y, Matsuaki M (1999). Calpain inhibitor-I reduces infarct size and DNA fragmentation of myocardium in ischemic/reperfused rat heart. J Cardiovasc Pharmacol 33(4), 580-6.

Jacquemond V (1997). Indo-1 fluorescence signals elicited by membrane depolarization in enzymatically isolated mouse skeletal muscle fibers. *Biophys J.* 73(2), 920-8.

Jestädt R und Sandritter W (1959). Erfahrungen mit der TTC-(Triphenyl-tetrazoliumchlorid-)Reaktion für die pathophysiologisch-anatomische Diagnose des frischen Herzinfarktes. *Zeitschr. Kreislaufforschung.* 48, 802-9.

Kapprell HP and Goll DE (1989). Effect of Ca²⁺ on binding of the calpains to calpastatin. *J Biol Chem.* 264(30), 17888-96.

Karmazyn M (1988). Amiloride enhances postischemic ventricular recovery: possible role of Na⁺-H⁺-exchange. *Am Physiol.* 255, H608-15

Kidd VJ, Lahti JM, Teitz T (2000). Proteolytic regulation of apoptosis. *Semin Cell Dev Biol.* 11(3), 191-201.

Kihara Y, Grossman W, Morgan JP (1989). Direct measurement of changes in intracellular calcium transient during hypoxia, ischemia, and reperfusion of the intact mammalian heart. *Circ. Res.* 65(4), 1029-44.

Kinsella JL, Heller P, Froehlich JP (1998). Na⁺-H⁺-exchanger: proton modifier site regulation of activity. *Biochem Cell Biol.* 76(5), 743-9.

Kishimoto A, Mikawa K, Hashimoto K, Yasuka I, Tanaka S, Tominaga M, Kuroda T, Nishimura Y (1989). Limited proteolysis of protein kinase C subspecies by calcium-dependent neutral protease (Calpain). *J Biol Chem.* 264(7), 4088-92.

Klein HH, Puschmann S, Schaper J, Schaper W (1981). The mechanism of the tetrazolium reaction in identifying experimental myocardial infarction. *Virchows Arch.* 393, 287-97.

Klein HH, Pich S, Bohle RM, Lindert-Heimberg S, Nebendahl K (2000). Na⁺-H⁺exchange inhibitor cariporide attenuates cell injury predominantly during ischemia and not at onset of reperfusion in porcine hearts with low residual Flow. *Circulation.* 102(16), 1977-82.

Knight DR, Smith AH, Flynn DM, Macandrew JT, Ellery SS, Kong JX, Marala RB, Wester RT, Guzman-Perez A, Hill RJ, Magee WP, Tracey WR (2001). A novel sodium-hydrogen exchanger isoform-1 inhibitor, zoniporide, reduces ischemic myocardial injury in vitro and in vivo. *J Pharmacol Exp Ther.* 297(1),254-9.

Kubbutat MHG and Vousden KH (1997). Proteolytic cleavage of human p53 by calpain-a potential regulator of protein stability. *Mol Cell Biol.* 17(1), 460-8.

Kuboki M, Ishii H, Kazama M (1990). Characterization of calpain I-binding proteins in human erythrocyte plasma membrane. *J Biochem.* 107, 776-80.

Kuboki M, Ishii H, Horie S, Kazama M (1992). Procalpain I in cytoplasm is translocated onto platelet and granule membranes during platelet stimulation with thrombin and then activated on the membranes. *Biochem Biophys Res Commun.* 185(3), 1122-7.

Kumamoto T, Kleese WC, Cong J, Goll DE, Pierce PR, Allen RE (1992). Localization of the Ca²⁺-dependent proteinases and their inhibitor in normal, fasted, and denervated rat skeletal muscle. *Anat Rec.* 232(1),60-77.

Kunimatsu M, Tada T, Narita Y, Ozaki Y, Liu Z-Q, Shearer TR, Sasaki M (1999). Activation of calpain in myocardial infarction: an immunohistochemical study using a calpain antibody raised against active site histidine-containing peptide. *Cardiovasc Pathol.* 8(1), 7-15.

