

Mechanismus der Insulin-vermittelten Myokardprotektion gegen den Reperfusionsschaden

ANNA GKATZOFLIA

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



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

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

1. Auflage 2010

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

1st Edition 2010

© 2010 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

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

www.doktorverlag.de

**Mechanismus der Insulin-vermittelten
Myokardprotektion gegen den
Reperfusionsschaden**

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

vorgelegt von

Anna Gkatzoflia
aus Kozani, Griechenland

Gießen 2009

Aus dem Physiologischen Institut

Kommissarischer Leiter: Prof. Dr. rer. nat. Klaus-Dieter Schlüter
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

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

2. Gutachter: Prof. Dr. Dill

Tag der Disputation: 26.03.2010

*Meinen Eltern Maria und Thoma,
meinem Mann Dimitri,
meinen Großeltern und
meinem Bruder Dimitri
gewidmet*

Inhaltsverzeichnis

1.	EINLEITUNG	4
1.1	Der myokardiale Reperfusionsschaden	4
1.2	Veränderungen der Kationenhomöostase während Ischämie	4
1.3	Pathomechanismen des Reperfusionsschadens	5
1.4	Modellrelevanz	6
1.5	Protektionsstrategien gegen den Reperfusionsschaden	6
1.6	Insulin-abhängige Protektion gegen den myokardialen Reperfusionsschaden	7
1.7	Ziele der Arbeit	8
2.	MATERIAL	9
2.1	Chemikalien	9
2.2	Zellkulturmedium	10
2.3	Perfusionsmedien	11
2.4	Geräte und Laborbedarf	12
3.	METHODEN	14
3.1	Isolierung von ventrikulären Kardiomyozyten	14
3.1.1	Versuchstiere	14
3.1.2	Präparationschritte für die Gewinnung von Kardiomyozyten adulter Wistar Ratten	14
3.2	Zellkultur	16
3.3	Fluoreszenzmikroskopische Messungen zur Ermittlung der intrazellulären Ionenkonzentration von Ca^{2+}	17
3.3.1	Ermittlung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration mittels des Fluoreszenzfarbstoffes Fura-2 AM und die Kalibrierung des Fluoreszenzsignals	17
3.4	eNOS Phosphorylierung	19

3.5	Messung der NO-Produktion mit Hilfe des Fluoreszenzindikators DAF-FM diacetate	19
3.6	Phospholamban- Phosphorylierung	20
3.7	Anoxie-Reoxygenationsexperimente	21
3.7.1	Apparative Voraussetzungen	21
3.7.2	Versuchsbeschreibung	22
3.7.3	Experimentelles Protokoll der Ischämie-Reperusionsversuche, verwendete Substanzen und der Messparameter	22
3.8	Statistik	25
4.	ERGEBNISSE	26
4.1	Zellulärer Energiestatus und Verlauf der Zelllänge und der zytosolischen Ca²⁺-Konzentration während simulierter Ischämie und Reperfusion	26
4.2	Einfluss von Insulin auf die Zelllänge und die zytosolische Ca²⁺- Erholung während der Reperfusion	28
4.3	Bedeutung der PI3-Kinase, der NO-Synthase und der Proteinkinase-G bei der Insulinvermittelten Protektionswirkung	30
4.3.1	Einfluss auf die zytosolischen Ca ²⁺ -Erholung während der Reperfusion	30
4.3.2	Beeinflussung der Zelllänge während der Reperfusion	32
4.4	Einfluss von Insulin auf die NO-Synthase	34
4.5	Einfluss von Insulin auf die Funktion des sarkoplasmatischen Retikulums	37
4.5.1	Die Rolle der SR-Ca ²⁺ -ATPase (SERCA)	37
4.5.2	Einfluss von Insulin auf die Phospholambanphosphorylierung	39
4.5.3	Bestimmung des sarkoplasmatischen Ca ²⁺ -Gehaltes durch Koffein-induzierte Ca ²⁺ -Freisetzung	42
5.	DISKUSSION	44
6.	ZUSAMMENFASSUNG	50

7.	SUMMARY	51
8.	LITERATUR	52
9.	ERKLÄRUNG	61
10.	DANKSAGUNG	62
11.	LEBENS LAUF	63

1. EINLEITUNG

1.1 Der myokardiale Reperfusionsschaden

Eine akute Einschränkung oder Unterbrechung der koronararteriellen Perfusion führt zur Minderversorgung des myokardialen Gewebes. Dabei ist das Gleichgewicht zwischen Sauerstoffbedarf und Sauerstoffangebot gestört. Dieser Zustand wird als Ischämie bezeichnet und resultiert zunehmend in einer strukturellen und funktionellen Schädigung, die zur kontraktile Dysfunktion bis hin zum Pumpversagen führen kann. Bei der Wiederversorgung des ischämisch geschädigten Myokards mit Sauerstoff und Substraten während der Reperfusion entwickelt sich paradoxerweise gerade während dieser Phase ein irreversibler Schaden. Dies weist darauf hin, dass die Reperfusion selber dem zuvor ischämisch geschädigten Myokard einen weiteren Schaden zufügt. Dieser Schaden wird als Reperfusionsschaden bezeichnet (Piper et al. 2004; 2008; Garcia-Dorado et al. 2004; Theroux et al. 2000). In den letzten zwei Jahrzehnten konnte gezeigt werden, dass pharmakologische Interventionen während der ersten Minuten der Reperfusion die Myokardschädigung verringern können (Staat et al. 2005; Kitakaze et al. 2007; Piot et al. 2008). Die Analyse der Mechanismen, die an der Entstehung des Reperfusionsschadens beteiligt sind, ist von großer Bedeutung für die Entwicklung therapeutischer Maßnahmen.

1.2 Veränderungen der Kationenhomöostase während Ischämie

Unter ischämischen Bedingungen kommt die mitochondriale Atmung zum Erliegen. Die aerobe Energiegewinnung wird durch die anaerobe Glykolyse ersetzt. Die Bildung von Milchsäure und die Nettohydrolyse von ATP (Dennis et al. 1991) führen zu einer Azidifizierung des ischämischen Myokards (Owens et al. 1996). Wegen der fortschreitenden Azidifizierung und der Hemmung der Phosphofruktokinase, dem Schlüsselenzym der Glykolyse, wird bald auch der anaerobe Weg der ATP-Produktion gehemmt. Die Folge ist ein dauerhaftes Energiedefizit.

Verursacht durch das Energiedefizit werden alle primär und sekundär aktiven Transportmechanismen gehemmt. Der transsarkolemmale Na^+ -Gradient wird

abgebaut, die Zellmembran depolarisiert (Cordeiro et al. 1994) und über den „reverse mode“ des Na^+ - Ca^{2+} -Austauschers kommt es zu einer Ca^{2+} -Überladung des Zytosols (Haigney et al. 1992; Ladilov et al. 1999). Die Störung der intrazellulären Ca^{2+} -Homöostase ist ein Zeichen einer fortgeschrittenen funktionellen Schädigung der ischämischen Myokardzellen.

1.3 Pathomechanismen des Reperfusionsschadens

Während der Reperfusion kommt es zur Wiederversorgung der Zelle mit Sauerstoff und Substraten. Paradoxerweise entwickelt sich gerade während dieser Phase der irreversible Reperfusionsschaden. Diese Wiederversorgung kann die Störung der zellulären Kationen-Homöostase rückgängig machen aber aktiviert gleichzeitig den kontraktilen Apparat. Die Reenergetisierung der Kardiomyozyten bei gestörter intrazellulärer Ca^{2+} -Homöostase mit einer gesteigerten zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration führt zu einer massiven Zellverkürzung der isolierten Kardiomyozyten. Diese Verkürzung wird Hyperkontraktur genannt und charakterisiert den zellulären Reperfusionsschaden (Siegmund et al. 1990; 1992). Das Ausmaß des Reperfusionsschadens wird mitunter durch die Länge der vorangehenden Ischämiephase bestimmt. Dabei korreliert die Dauer der ischämischen Phase negativ mit der Erholungsfähigkeit und positiv mit der strukturellen Schädigung der Kardiomyozyten.

Im Modell isolierter Herzmuskelzellen stellen sich die zytosolischen H^+ -, Na^+ - und Ca^{2+} -Konzentrationen innerhalb der ersten Minuten der Reperfusion wieder auf die präischämischen Ausgangswerte ein. Die Erholung der zytosolischen Ca^{2+} -Homöostase läuft in drei aufeinander folgenden Phasen ab (Siegmund et al. 1992; 1994):

1. schnelle Aufnahme der überschüssigen Ca^{2+} -Konzentration durch Aktivierung der Ca^{2+} -ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums,
2. transiente Freisetzung und Wiederaufnahme von Ca^{2+} in das sarkoplasmatische Retikulum (Ca^{2+} -Oszillationen),
3. Wiederherstellung der normoxischen Ausgangswerte der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration durch den „forward mode“ des Natrium-Calcium-Austauschers.

Die transienten Ca^{2+} -Oszillationen stellen einen bedeutenden Schädigungsparameter dar, da sie temporäre zytosolische Calciumüberladungen erzeugen, die zusammen mit der Restitution von ATP und dem intrazellulären pH-Wert die reperfusionsinduzierte Hyperkontraktion induzieren. Ca^{2+} bindet an Troponin C (Fabiato & Fabiato 1978; Orchard & Kentish 1990) und führt über eine Aktivierung der Myofibrillen zu einer unkontrollierten Kraftentwicklung, die die Zytoskelettstruktur irreversibel schädigt.