Lavallee M, Cox D, Patrick TA, Vatner SF (1983). Salvage of myocardial function by coronary artery reperfusion 1, 2, and 3 hours after occlusion in conscious dogs. *Circ Res.* 53(2), 235-47.

Lee BH, Seo HW, Yi KY, Lee S, Lee S, Yoo SE (2005). Effects of KR-32570, a new Na⁺/H⁺ exchanger inhibitor, on functional and metabolic impairments produced by global ischemia and reperfusion in the perfused rat heart. *Eur J Pharmacol.* 511(2-3), 175-82.

Lesnefsky EJ, Moghaddas S, Tandler B, Kerner J, Hoppel CL (2001). Mitochondrial dysfunction in cardiac disease: ischemia-reperfusion, aging, and heart failure. *J Mol Cell Cardiol.* 33(6), 1065-89.

Lin GD, Chattopadhyay D, Maki M, Wang KKW, Carson M, Jin L, Yuen P, Takano E, Hatanaka M, Delucas LJ, Narayana SVL (1997). Crystal structure of a calcium bound domain VI of calpain at 1.9 angstrom resolution and its role in enzyme assembly. *Nature Struct Biol.* 4(7), 539-47.

Lin H, Suleiman MS (2003). Cariporide enhances lactate clearance upon reperfusion but does not alter lactate accumulation during global ischaemia. *Pflugers Arch.* 447(1), 8-13.

Lin X and Barber DL (1996) A calcineurin homologous protein inhibits GTPase stimulated Na⁺-H⁺ exchange. *Proc Natl Acad Sci USA.* 93(22), 12631-6.

Linz W, Albus U, Crause P, Jung W, Weichert A, Schölkens BA, Scholz W (1998) Dose-dependent reduction of myocardial infarct mass in rabbits by NHE 1 inhibitor cariporide (HOE 642). *Clin Exp Hypertens.* 20(7), 733-49.

Liu X and Schnellmann RG (2003). Calpain mediates progressive plasma membrane permeability and proteolysis of cytoskeleton-associated paxillin, talin, and vinculin during renal cell death. *J Pharmacol Exp Ther.* 304(1), 63-70.

Lubisch W, Beckenbach E, Bopp S, Hofmann HP, Kartal A, Kästel C, Lindner T, Metz-Garrecht M, Reeb J, Regner F, Vierling M, Möller A (2003). Benzoylalanine-derived ketoamides carrying vinylbenzyl amino residues: Discovery of potent water-soluble calpain inhibitors with oral bioavailability. *J Med Chem.* 46(12), 2404-12.

Lu T, Xu Y, Mericle MT, Mellgren RL (2002). Participation of the conventional calpains in apoptosis. *Biochim Biophys Acta.* 1590, 16-26.

Maekawa A, Lee JK, Nagaya T, Kamiya K, Yasui K, Horiba M, Miwa K, Uzzaman M, Maki M, Ueda Y, Kodama I (2003). Overexpression of calpastatin by gene transfer prevents troponin I degradation and ameliorates contractile dysfunction in rat hearts subjected to ischemia/reperfusion. *J Mol Cell Cardiol.* 35(10),1277-84.

Maki M, Narayana S, Hitomi K (1997). A growing family of the Ca²⁺-binding proteins with five EF-hand motifs. *Biochem J.* 328, 718-20.

Malcov M, Ben-Yosef D, Glaser T, Shalgi R (1997). Changes in calpain during meiosis in the rat egg. *Mol Reprod Dev.* 48(1), 119-26.

Maravall M, Mainen ZF, Sabatini BL, Svoboda K (2000). Estimating intracellular calcium concentrations and buffering without wavelength ratioing. *Biophys J.* 78(5), 2655-67.

Marban E, Kitakaze M, Koretsune Y, Yue DT, Chacko VP, Pike MM (1990). Quantification of wCa_2qxi in perfused hearts. Critical evaluation of the 5F-BAPTA and nuclear magnetic resonance method as applied to the study of ischemia and reperfusion. *Circ. Res.* 66(5), 1255-67.

Matsumura Y, Saeki E, Otsu K, Morita T, Takeda H, Kuzuya T, Hori M, Kusuoka H (2001). Intracellular Calcium level required for Calpain activation in a single myocardial cell. *J Moll Cell Cardiol.* 33(6),1133-42.

Mellgren RL (1987). Calcium-dependent proteases: an enzyme system active at cellular membranes? *FASEB J.* 1(2), 110-115.

Meyer M, Lehnart S, Pieske B, Schlottauer K, Munk S, Holubarsch C, Just H, Hasenfuss G (1996) Influence of endothelin I on human atrial myocardium-myocardial function and subcellular pathways. *Basic Res Cardiol.* 91(1), 86-93.

Moldoveanu T, Hosfield CM, Lim D, Elce JS, Jia Z, Davies PL (2002). A Ca^{2+} switch aligns the active site of calpain. *Cell.* 108(5), 649-60.

Molinari M, Anagli J, Carafoli E (1994). Ca^{2+} -activated neutral protease is active in the erythrocyte membrane in its nonautolyzed 80-kDa form. *J Biol Chem.* 269(45), 27992-5.

Moor AN and Fliegel L (1999) Protein kinase mediated regulation of the Na⁺-H⁺exchanger in the rat myocardium by MAP-kinase-dependent pathways. *J Biol Chem.* 274(3), 22985-92.

Murachi T (1983). Intracellular Ca²⁺ protease and its inhibitor protein: calpain and calpastatin. In: *Calcium and Cell Function*, edited by Cheung WY. New York: Academic. Vol. IV. p. 377-410.

Muraki S, Morris CD, Budde JM, Zhao ZQ, Guyton RA, Vinten-Johansen J (2003). Blood cardioplegia supplementation with the sodium-hydrogen ion exchange inhibitor cariporide to attenuate infarct size and coronary artery endothelial dysfunction after severe regional ischemia in a canine model. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 125(1),155-64.

Nachlas M und Schnitka T(1963). Macroscopic identification of early myocardial infarcts by alterations in dehydrogenase activity. *Am J Pathol.* 42, 379-406.

Nakagawa T and Yuan J (2000). Cross-talk between two cysteine protease families. Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis. *J Cell Biol.* 150(4), 887-94.

Neuhof C, Götte O, Trumbeckaite S, Attenberger M, Kuzkaya N, Gellerich F, Möller A, Lubisch W, Speht M, Tillmanns H, Neuhof H (2003). A novel water-soluble and cell-permeable calpain inhibitor protects myocardial and mitochondrial function in postischemic reperfusion. *Biol. Chem.* 384(12), 1597-1603

Neuhof C, Fabiunke V, Deibele K, Speth M, Moller A, Lubisch W, Fritz H, Tillmanns H, Neuhof H (2004). Reduction of myocardial infarction by calpain inhibitors A-705239 and A-705253 in isolated perfused rabbit hearts. *Biol Chem.* 385(11),1077-82.

Ohno S, Emori Y, Suzuki S (1986). Nucleotide sequence of a cDNA coding for the SC subunit of human calcium-dependent protease. *Nucleic Acids Res.* 14(13), 5559.

Ohno S, Minoshima S, Kudoh J, Fukuyama R, Shimizu Y, Ohmi-Imajoh S, Shimizu N, Suzuki K (1990). Four genes for the calpain family locate on four distinct human chromosomes. *Cytogenet Cell Genet.* 53(4), 225-9.

Ojha M and Wallace CJA (1988). Novel Ca^{2+} -activated neutral protease from an aquatic fungus, *Allomyces arbuscula*. *J Bacteriol.* 170(3), 1254-60.

Orlowski J and Grinstein S (1997). Na^+ - H^+ exchangers of mammalian cells. *J Biol Chem.* 272(36), 22373-6.