Die Hyperkontraktur bleibt nicht auf die primär betroffene Zelle beschränkt. In vivo führt die Hyperkontraktur zu Rupturen der Zellmembranen einander benachbarter Zellen und damit zur Nekrose (Ganote et al. 1983; Barrabes et al. 1996). Zur Ruptur der Zellmembranen kommt durch die mechanischen Kräfte zwischen den Zellen und sie wird durch eine Fortleitung der Hyperkontraktur durch Gap-Junctions noch verstärkt. Der Verlust an vitalem Muskelgewebe limitiert die Möglichkeit der Wiederbelebung von ischämischem Herzgewebe durch Reperfusion.

1.4 Modellrelevanz

Für die Analyse der Ionenhomeostase und der Zellschädigung ist das Modell isolierter ventrikulärer Herzmuskelzellen von Vorteil, da es erlaubt Veränderungen im Stoffwechsel und der zytosolischen Ionenkonzentration in der frühen Reperfusionsphase direkt auf zellulärer Ebene zu analysieren und mit der Entwicklung der reperfusionsinduzierten Hyperkontraktur in zeitlichen und kausalen Zusammenhang zu setzen. Das Elementargeschehen in der Reperfusion kann so besonders gut untersucht werden, da die isolierten Kardiomyozyten während der Hyperkontraktur keinen Zugkräften von benachbarten Zellen ausgesetzt sind und damit ihre sarkolemmale Integrität während dieses Vorgangs länger erhalten bleibt.

1.5 Protektionsstrategien gegen den Reperfusionsschaden

Während der Frühphase der Reperfusion ist die Entwicklung der Hyperkontraktur Auslöser für die irreversible myokardiale Zellschädigung. Die Entwicklung von Protektionsstrategien die gerade in der vulnerablen Frühphase der Reperfusion einsetzbar sind ist von besonderem therapeutischem Interesse.

Folgende Mechanismen wurden bereits untersucht und erwiesen sich in der Frühphase der Reperfusion als protektiv:

- a. Transiente Inhibierung des kontraktiles Apparates mit BDM (2,3-Butandionmonoxim), die direkt die myofibrilläre Aktivierung hemmt, (Siegmund et al. 1991; Garcia-Dorado et al. 1992).
- b. Beschleunigung der intrazellulären Ca^{2+} -Erholung und Verminderung der SR-abhängigen Oszillationen (Lochner et al. 1994; Siegmund et al. 1997; Abdallah et al. 2005).
- c. Reduktion der Ca^{2+} -Sensitivität der Myofibrillen durch Aufrechterhaltung der ischämischen Azidose in der frühen Reperusionsphase durch Blockade der pH-regulierenden Mechanismen (Schäfer et al. 2000; Ladilov et al. 1995; Ruprecht et al. 2000; Harrison et al. 1992; Kitakaze et al. 1988).
- d. Ischämisches Postconditioning durch eine Folge kurzer Ischämieperioden vor der endgültigen Reperfusion (Zhao et al. 2003; Tsang et al. 2004; Staat et al. 2005, Thibault et al. 2008).
- e. Aktivierung der Kinasen der „Reperfusion Injury Salvage Kinases“ Signalkaskade (RISK): Unter anderen die PI3-Kinase (PI3K), die Proteinkinase G (PKG) und die Glykogensynthase-Kinase 3 β (GSK-3 β). Wobei hier die Aktivierung der PI3K und der PKG und die Hemmung der GSK-3 β protektiv wirkt (Hausenloy et al. 2004; 2005, Bell et al. 2003). Der PKG-abhängige Signalweg kann in Herzmuskelzellen z.B. durch NO-Donoren (Schlüter et al. 1994; Padilla et al. 2000) oder natriuretische Peptide (Hempel et al. 1997; Padilla et al. 2001; Abdallah et al. 2005, Kitakaze et al. 2007) aktiviert werden.

1.6 Insulin-abhängige Protektion gegen den myokardialen Reperfusionsschaden

Die protektive Wirkung von Insulin im Rahmen eines Ischämie-Reperusionsgeschehens konnte sowohl in klinischen als auch in experimentellen Studien am isolierten, reperfundierten Herzen gezeigt werden. Die klinischen Studien zeigen, dass die Behandlung von Patienten mit myokardialem Infarkt während der Reperfusion mit Glukose-Insulin-Kalium protektiv wirkt und zu einer Reduktion der

„in-hospital-mortality“ führt (Sodi-Pallares et al. 1962; Apstein et al. 1998; Diaz et al. 1998; van der Horst 2003). Experimentell wurde der Mechanismus der Insulinwirkung am isoliert perfundierten Herzen näher untersucht. Hier führte der Einsatz von Glucose-Insulin-Kalium während der Reperfusion zu einer Reduktion der Infarktgröße (Jonassen et al. 2000). Weiterhin zeigten Jonassen et al. 2000 in einer anderen Studie, dass der Einsatz von Insulin allein zur Verminderung des Zelltods führt. Als Signalweg wurde eine Insulin-bedingte Aktivierung der PI3-Kinase und der Akt-Kinase (Jonassen et al. 2001) mit anschließender eNOS-Aktivierung identifiziert (Gao et al. 2002). Dieser Effekt war glucose- und kaliumunabhängig. Inwieweit Insulin die zellulären Ursachen des frühen Reperfusionsschadens, die die reperfusionsinduzierte Hyperkontraktur herbeiführen, beeinflusst und ob dieser Wirkung von Insulin eine Beeinflussung der Ca^{2+} -Homöostase in den Kardiomyozyten zugrunde liegt, ist bisher nicht geklärt worden.

1.7 Ziele der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit wurde an isolierten ventrikulären Herzmuskelzellen adulter Ratten unter Bedingungen von simulierter Ischämie und Reperfusion die Wirkung von Insulin auf den Reperfusionsschaden untersucht. Als Parameter wurden simultan die zytosolische Ca^{2+} -Homöostase und die Hyperkontraktur analysiert. Um zu klären, über welche Mechanismen die Insulinwirkung vermittelt wird, wurde unter diesen experimentellen Bedingungen die Rolle der PI3-Kinase (PI3K), der NO-Synthase (NOS) und der cGMP - abhängige Proteinkinase (PKG) analysiert. Es wurde der Einfluss dieses Signalweges auf die Funktion des sarkoplasmatischen Retikulums und auf ihre Ca^{2+} -ATPase mit ihrem regulierenden Protein Phospholamban untersucht.

2. MATERIAL

2.1 Chemikalien

Albumin (aus Rinderserum, BSA)	Roche Applied Science, Mannheim
Kollagenase, Typ CLS II	Biochrom KG, Berlin
Cystein	Sigma, Taufkirchen
EGTA	Sigma, Taufkirchen
Fura-2 AM	Molecular Probes, Leiden (Niederlande)
FCS	PAA Laboratories, Cölbe
Hepes	Roche Applied Science, Mannheim
Medium 199	Biochrom, Berlin
N ₂	Messer Griesheim, Krefeld
Nigericin	Sigma, Taufkirchen
Resazurin	Sigma, Taufkirchen
Koffein	Sigma, Taufkirchen
Insulin	Sigma, Taufkirchen
KT 5823	Calbiochem, Bad Soden
LY 294002	Calbiochem, Bad Soden
L-NMMA	Calbiochem, Bad Soden
Thapsigargin	Calbiochem, Bad Soden
Polyacrylamid-Gel	Invitrogen, Karlsruhe
PVDF	Millipore, Eschborn
Penicillin	Invitrogen, Karlsruhe
Streptomycin	Invitrogen, Karlsruhe
Phospholamban-antibody (anti-PLB, rabbit)	Santa Cruz Biotechnology Heidelberg
phospho-specific phospholamban- antibody (anti-pPLB, rabbit, Ser ¹⁶)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Alkaline phosphatase-labeled anti-rabbit IgG antibody	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg

Methanol 4%	Roth, Karlsruhe
PBS (phosphate-buffered saline)	Invitrogen, Karlsruhe
phospho-specific anti-eNOS antibody (rabbit, Ser ¹¹⁷⁷)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
anti-rabbit IgG, biotin conjugated	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Texas-Red conjugated streptavidin	Rockland Immunochemical, Hamburg
DAF FM diacetat(4-amino-5-methylamino-2',7'- difluorescein diacetate)	Molecular Probes, Leiden (Niederlande)

Die übrigen verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Sigma (Taufkirchen), Roche Applied Science (Mannheim), Invitrogen (Karlsruhe) und Merckbiosciences (Darmstadt) in der höchsten erhältlichen Qualität bezogen.

Alle verwendeten Chemikalien wurden nach Herstellerangaben gelöst und aufbewahrt.

2.2 Zellkulturmedium

M199/ HEPES-Stammlösung

Medium 199	9,8 g/l, Aqua bidest
HEPES	36 g/l
Kreatin	5 mM
Karnitin	2 mM
Taurin	5 mM
FCS	4 % (vol/vol)
Penicillin	100 IU/ml
Streptomycin	100 µg/ml

Lösung auf pH-Wert 7,4 titriert

Alle Medien wurden sterilisiert und bei 4°C aufbewahrt.

2.3 Perfusionsmedien

Für unsere Experimente waren verschiedene Perfusionsmedien notwendig, deren Zusammensetzung im Folgenden beschrieben wird:

Normoxische HEPES-gepufferte Tyrode-Lösung:

Substanz	Konzentration in mM
NaCl	125,0
KCl	2,6
KH ₂ PO ₄	1,2
MgSO ₄	1,2
CaCl ₂	1,0
HEPES	25,0
Glukose	2,5

pH-Wert 7,4 bei 37 °C, titriert mit 1 N NaOH.