Otani H, Uchiyama T, Yamamura T, Nakao Y, Hattori R, Ninomiya H, Kawaguchi H, Osako M, Imamura H (2000). Effects of the Na^+ - H^+ exchange inhibitor cariporide (HOE642) on cardiac function and cardiomyocyte cell death in rat ischaemic-reperfused heart. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 27, 387-93.

Otsuka Y and Goll DE (1987). Purification of the Ca^{2+} -dependent proteinase inhibitor from bovine cardiac muscle and its interaction with the millimolar Ca^{2+} -dependent proteinase. *J Biol Chem.* 262(12), 5839-51.

Pariat M, Salvat C, Bénien M, Brockly F, Altieri E, Carillo S, Jariel-Encontre I, Piechaczyk M (2000). The sensitivity of c-Jun and c-Fos proteins to calpains depends on conformational determinants of the monomers and not on formation of dimers. *Biochem J.* 345, 129-38.

Petrecce K, Atanasiu R, Grinstein S, Orlowski J, Shrier A (1999). Subcellular localization of the Na⁺-H⁺-exchanger NHE 1 in rat myocardium. *Am J Physiol.* 279(6), H709-17.

Piper HM, Garcia-Dorado D (1999). Prime Causes of Rapid Cardiomyocyte Death During Reperfusion. *Ann Thorac Surg.* 68(5),1913-9.

Piper HM, Meuter K, Schäfer C (2003). Cellular Mechanisms of Ischemia-Reperfusion Injury. *Ann Thorac Surg.* 75(2), 644-8.

Portman MA, Panos AL, Xiao Y, Anderson DL, Ning X (2001). HOE-642 (cariporide) alters pH(i) and diastolic function after ischemia during reperfusion in pig hearts in situ. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 280(2),H830-4.

Ravn HB, Moeldrup U, Brookes CIO, Ilkjaer LB, White P, Chew M, Jensen L, Johnson S, Birk-Soerensen L, Hjortdal VE (1999). Intravenous magnesium reduces infarct size after ischemia/reperfusion injury combined with a thrombogenic lesion in the left anterior descending artery. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 19(3), 569-74.

Redlin M, Werner J, Habazettl H, Griethe W, Kuppe H, Pries AR (2001). Cariporide (HOE 642) attenuates leukocyte activation in ischemia and reperfusion. *Anesth Analg.* 93(6),1472-9.

Reverter D, Sorimachi H, Bode W (2001). The structure of calcium-free human m-calpain: implications for calcium activation and function. *Trends Cardiovasc Med.* 11(6), 222-9.

Ruiz-Vela A, Serrano F, González MA, Abad JL, Benard A, Maki M, Martínez AC (2001). Transplanted long-term cultured pre-B1 cells

expressing calpastatin are resistant to B cell receptor-induced apoptosis. *J Exp Med.* 194(3), 247-54.

Saido TC, Mizuno K, Suzuki K (1991). Proteolysis of protein kinase C by calpain: effect of acidic phospholipids. *Biomed Biochim Acta.* 50, 485-487.

Saido TC, Nagao S, Shiramine M, Tsukaguchi M, Sorimachi H, Murofushi H, Tsuchiya T, Ito H, Suzuki K (1992). Autolytic transformation of μ -calpain upon activation as resolved by antibodies distinguishing between the pre- and post-autolysis forms. *J Biochem.* 111(1), 81-6.

Saido TC, Shibata M, Takenawa T, Murofushi H, Suzuki K (1992). Positive regulation of μ -calpain action by polyphosphoinositides. *J Biol Chem.* 267(34), 24585-90.

Saido TC, Yokota M, Nagao S, Yamaura I, Tani E, Tsuchiya T, Suzuki K, Kawashima S (1993). Spatial resolution of fodrin proteolysis in postischemic brain. *J Biol Chem.* 268(3), 25239-43.

Saido TC, Suzuki H, Yamazaki H, Tanoue K, Suzuki K (1993). In situ capture of μ -calpain activation in platelets. *J Biol Chem.* 268(10), 7422-6.

Saido TC, Sorimachi H, Suzuki K (1994). Calpain: new perspectives in molecular diversity and physiological-pathophysiological involvement. *FASEB J.* 8(11), 814-22.

Sandmann S, Yu M, Unger T (2001). Transcriptional and translational regulation of calpain in the rat heart after myocardial infarction: effects of AT1 and AT2 receptor antagonists and ACE inhibitor. *Br J Pharmacol.* 132(3), 767-77.

Sandmann S, Spormann J, Prenzel F, Shaw L, Unger T (2002). Calcium channel blockade limits transcriptional, translational and functional up-regulation of the cardiac calpain system after myocardial infarction. *Eur J Pharmacol.* 453(1), 99-109.

Santella L, Kyojuka K, Hoving S, Munchbach M, Quadroni M, Dainese P, Zamparelli C, James P, Carafoli E (2000). Breakdown of cytoskeletal proteins during meiosis of starfish oocytes and proteolysis induced by calpain. *Exp Cell Res.* 259(1), 117-26.

Scholz W, Albus U, Counillon L, Gögelein H, Lang HJ, Linz W, Weichert A, Schölkens BA (1995) Protective effects of HOE 642, a selective sodium-hydrogen exchange subtype 1 inhibitor, on cardiac ischemia and reperfusion. *Cardiovasc Res.* 29,260-268.

Scholz W, Jessel A, Albus U (1999). Development of the Na⁺/H⁺ exchange inhibitor cariporide as a cardioprotective drug: from the laboratory to the GUARDIAN trial. *J Thromb Thrombolysis.* 8(1),61-70.

Shibata T, Yamamoto F, Ohashi T, Nakajima N, Kinoshita H, Kawashima Y (1992). The effect of protease inhibitor upon the ischemia-reperfusion injury. *Nippon Kyobu Grka Gakkai Zasshi.* 40(10), 1853-8.

Siegmund B, Zude R, Piper HM (1992). Recovery of anoxic-reoxygenated cardiomyocytes from severe Ca²⁺ overload. *Am J Physiol.* 263, 1262-9.

Smart SC, Sagar KB, Schultz JE, Wartier DC, Jones LR (1997). Injury to the Ca²⁺ ATPase of the sarcoplasmic reticulum in

anesthetized dogs contributes to myocardial reperfusion injury. *Cardiovascular Research*. 36(2), 174-84.

Smith TPL, Simmen FA, Zhao G, Vallet JL (2001). Rapid communication: nucleotide sequences of two isoforms of porcine micromolar calcium-activated neutral protease 1 cDNA. *J Anim Sci*. 79(2), 552-3.

Sorimachi Y, Harada K, Saido TC, Ono T, Kawahima S, Yoshida K (1997). Downregulation of calpastatin in rat heart after brief ischemia and reperfusion. *J Biochem*. 122(4), 743-8.

Spencer MJ and Tidball JG (1992). Calpain concentration is elevated although net calcium-dependent proteolysis is suppressed in dystrophin-deficient muscle. *Exp Cell Res*. 203(1), 107-14.

Squier MKT, Sehert AJ, Sellins KS, Malkinson AM, Takano E, Cohen JJ (1999). Calpain and calpastatin regulate neutrophil apoptosis. *J Cell Physiol*. 178(3), 311-9.

Strobl S, Fernandez-Catalan C, Braun M, Huber R, Masumoto H, Nakaga K, Irie A, Sorimachi H, Bourenkow G, Bartunik H, Suzuki K, Bode W (2000). The crystal structure of calcium-free human m-calpain suggests an electrostatic switch mechanism for activation by calcium. *Proc Natl Acad Sci*. 97(2), 588-92.

Suzuki K, Imajoh S, Emori Y, Kawasaki H, Minami Y, Ohno S (1987). Calcium-activated neutral protease and its endogenous inhibitor. *FEBS Lett*. 220, 271-277.

Suzuki K (1990). The structure of the calpains and the calpain gene. In: *Intracellular Calcium-Dependent Proteolysis*, edited by Mellgren RL and Murachi T. Boca Raton, FL: CRC. p. 25-35.