Anoxische HEPES-gepufferte Tyrode-Lösung:

Substanz	Konzentration in mM
NaCl	125,0
KCl	2,6
KH ₂ PO ₄	1,2
MgSO ₄	1,2
CaCl ₂	1,0
HEPES	25,0

pH-Wert 6,4 bei 37 °C, titriert mit 1 N NaOH.

Nach der von Allshire et al. (1987) beschriebenen Methode wurde das Medium autoklaviert. Vor dem Autoklavieren wurde der Redoxindikator (Resazurin) (1 % vol/vol) und Cystein (5,0 mM) zugesetzt und so lange mit N₂ begast, bis ein Farbumschlag von lila nach rosa sichtbar wurde. Anschließend wurde die Tyrode-

Lösung mittels dampfdrucktauglicher Gefäße für 40 min bei 2 bar und 120 °C autoklaviert. Nach der Autoklavierung wurden die farblosen Medienbehälter für die Versuche verwendet, da der Farbverlust des Redoxindikators Resazurin die anoxische Beschaffenheit des Mediums anzeigt. Verbleibende rosafarbige Medien wurden verworfen.

2.4 Geräte und Laborbedarf

Zellkultur:

Präparationsbesteck	Eickenmeyer, Tuttlingen
Langendorff-Apparatur	Eigenbau, der Werkstatt des Physiologischen Instituts, JLU-Gießen
Gewebehacker	Harvard Apparatus, über Hugos Sachs Elektronik, March-Hugstetten
Nylonnetz	NeoLab, Heidelberg
Mikroskop	TMS-F, Nikon, (Japan)
Deckgläser	Menzel, Braunschweig
Sterilbank	Thermo Fisher, Schwerte
Brutschrank	Thermo Fisher, Schwerte

Fluoreszenzmessungen:

Inverses Mikroskop	Olympus, Hamburg
Xenonlampe	USHIO INC., Japan
Monochromator	TILL Photonics, Gräfelfing
Dichroid-Spiegel	TILL Photonics, Gräfelfing
Emissionsfilter	TILL Photonics, Gräfelfing
CCD Camera	TILL Photonics, Gräfelfing
Computer-Software	TILL Photonics, Gräfelfing

Anoxie-Reoxygenationsexperimente:

Perfusionskammer	Eigenbau der Werkstatt des Physiologischen Instituts, JLU- Gießen
Peristaltikpumpe	Gilson-Abimed, Langenfeld
Dampfdruckkochtopf	All American, Canada
Druckstabile Glasgefäße mit verschließbarem Deckel	Bormioli Rocco, Italien
Edelstahlkapillaren	Alltech, Unterhaching
Gasdichte Schläuche	Kalensee, Gießen
Gasventile	Kalensee, Gießen

Sonstige Geräte:

Inkubator	Kendro, Hanau
Glasgeräte	Schott, Mainz
Heizrührer	Jahnke & Kunkel, Staufen
pH-Meter	WTW, Weinheim
Pipetten	Eppendorf-Nethler-Hinz, Hamburg
Wasserbad	Julabo, Seelbach
Zentrifugen	Kendro, Hanau
Wasserdemineralisierungsanlage	Millipore, Eschborn
Perfusionsheizung	Eigenbau der Werkstatt des Physiologischen Instituts, JLU- Gießen

Verbrauchsmaterialien:

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

3. METHODEN

3.1 Isolierung von ventrikulären Kardiomyozyten

3.1.1 Versuchstiere

Als experimentelles Modell verwendeten wir ventrikuläre Kardiomyozyten von adulten männlichen, 200 - 300 g schweren Wistar Ratte. Die Züchtung erfolgte im Tierstall des Physiologischen Institutes der Justus-Liebig-Universität Gießen. Die Tiere hatten freien Zugang zu Nahrung (Standardfutter Altromin) und Wasser.

3.1.2 Präparationschritte für die Gewinnung von Kardiomyozyten adulter Wistar Ratten

Für die Isolierung der ventrikulären Kardiomyozyten wurde die von Piper et al. (1982) beschriebene Methode verwendet. Dazu waren folgende Lösungen notwendig:

Ca²⁺-Stammlösung:

Substanz	Konzentration in mM
CaCl ₂	100,0

Powell – Medium:

Substanz	Konzentration in mM
NaCl	110,0
NaHCO ₃	25,0
KCl	2,6
KH ₂ PO ₄	1,2
MgSO ₄	1,2
Glukose	11,0

Kollagenasepuffer:

Substanz	Menge
Powell-Medium	50 ml
Kollagenase	x mg (Chargenabhängig)
Ca ²⁺ -Stammlösung	12,5 µl

Die Narkotisierung der Ratten erfolgte mit Ether und anschließend wurden die Tiere durch Genickbruch getötet. Zunächst wurde der Brustraum geöffnet, das Perikard entfernt, Herz und Lunge angehoben, durch einen Scherenschnitt vom Körper getrennt und direkt in eiskalte isotonische NaCl-Lösung gelegt. In der isotonischen NaCl-Lösung verbleibend wurde das Herz freipräpariert und danach wurde es mit der Aorta an eine Langendorff-Apparatur angeschlossen und für ca. 2 Minuten mit Powell - Medium (20 ml) perfundiert um verbliebenes Blut aus den Koronarien zu entfernen. Nachdem das Herz in der nächsten Rezirkulationsphase mit dem Kollagenasepuffer perfundiert (2 - 3 ml/min) wurde, erfolgte eine Durchtrennung unterhalb der Vorhöfe und anschließend eine Zerkleinerung des Herzens. Erst mechanisch mit einem Gewebehacker und dann manuell mit zwei Skalpell. Um von dem gewonnenen Gewebe die Herzmuskelzellen zu vereinzeln, erfolgte nach einer zehnmütigen Inkubation in Rezirkulationspuffer (37°C) vorsichtiges Auf- und Absaugen mit einer 5-ml-Pipette. Danach wurde die Zellsuspension durch ein Nylonnetz (0,2 mm Porengröße) filtriert, was zu einer Abtrennung der verbliebenen Zellaggregate führte. Das Filtrat wurde bei 25 x g für 3 min zentrifugiert und das Pellet mit Powell-Medium, welches 200 µM CaCl₂ enthielt, aufgenommen. Nach erneuter Zentrifugation (25 x g für 2 min) erfolgte die Resuspension der Kardiomyozyten mit Powell-Medium. Die Suspension wurde entsprechend der Anzahl der präparierten Herzen auf Reagenzgläser, die zuvor mit einer ca. 10 ml hohen Flüssigkeitssäule aus Powell – Medium gefüllt wurden, verteilt. Als letzter Schritt erfolgte eine Zentrifugation (25 x g für 1 min) aus der eine Zellpopulation die zu 70 - 80 % aus stäbchenförmigen Kardiomyozyten bestand gewonnen wurde.

3.2 Zellkultur

Über Nacht wurden die Kulturschalen mit Kulturmedium (M199/HEPES), um ein besseres Anheften der Kardiomyozyten an den Deckgläschen zu erreichen, vorplattiert. Unmittelbar vor dem Ausplattieren erfolgte eine Absaugung des Kulturmediums. Die gewonnene Zellpopulation wurde mit Kulturmedium (25 ml pro Herz) aufgenommen und gleichmäßig auf die vorplattierten Schalen verteilt. Es erfolgte eine vierstündige Anheftungsphase (37°C). Danach wurden die Zellen mit Kulturmedium gewaschen, um abgerundete Zellen zu entfernen. Am Ende bestand die gewonnene Zellkultur aus ca. 90 % stäbchenförmigen Kardiomyozyten.

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

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

Die Ermittlung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration beruht auf Fluoreszenzmikroskopie. Die Kardiomyozyten werden mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 AM (5 μM) in Zellkulturmedium für 30 Minuten bei 37°C beladen um die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration zu bestimmen. Danach wurde das Medium gewechselt es erfolgte eine 15-minütige Nachinkubation. Fura-2 AM gelangt als Acetoxymethylester in die Zellen. Intrazellulär wird es von Esterasen gespalten und kann als geladenes Molekül nicht mehr die Zellmembran permeieren.

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

Es wurde folgende Lösung benutzt:

Kalibrierungslösung:

Substanz	Konzentration
NaCl	10 mM
KCl	125 mM
MgSO ₄	1 mM
HEPES	25 mM
Ionomycin	5 μM
Nigericin	10 mg/l
Zusatz von CaCl ₂ oder EGTA	3 mM 5 mM

pH 7,4 bei 37 C°, titriert mit 1 N KOH.

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

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

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

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

R_{\max} : Maximales Ratio

R_{\min} : Minimales Ratio

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

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

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

In isolierten Kardiomyozyten ermittelten Ladilov et al. 1997 pH-abhängig folgende Werte:

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

3.4 eNOS- Phosphorylierung

Die Kardiomyozyten wurden 20 Minuten mit 4% Methanol fixiert. Danach wurden die Zellen mit PBS (phosphate-buffered saline) gewaschen und für eine Stunde mit dem ersten Antikörper gegen phosphorylierte-eNOS (phospho-specific anti-eNOS antibody (rabbit, Ser¹¹⁷⁷)) (1:300) bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Zellen mit PBS gewaschen und der zweite Antikörper (anti-rabbit IgG, biotin conjugated) (1:10 000) wurde für 30 Minuten nachinkubiert. Die Zellen wurden anschließend mit PBS gewaschen und mit Texas Red konjugiertem Streptavidin (1:800) über Nacht inkubiert. Die Anregung von Texas Red konjugiertem Streptavidin erfolgte mit einer Wellenlänge von 595 nm und die Visualisierung erfolgte mit einem Imaging System (Till Photonics).

3.5 Messung der NO-Produktion mit Hilfe des Fluoreszenzindikators DAF-diacetate

Mit Hilfe des Fluoreszenzindikators DAF-FM diacetate (4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorescein diacetat) wurde während der Reperfusion die intrazelluläre Produktion von freiem NO gemessen. DAF-FM wird von den Zellen als Diacetat aufgenommen, das durch die Zellmembran passiv diffundieren kann. Intrazellulär wird das Diacetat von Esterasen gespalten. Das entstandene DAF-FM kann nicht mehr durch die Zellmembran diffundieren. In unseren Experimenten wurden die Zellen bei 37°C mit 5 µM DAF-FM diacetate für 45 Minuten beladen und dann für 45 Minuten gewaschen. Die Anregung von DAF-FM erfolgte mit der Wellenlänge 470 nm und die Visualisierung erfolgte mit einem Imaging-System (Till Photonics).

3.6 Phospholamban- Phosphorylierung

Für die Bestimmung der PLB-Phosphorylierung wurden die Kardiomyozyten unter normoxischen Bedingungen, nach 60 Minuten Hypoxie und nach 5 Minuten Reperfusion in Anwesenheit oder Abwesenheit von Insulin oder in Anwesenheit von Insulin+LY294002 oder von Insulin+L-NMMA oder von Insulin+KT5283 mit Lysispuffer behandelt. Der Proteingemisch (30µg) wurde dann auf eine 18,5% (wt/vol) SDS-PAG Trägermatrix übertragen. Hierbei wurden die Proteine zuerst mit einem Polyacrylamid-Gel in Proteinbanden aufgetrennt. Nach der Elektrophorese wurden die Proteine dem Western blotting unterzogen. Dort wandern die Proteine durch ein senkrecht zum Polyacrylamid-Gel gerichtetes elektrisches Feld aus dem Gel auf eine PVDF- Membrane. An der Membranoberfläche bleiben sie aufgrund hydrophober Wechselwirkungen haften. Die Membrane wurde anschließend für eine Stunde mit 3% (wt/vol) BSA (bovine serum albumin) abgesättigt, um die freien Bindungsstellen zu blockieren und wurden mit dem Phospholamban-Antikörper (rabbit-anti-PLB) oder einem phosphospezifischen Phospholamban-Antikörper (rabbit anti-pPLB, Ser16) (0,5 µg/ml) inkubiert. Nachdem die Membranen gewaschen wurden, um schwächer haftende, unspezifisch gebundene Antikörper von der Membran zu entfernen, wurden sie mit einem anti-rabbit IgG-AP-Antikörper (0,5 µg/ml) inkubiert. Totales Phospholamban und phosphoryliertes Phospholamban wurden densitometrisch quantifiziert. Das Verhältnis von phosphoryliertem Phospholamban vs. totem Phospholamban wurde der statistischer Analyse zugeführt.

3.7 Anoxie-Reoxygenationsexperimente

3.7.1 Apparative Voraussetzungen

Die Messungen wurden mit Hilfe eines inversen Mikroskopes durchgeführt, welches an das System von Till Photonics gekoppelt war. Mit Hilfe von Monochromatoren konnte das Anregungslicht, das von einer Xenonlampe entsendet wurde, entsprechend dem Anregungsspektrum des verwendeten Fluoreszenzfarbstoffes eingestellt werden. Die selektierten Wellenlängen trafen dann über Dichroid-Spiegel im Strahlengang auf das Objekt und führten zur Anregung des Farbstoffes. Das emittierte Licht gelangte über den Dichroid-Spiegel zu einer CCD Kamera. Das eintreffende Signal wurde digitalisiert, aufgezeichnet und mit dem dazugehörigen Software-Programm ausgewertet (Abb. 1).

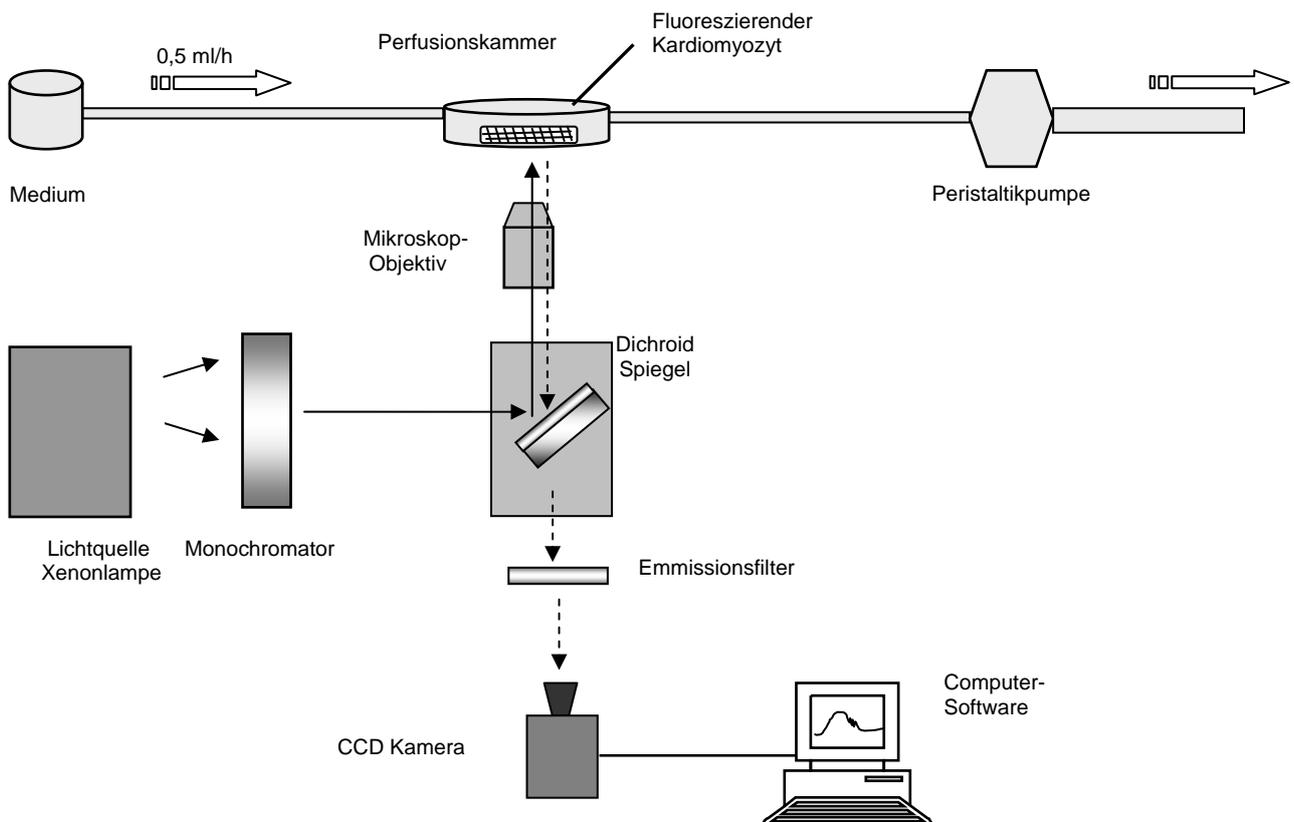


Abb. 1:

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

3.7.2 Versuchbeschreibung

Zur Durchführung der Anoxie-Reoxygenationsexperimente war es notwendig, dass das Perfusionssystem gasdicht verschlossen war. In der Perfusionskammer wurden die Deckgläschen mit den darauf angehefteten Zellen eingebaut und anschließend wurde die Kammer fest verschraubt. Die Perfusionskammer wurde von der einen Seite mittels Edelstahlkapillaren mit den autoklavierten Medien und von der anderen Seite mit einer Peristaltikpumpe verbunden, die das Medium mit einer Geschwindigkeit von 0,5 ml/min durch das Perfusionssystem pumpt. (Abb.1). Das Medium wurde während des Anoxie-Experimentes mit N₂ (100%) begast. Die Temperatur in der Perfusionskammer betrug 37°C.

3.7.3 Experimentelles Protokoll der Ischämie-Reperfusionssversuche und der Messparameter

Um Ischämie und Reperfusion zu simulieren, wurden die Kardiomyozyten 60-80 Minuten anoxisch mit einer Hepes-gepufferten Tyrode-Lösung bei einem pH-Wert von 6,4 inkubiert und anschließend 15 Minuten bei einem pH-Wert von 7,4 reperfundiert. Der Einsatz von Insulin, LY294002, L-NMMA, KT5823 und Thapsigargin erfolgte während der gesamten Reperfusion. Der Einsatz von Koffein erfolgte 20 Minuten nach Reperfusionbeginn. Die nachfolgenden Tabellen geben einen Überblick über die Eigenschaften und die eingesetzten Konzentrationen der verwendeten Substanzen (Tabelle 1) und über die in den Experimenten gemessenen Parameter (Tabelle 2).