Tavazzi B, Di Pierro D, Bartolini M (1998). Lipid peroxidation, tissue necrosis, and metabolic and mechanical recovery of isolated reperfused rat heart as a function of increasing ischemia. *Free Radic Res.* 28(1), 25-37.

Taylor RG, Christiansen JA, Goll DE (1991). Immunolocalization of the calpains and calpastatin in human and bovine platelets. *Biomed Biochem Acta.* 50, 491-8.

Theroux P, Ross Jr J, Franklin D, Kemper WS, Sasayama S (1976). Coronary arterial reperfusion. III. Early and late effects on regional myocardial function and dimensions in conscious dogs. *Am. J. Cardiol.* 38(5), 599-606.

Thompson K, Wisenberg G, Sykes J, Thompson RT (2003). MRI/MRS evaluation of cariporide in a canine long-term model of reperfused ischemic insults. *Magnetic resonance imaging/magnetic resonance spectroscopy. J Magn Reson Imaging.* 17(1),136-41.

Tompa P, Emori Y, Sorimachi H, Suzuki K, Friedrich P (2001). Domain III of calpain is a Ca^{2+} -regulated phospholipid-binding domain. *Biochem Biophys Res Commun.* 280(5), 1333-9.

Toyoda Y, Khan S, Chen W, Parker RA, Levitsky S, McCully JD (2001). Effects of NHE-1 inhibition on cardioprotection and impact on protection by K/Mg cardioplegia. *Ann Thorac Surg.* 72(3),836-43; discussion 843-4.

Toyo-oka T, Arisaka H, Sanma H (1989). Synergistic deleterious effect of micromolar Ca^{2+} ions and free radicals on respiratory function of heart mitochondria at cytochrome C and its salvage trial. *Biochem Biophys Res Commun.* 163(3), 1397-403.

Tsuchida K, Aihara H, Isogai K, Hanada K, Shibata N (1986). Degradation of myocardial structural proteins in myocardial infarcted dogs is reduced by Ep459, a cysteine proteinase inhibitor. *Biol. Chem Hoppe Seyler.* 367(1), 39-45.

Turski WA and Zaslouka J (2000). Activity of cathepsin D and L in the heart muscle of coronary patients during coronary aortal bypass graft operation. *Med Sci Monit.* 6(5), 853-60.

Vander Heide RS, Hill ML, Reimer KA, Jennings RB (1996). Effect of reversible ischemia on the activity of the mitochondrial ATPase: relationship to ischemic preconditioning. *J Mol Cell Cardiol.* 28(1), 103-12.

Waagstein LM, Wennberg E, Waagstein F, Haljamäe H (1999). Hypertonic saline without or with dextran-70 in the treatment of experimental acute myocardial ischemia and reperfusion. *Crit Care Med.* 27(3), 605-16.

Wakabayashi S, Shigekawa M, Pouyssegur J (1997). Molecular physiology of vertebrate Na⁺-H⁺exchangers. *Physiol Rev.* 77(1), 51-74.

Wang KKW and Yuen PW (1999). Calpain substrates, assay methods, regulation, and its inhibitory agents. In: *Calpain: Pharmacology and Toxicology of Calcium-Dependent Protease.* Taylor & Francis. p. 77-101.

Wann SR, Weil MH, Sun S, Tang W, Yu T (2002). Cariporide for pharmacologic defibrillation after prolonged cardiac arrest. *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* 7(3), 161-9.

Watanabe N, Vande Woude GF, Ikawa Y, Sagata N (1989). Specific proteolysis of the c-mos proto-oncogene product by calpain in fertilization of *Xenopus* eggs. *Nature*. 342(6249), 505-11.

Wirth KJ, Maier T, Busch AE (2001). NHE1-inhibitor cariporide prevents the transient reperfusion-induced shortening of the monophasic action potential after coronary ischemia in pigs. *Basic Res Cardiol*. 96(2),192-7.

Xie X, Dwyer MD, Swenson L, Parker MH, Botfield, MC (2001). Crystal structure of calcium-free human sorcin: a member of the penta-EF-hand protein family. *Protein Sci*. 10(12), 2419-25.