Tabelle 1: Verwendete Substanzen

Substanz	Konzentration	Lösungsmittel	Eigenschaften
Insulin	10 mU/L	H ₂ O	Aktivierung der PI3-Kinase
LY294002	1 μ M	DMSO	Hemmung der PI3-Kinase
L-NMMA	100 μ M	H ₂ O	Hemmung der NO-Synthase
KT5823	1 μ M	DMSO	Hemmung der Proteinkinase G
Thapsigargin	150 nM	DMSO	Hemmung der Ca ²⁺ -ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums
Koffein	10 mM	H ₂ O	Freisetzung von Ca ²⁺ aus dem sarkoplasmatischen Retikulum

Tabelle 2: Messparameter

Parameter	Einheit	Methode
Zytosolischer Ca^{2+} -Gehalt	In „relative Einheiten“ (r.E.) der Fura-2-Ratio oder als Absolutwerte	Fura-2-Fluoreszenz
Diastolischer bzw. systolischer Ca^{2+} -Wert	Maximum bzw. Minimum einer Oszillation; wiedergegeben in „relative Einheiten“ (r.E.) des Fura-2-Ratios	Fura-2-Fluoreszenz
Ca^{2+} -Oszillationen	Frequenz (Anzahl der Oszillationen pro Minute)	Fura-2-Fluoreszenz
Endischämische Zelllänge (Rigorlänge)	Zelllänge (in %) am Ende der simulierten Ischämie bezogen auf die Ausgangslänge	Zelllängenmessung
Reoxygenationsbedingte Zelllängenverkürzung (Hyperkontraktur)	% der Zelllänge bezogen auf end-ischämische Länge	Zelllängenmessung
Zeitpunkt des Rigoreintritts (Rigorzeitpunkt)	Zeitdifferenz (min) zwischen Anoxiebeginn und Rigoreintritt	Zeitmessung
Phospholamban-Phosphorylierung	Verhältnis zwischen dem phosphorylierten Phospholamban und totalen Phospholamban	Gelelektrophorese und Western blot

eNOS-Phosphorylierung	Fluoreszenzintensität in % bezogen auf den normoxischen Wert (100%)	Immunfluoreszenz
NO Produktion	DAF-FM-Fluoreszenz in % bezogen auf den Wert bei Beginn der Reperfusion (100%)	DAF-FM-Fluoreszenz

3.8 Statistik

Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM von n verschiedenen Experimenten wiedergegeben. Statistische Vergleiche wurden durch einfache Varianzanalyse unter Nutzung des Student-Newman-Keuls-Tests für Post-hoc-Analysen durchgeführt (Ludbrook, 1994). Unterschiede mit $p < 0,05$ wurden als statistisch signifikant angesehen.

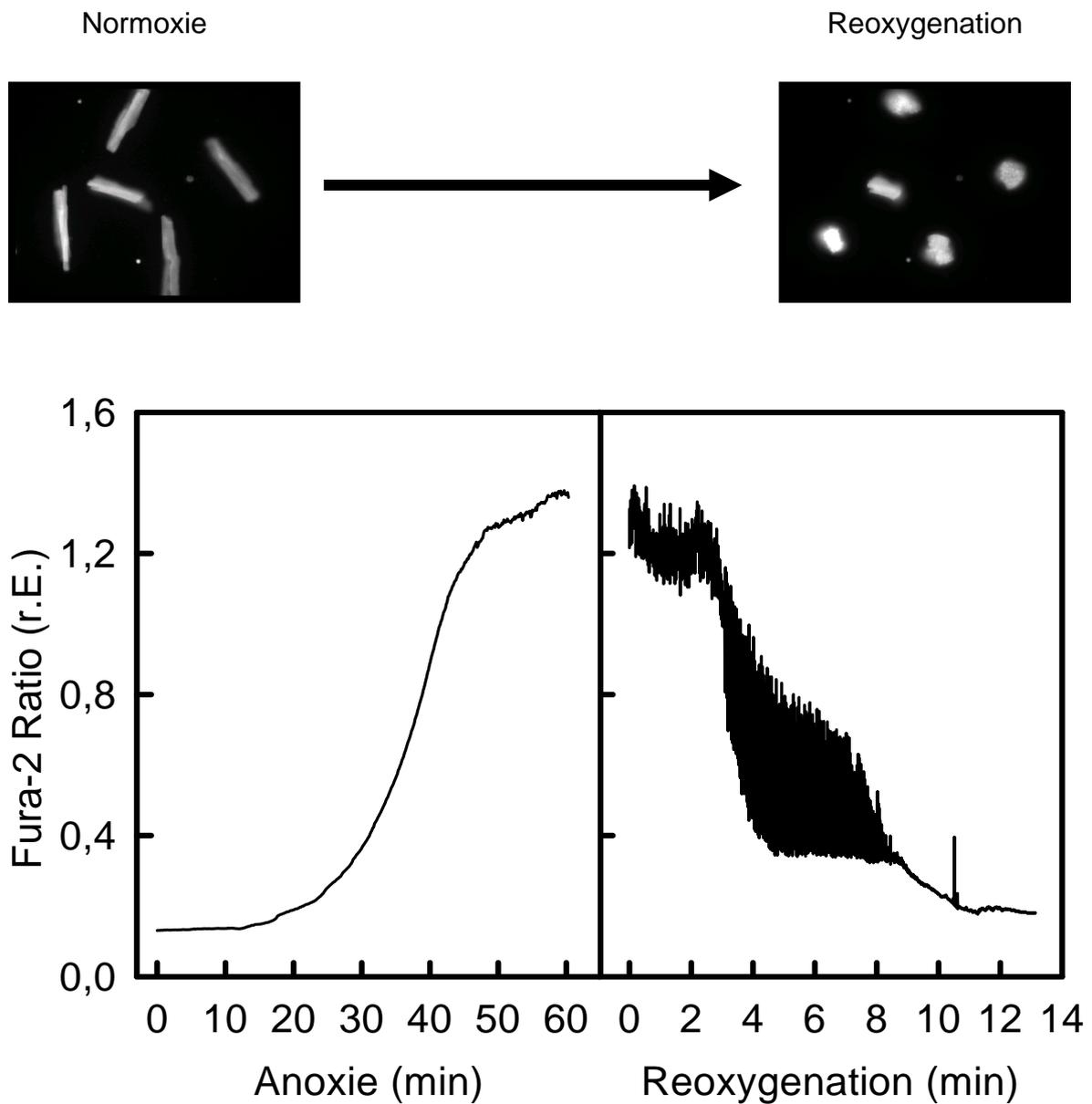
4. ERGEBNISSE

4.1 Zellulärer Energiestatus und Verlauf der Zelllänge und der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration während simulierter Ischämie und simulierter Reperfusion

Um Ischämie- und Reperfusionsbedingungen zu simulieren, wurden die Kardiomyozyten anoxisch inkubiert und anschließend reoxygeniert. Die anoxische Inkubation wurde mit einem anoxischen Perfusionsmedium mit pH-Wert 6,4 (simulierte Ischämie) und die Reperfusion mit einem normoxischen Perfusionsmedium mit pH-Wert 7,4 (simulierte Reperfusion) durchgeführt.

Während simulierter Ischämie wird der ATP-Gehalt abgebaut. Morphologisch wirkt sich dies in der Entwicklung der Rigorkontraktur aus. Die Zellen verkürzen sich um ca. 30% ihrer Ausgangslänge und verharren in diesem Zustand bis zum Ende der Anoxie. Unmittelbar nach dem Eintritt der Rigorkontraktur steigt die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration an und die Zellen entwickeln bis zum Ende der Anoxie eine massive Ca^{2+} -Überladung. Das Fura-2-Ratio steigt von einem präanoxischem Wert von 0,15 in relativen Einheiten auf einen endanoxischen Wert von 1,3 in relativen Einheiten ($n=25$) an. Dies entspricht einem Ca^{2+} -Anstieg von 85 ± 20 nM auf $1,62 \pm 0,10$ μM (Abb. 2, unten).

Die simulierte Reperfusion führt zur Erholung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration. Innerhalb von 10 Minuten stellt sich der normoxische Ausgangswert wieder ein. Vorher kommt es zum Auftreten von Ca^{2+} -Oszillationen. Die Amplitude und Frequenz der Oszillationen nimmt im Verlauf der Reperfusion ab (Abb. 2, unten). Einhergehend mit den Ca^{2+} -Oszillationen entwickeln die Zellen eine massive Hyperkontraktur. Sie verkürzen sich auf 30-40% ihrer Ausgangslänge (Abb. 2, oben). Die Hyperkontraktur ist irreversibel.

**Abbildung 2:**

Oben: Morphologie der mit Fura-2 beladenen Zellen während Normoxie und Reperfusion unter Kontrollbedingungen

Unten: Änderung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration (Fura-2-Ratio, relative Einheiten) und der Oszillationen während simulierter Ischämie und simulierter Reperfusion unter Kontrollbedingungen (exemplarischer Verlauf).

4.2 Einfluss von Insulin auf die Zelllänge und die zytosolische Ca²⁺-Erholung während der Reperfusion

Um den Einfluss von Insulin auf die intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration und die Zelllänge während der Reperfusion zu untersuchen, wurde Insulin mit Beginn der Reperfusion appliziert. Der obere Teil von Abb. 3 zeigt die Morphologie der Zellen während Normoxie und Reperfusion in Gegenwart von Insulin. Die mit Insulin behandelten Zellen waren gegen die reperfusionsinduzierte Hyperkontraktur geschützt. Der Verlauf des Fura-2-Ratios und die zytosolischen Ca²⁺-Oszillationen während Reperfusion wurden in Anwesenheit bzw. Abwesenheit von Insulin untersucht. Wie in Abb. 3 (unten) gezeigt führte der Einsatz von Insulin (10 mU) während der Frühphase der Reperfusion zu einer Beschleunigung der Ca²⁺-Erholung und einer Verminderung der zytosolischen Ca²⁺-Oszillationen.

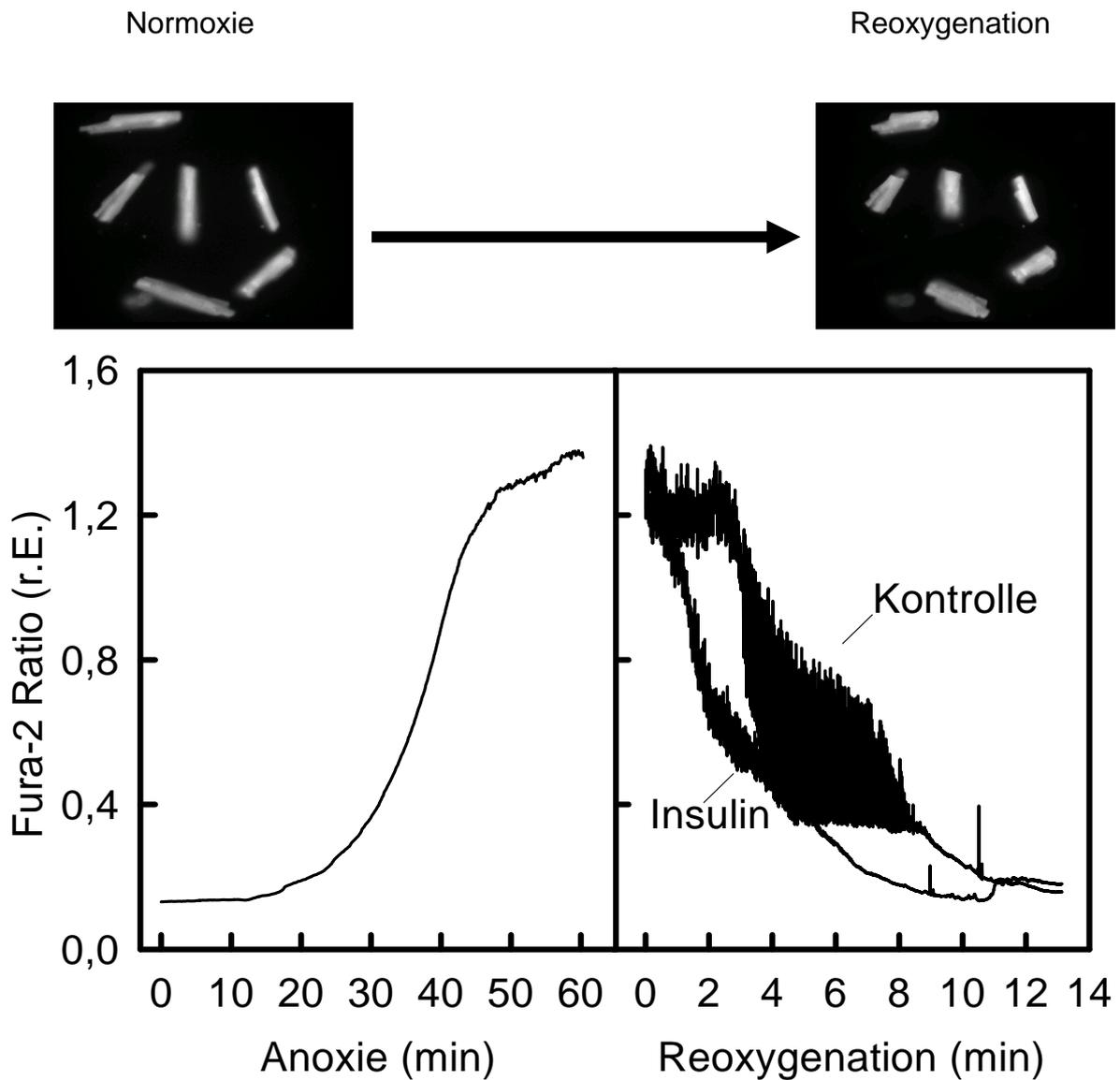


Abb. 3:

Oben: Morphologie der mit Fura-2 beladenen Zellen während Normoxie und Reperfusion in Gegenwart von Insulin (10 mU).

Unten: Exemplarischer Verlauf des Fura-2-Ratios (r.E.) und der Oszillationen während der Reperfusion in einem Kardiomyozyt unter Kontrollbedingungen und in Gegenwart von Insulin (10 mU).

4.3 Bedeutung der PI3-Kinase, NO-Synthase und Proteinkinase G bei der Insulinvermittelten Protektionswirkung

4.3.1 Einfluss auf die zytosolische Ca²⁺-Erholung während der Reperfusion

Um zu beurteilen über welchen Signalweg der protektive Effekt von Insulin vermittelt wird, wurde die Rolle der PI3-Kinase, der NO-Synthase und der Proteinkinase G während der Reperfusion untersucht. Die zytosolische Ca²⁺-Erholung und die Zelllänge während der Reperfusion wurden analysiert während die PI3-Kinase (PI3K) durch LY294002, die NO-Synthase (NOS) durch L-NMMA oder die Proteinkinase G (PKG) durch KT5823 gehemmt wurde.

Die Ergebnisse zeigen in der Abb. 4 dass die Hemmung der PI3-Kinase, der NO-Synthase oder der PKG jeweils die Insulinvermittelte Beschleunigung der zytosolischen Ca²⁺-Erholung (Fura-2-Ratio, relative Einheiten) aufhebt.

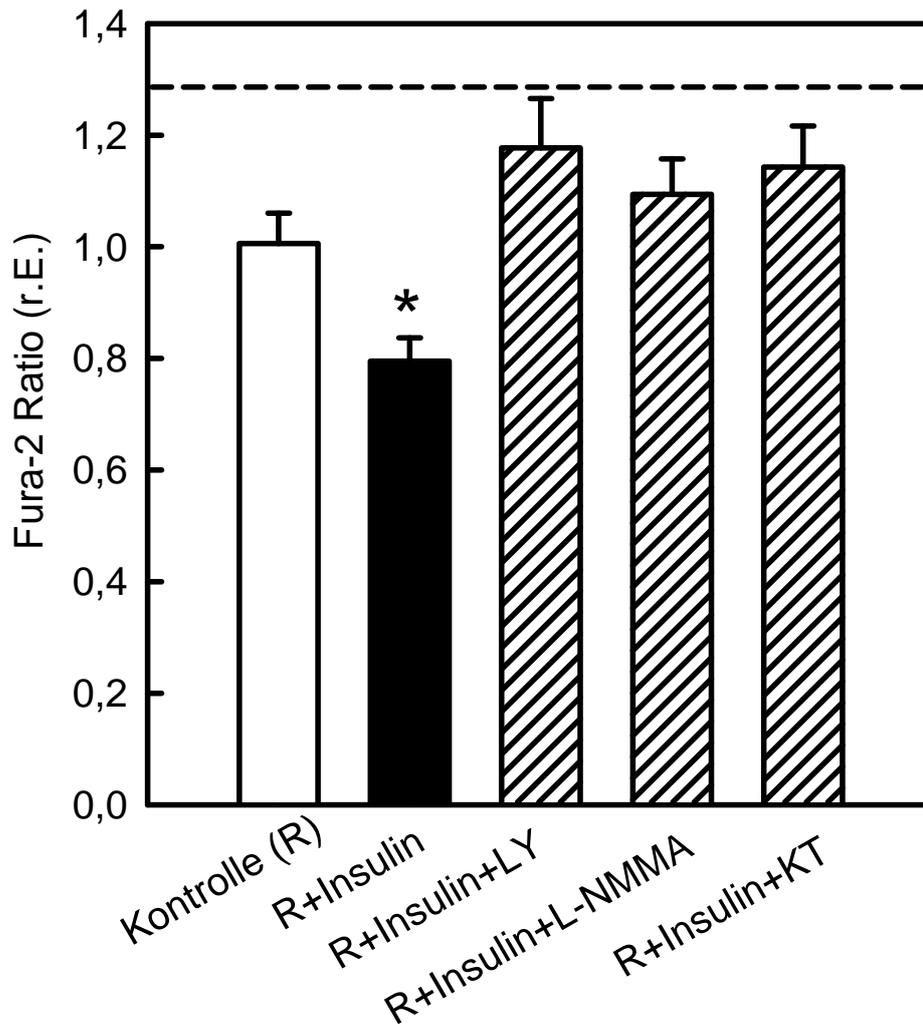


Abb. 4:

Zytosolische Ca^{2+} -Konzentration (Fura-2-Ratio) nach 2 Minuten Reperfusion unter Kontrollbedingungen (R), in Gegenwart von Insulin (10 mU/l), Insulin+LY294002 (1 μM), Insulin+L-NMMA (100 μM), Insulin+KT5823 (1 μM). Die Ergebnisse zeigen, dass durch die Hemmung der PI3-Kinase oder der NO-Synthase oder der PKG die Insulin-vermittelte Beschleunigung der zytosolischen Ca^{2+} -Erholung (Fura-2 Ratio) aufgehoben wird. Die gestrichelte Linie zeigt das endanoxische Fura-2-Ratio. Die Daten sind dargestellt als Mittelwerte \pm SEM ($n = 26$ Zellen für jede Bedingung, * $p < 0,05$ versus alle andere Bedingungen).