Yarbrough WM, Mukherjee R, Escobar GP, Mingoia JT, Sample JA, Hendrick JW, Dowdy KB, McLean JE, Stroud RE, Spinale FG (2003). Direct inhibition of the sodium/hydrogen exchanger after prolonged regional ischemia improves contractility on reperfusion independent of myocardial viability. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 126(5),1489-97.

Yoshida H and Karmazyn M (2000). Na⁺-H⁺-exchange inhibition attenuates hypertrophy and heart failure in 1-wk postinfarction rat myocardium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 278(1), H300-4.

Yoshida H, Takahashi M, Koshimizu M, Tanonaka K, Oikawa R, Toyooka T, Takeo S (2003). Decrease in sarcoglycans and dystrophin in failing heart following acute myocardial infarction. *Cardiovasc Res*. 59(2),419-27.

Yount RG (1993). Subfragment 1: the first crystalline motor. *J Muscle Res Cell Motil*. 14(6), 547-51.

Ytrehus K, Liu Y, Tsuchida A, Miura T, Liu GS, Yang XM, Herbert D, Cohen MV, Downey JM (1994). Rat and rabbit heart infarction:

effects of anesthesia, perfusate, risk zone, and method of infarct sizing. *Am J Physiol.* 267, H2383-90.

Zimmermann UJP, Boring L, Pak JH, Mukerjee N, Wang KK (2000). The calpain small subunit gene is essential: its inactivation results in embryonic lethality. *IUBMB Life.* 50(1), 63-8.

8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.2.1-1: Die Domänenstruktur der typischen Calpaine	6
Abbildung 1.3-1: Die Kopplung des Na ⁺ -H ⁺ -Antiporter an den Na ⁺ -Ca ²⁺ - Antiporter und die Na ⁺ -K ⁺ -ATPase.	17
Abbildung 3.2-1: Lokalisation des Tourniquet .	24
Abbildung 3.3-1: Der Versuchsaufbau	26
Abbildung 3.7-1: Digitale Aufnahme der Gewebsschnitte	32
Abbildung 3.8-1: Der Versuchsablauf als Zeitschema	34
Abbildung 4.2-1: Der systolische linke Ventrikeldruck im kontinuierlichen Monitoring.	37
Abbildung 4.3-1: Die Koronardurchblutung (ml/min) bzw. der <i>Flow</i> im kontinuierlichen Monitoring.	38
Abbildung 4.4-1: Die Herzfrequenz (min ⁻¹) im kontinuierlichen Monitoring.	39
Abbildung 4.5-1: Die Freisetzung der Laktatdehydrogenase, gemessen zu vier definierten Zeitpunkten im Perfusat.	40
Abbildung 4.5-2: Die Freisetzung der Kreatinkinase, gemessen zu vier definierten Zeitpunkten im Perfusat.	40
Abbildung 4.6-1: Infarktareale/Nekroseareale in Prozent der <i>area at risk</i>	42

9. Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.3.1-1: Die Perfusionslösung	28
Tabelle: 3.8-1: Versuchsreihenübersicht	33
Tabelle 4.1-1: Ausschlussübersicht	36

10. Abstract

Cytosolic Ca^{2+} overload during ischemia and reperfusion (Kihara et al. 1989; Marban et al. 1990) is considered to be mainly responsible for the activation of calcium-dependent calpains, localized primarily in the Z-disk/I-band region (Yoshimura et al. 1986; Kumamoto et al. 1992), and the subsequent breakdown of myocardial proteins. The calpain-dependent degradation of desmin, caldesmon (Yoshida et al. 1995), troponin I and T, and sarcoplasmic reticulum proteins, corresponding to the myofilament disintegration observed by electron microscopy (Gao et al. 1997; Goette et al. 2002), has been reported in ischemia-reperfusion models. Furthermore, calpain activation in ischemia and reperfusion is accompanied by the downregulation of its natural inhibitor calpastatin (Sorimachi et al. 1997; Enns et al. 2002). Besides direct myofilament disintegration, mitochondrial dysfunction is also considered to have an essential contribution to cardiac dysfunction and myocyte injury during ischemia and reperfusion (Lesnfsky et al., 2001).