4.3.2 Beeinflussung der Zelllänge während der Reperfusion

Die folgende Abbildung (Abb.5) zeigt die Zelllänge nach 15-minütiger Reperfusion unter Kontrollbedingungen, in Gegenwart von Insulin, Insulin+LY294002, Insulin+L-NMMA, Insulin+KT5823.

Insulin führt zu einer deutliche Verminderung der reperfusionsinduzierten Hyperkontraktur und schützt so gegen den Reperfusionsschaden. Dieser Schutz wird in Anwesenheit von LY294002 oder KT5823 oder L-NMMA aufgehoben. Die Ergebnisse zeigen, dass diese Signalwege in der durch Insulin vermittelten Protektion gegen den Reperfusionsschaden involviert sind.

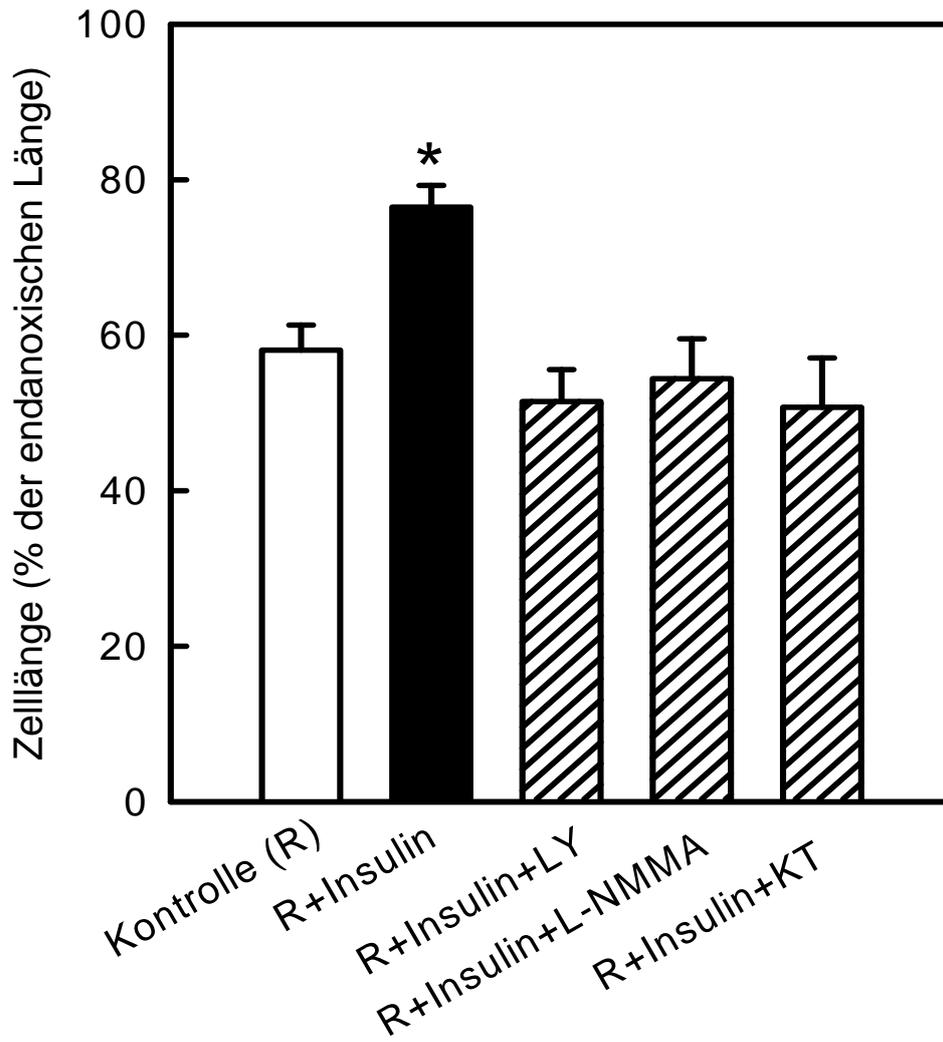


Abb. 5:

Hyperkontraktorentwicklung nach Reperfusion. Zelllänge in Prozent (%) der endotoxischen Zelllänge nach 10-minütiger Reperfusion unter Kontrollbedingungen (R), in Gegenwart von Insulin (10 mU/l), Insulin+LY294002 (1 μ M), Insulin+L-NMMA (100 μ M), Insulin+KT5823 (1 μ M). Die Daten sind dargestellt als Mittelwerte \pm SEM (n = 26 Zellen für jede Bedingung, * p < 0,05 versus alle andere Bedingungen).

4.4 Einfluss von Insulin auf die NO-Synthase

Da die Aktivierung der PI3-Kinase zu einer Aktivierung der NO-Synthase durch Steigerung der Phosphorylierung der NO-Synthase führen kann untersuchten wir mit Hilfe der Immunfluoreszenz die NOS-Phosphorylierung in Anwesenheit von Insulin mit und ohne den PI3-Kinase Hemmer LY294002.

Die Ergebnisse in Abb.6 zeigen, dass der Einsatz von Insulin in der Reperfusion zu einer Steigerung der Phosphorylierung der NO-Synthase während der ersten zwei Minuten der Reperfusion führt. Durch die Blockierung der PI3-Kinase wird der Insulin- vermittelte Effekt auf die eNOS signifikant reduziert. Dies zeigt, dass die eNOS- Phosphorylierung in Anwesenheit von Insulin nachgeschaltet zur PI3-Kinase erfolgt.

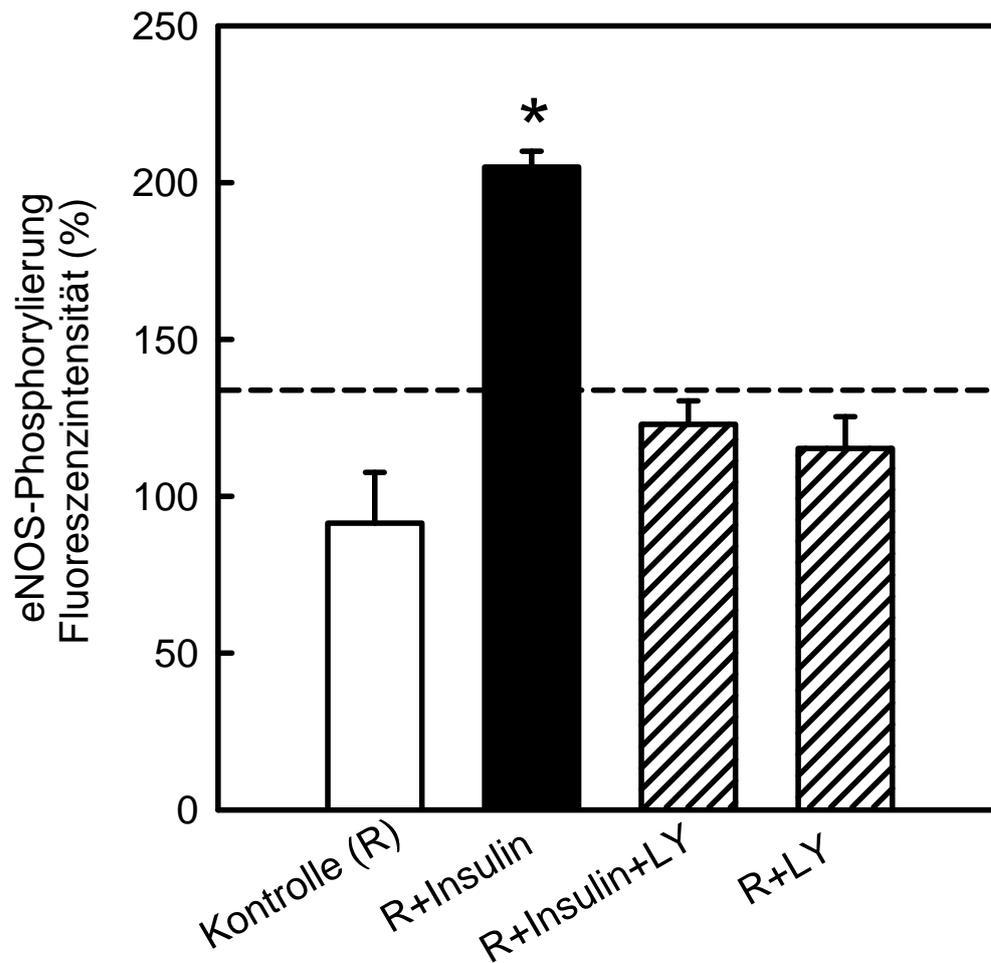


Abb. 6:

Fluoreszenzintensität der phosphorylierten eNOS in Kardiomyozyten 2 Minuten nach Reperfusionbeginn unter Kontrollbedingungen (R), in Gegenwart von Insulin (10 mU/l) oder Insulin+LY294002 (1 μ M) oder LY294002 (1 μ M) allein. Die gestrichelte Linie zeigt den endanoxischen Wert. Die normoxische Werte wurden auf 100% gesetzt. Die Daten sind dargestellt als Mittelwerte \pm SEM (n = 25 Zellen für jede Bedingung, * p < 0,05 versus alle andere Bedingungen).

Mit Hilfe des Fluoreszenzindikators DAF-FM wurde die NO-Produktion während der Reperfusion gemessen. Der Effekt der Zunahme der NO-Produktion bei Anwesenheit der Insulin wurde bei Anwesenheit von L-NMMA oder LY294002 aufgehoben (Abb. 7). Diese Ergebnisse zeigen, dass die PI3-Kinase in der durch Insulin vermittelten Aktivierung der NO-Synthase involviert ist.