Therefore, the present study seeks to evaluate the cardioprotective properties of a newly developed calpain inhibitor A-705253 (Lubisch et al. 2003) in isolated perfused rabbit hearts following temporary coronary occlusion, when administered alone and in combination with Cariporide[®], a Na^+/H^+ exchange inhibitor. Cariporide[®] reduces the intracellular Ca^{2+} -concentration and hence a decrease in calpain-activity (Chen et al. 2002).

Both inhibitors were studied in isolated perfused rabbit hearts subjected to 60-min occlusion of the ramus interventricularis of the left coronary artery (below the origin of the first diagonal branch), followed by 120 min of reperfusion. The inhibitors were added to the perfusion fluid in various final concentrations five minutes before the tourniquet was reopened and the period of reperfusion began.

Myocardial infarct size and the area at risk (transiently non-perfused myocardium) were determined from left ventricular slices after a

special staining procedure with Evans blue and 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride. The infarcted area (dead myocardium) was $77.9 \pm 2.3\%$ of the area at risk in untreated controls. The infarct size was significantly reduced in the presence of A-705253 calpain inhibitors in concentrations of 10^{-6}M and 10^{-7}M to $48,3 \pm 2,3 \%$ and $49,2 \pm 4,1 \%$ of the area at risk, corresponding to an infarct reduction of 66,4. %. As a result of an infarct size reduction of 61,8% (10^{-8}M), when A-705253 is administered from the beginning (Neuhof et al. 2004), experiments demonstrate that the essential myocyte injury takes place during the time of reperfusion.

As the calpain inhibitors used in our study also inhibit the lysosomal cysteine proteases cathepsin B and L, the discussion should be focused whether inhibition of both proteases could account for the cardioprotective effect. So far, very little information is available for both cathepsins in the heart. Thus, activation of cathepsin L was found in the intralysosomal compartment of cardiomyocytes during coronary aortal bypass (Turski and Zaslanka 2000). However, the increase in functional recovery and the decrease in protein degradation, total activity of cathepsin B and L, and in cathepsin B leakage by cysteine proteinase inhibitors in experimental models of myocardial ischemia and infarction (Tsuchida et al 1986; Shibata et al. 1992), cannot be related to both proteinases, as these inhibitors could also inhibit calpains.

The results showed that, both calpain inhibitor A- 705253 and the Na^+/H^+ exchange inhibitor Cariporide[®] reduced infarct size by the same degree, without an additive effect when they were combined. These findings suggest that cardioprotection in this present study is due to calpain inhibition, because cathepsin B and L are not calcium-activated proteases and their activity would not be inhibited by an Na^+/H^+ exchange inhibitor.

In a nut shell, having a firm understanding of the properties of A-705253 is a valuable tool for further pharmacological studies in coherence with cell damage due to ischemia and reperfusion.

11. 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."

Verena Fabiunke

12. Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Heinz Neuhof und seiner Frau Dr. med. Christiane Neuhof gilt mein besonderer Dank für die außergewöhnlich gute Betreuung in allen Phasen der Entstehung dieser Arbeit.

Bedanken möchte ich mich sehr bei Herrn Harald Michnacs (verstorben im Januar 2005). Als Freund, „gute Seele des Labors“, erfahrenen Kollegen und Retter bei allen Problemen im Laboralltag werden wir ihn schmerzlich vermissen.

Frau Antje Weber und Frau Tiziana Wieth möchte ich ebenfalls herzlich für Ihre Unterstützung danken.

Ohne die stetige Unterstützung von Jochen Dörr und meiner Familie und ihr uneingeschränktes Vertrauen in meine Fähigkeiten wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Aus diesem Grund möchte ich Ihnen ganz herzlich danken.

Angela Röhner, Petra Diemer, Katrin Kollmann und Michael Dücker danke ich ebenfalls herzlich für ihre außergewöhnliche und wertvolle Hilfe.