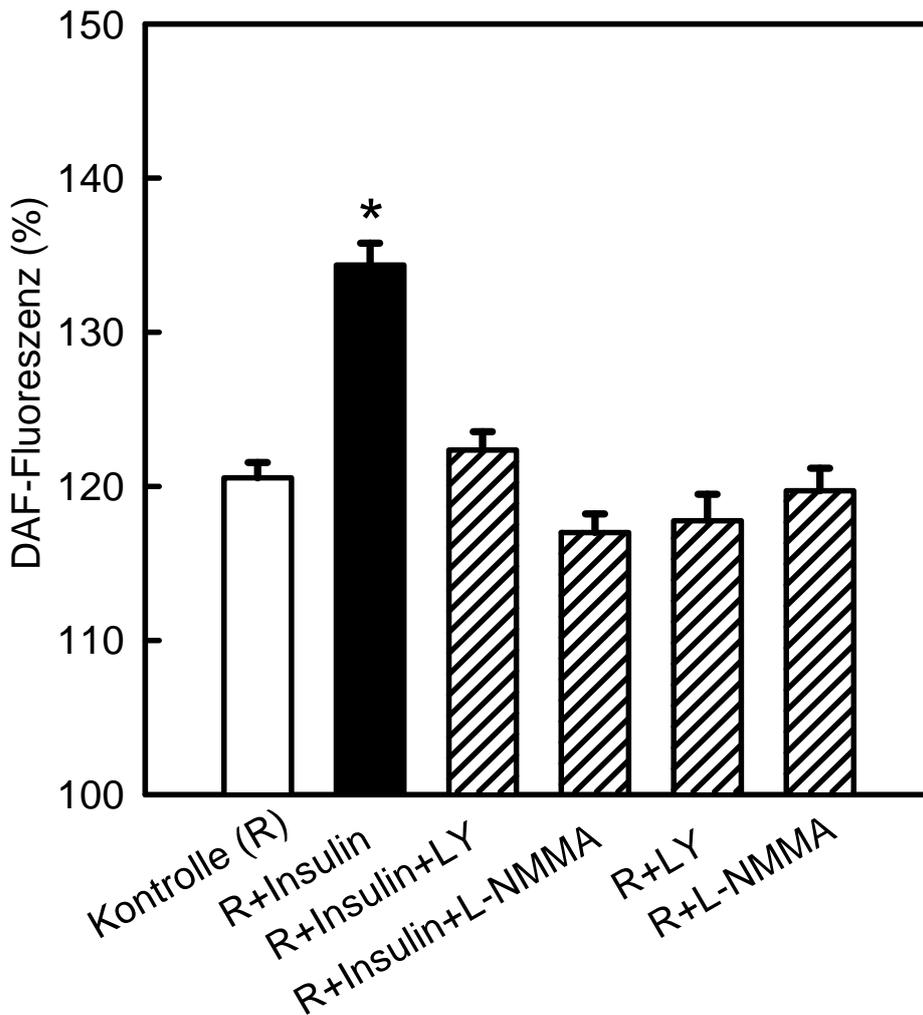


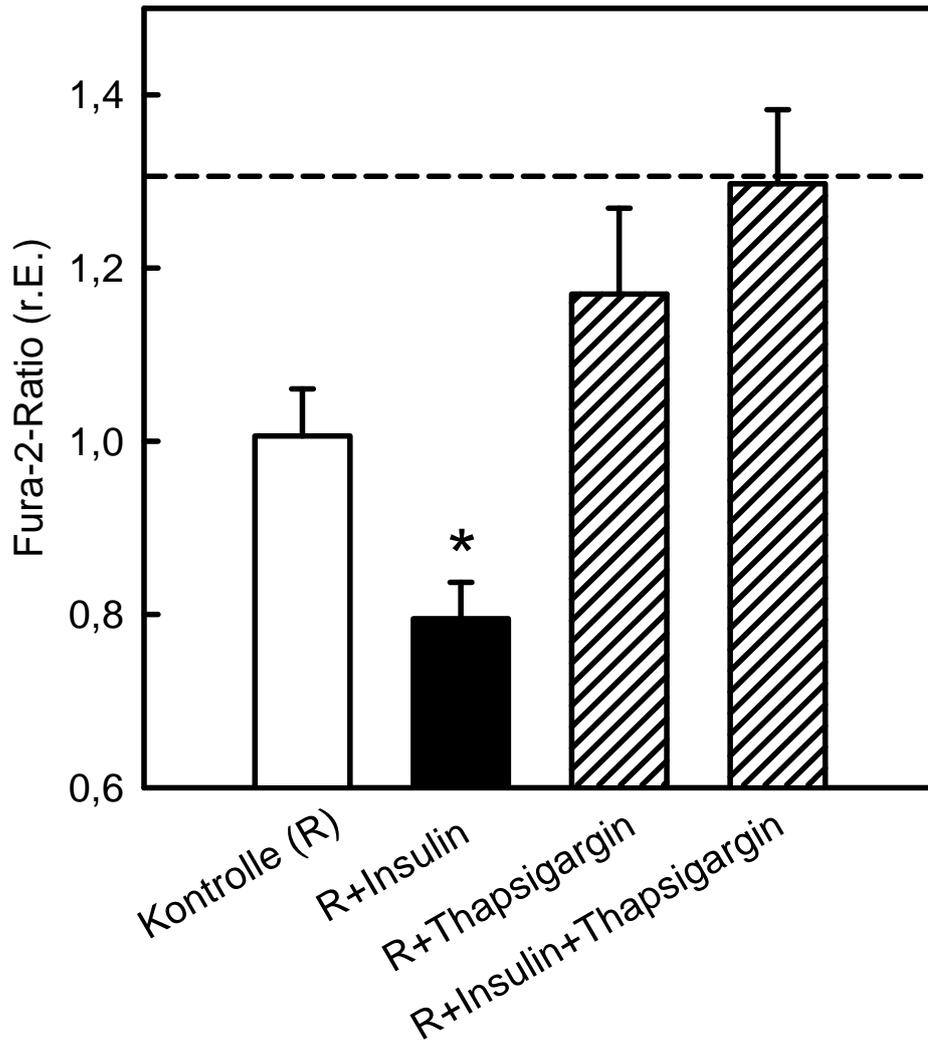
Abb.7:

NO-Produktion während Reperfusion. Zunahme der DAF-Fluoreszenz 2 Minuten nach Reperfusion unter Kontrollbedingungen (R), in Gegenwart von Insulin (10 mU/l), Insulin+LY294002 (1 μ M), Insulin+L-NMMA (100 μ M), LY294002 (1 μ M) oder L-NMMA (100 μ M). Die DAF-Fluoreszenz am Anfang der Reperfusion wurde auf 100 % gesetzt. Die Daten sind dargestellt als Mittelwerte \pm SEM (n = 16 Zellen für jede Bedingung), *p < 0,05 versus alle andere Bedingungen).

4.5 Einfluss von Insulin auf die Funktion des sarkoplasmatischen Retikulums

4.5.1 Die Rolle der SR-Ca²⁺-ATPase (SERCA)

Um zu überprüfen wie die Funktion des sarkoplasmatischen Retikulums in Anwesenheit von Insulin beeinflusst wird und ob es einen Einfluss auf die beschleunigte Ca²⁺ - Erholung hat, wurde durch den Einsatz von Thapsigargin die Rolle der sarkoplasmatischen Ca²⁺-ATPase (SERCA) untersucht. Thapsigargin hemmt selektiv die sarkoplasmatische Ca²⁺-ATPase und somit die Aufnahme des zytosolischen Calciums in das sarkoplasmatische Retikulum. Thapsigargin allein verlangsamt die zytosolische Ca²⁺-Erholung in der Reperfusion im Vergleich zu den Kontrollbedingungen. Wie die Abb. 8 zeigt, hat Insulin in Anwesenheit von Thapsigargin 2 Minuten nach Reperfusion keinen Effekt mehr auf die zytosolische Ca²⁺-Erholung. Diese Ergebnisse zeigen, dass der Insulin-Effekt auf die zytosolische Ca²⁺-Homöostase von einer Wirkung auf die Ca²⁺-Speicher des SR abhängt. In Anwesenheit von Thapsigargin hat Insulin keinen Einfluss auf die zytosolische Ca²⁺ - Homöostase und dies zeigt, dass der Insulin- Effekt abhängig von der Funktion der SERCA ist.

**Abb.8:**

Ca²⁺-Konzentration (Fura-2-Ratio) nach 2 Minuten Reperfusion unter Kontrollbedingungen (R), in Gegenwart von Insulin (10 mU/l), in Gegenwart von Thapsigargin allein (150 nM), in Gegenwart von Insulin und Thapsigargin (150 nM). Die gestrichelte Linie zeigt den endoxisischen Fura-2-Ratio Wert. Die Daten sind dargestellt als Mittelwerte \pm SEM. (n = 30 Zelle für jede Bedingung, * p < 0,05 versus alle andere Bedingungen).

4.5.2 Einfluss von Insulin auf die Phospholambanphosphorylierung

Die Aktivierung der SERCA ist abhängig vom Phosphorylierungsstatus des Phospholambans. In der nichtphosphorylierten Form hemmt Phospholamban die SERCA, durch Phosphorylierung wird die SERCA aktiviert. Die Aktivierung der sarkoplasmatischen Ca^{2+} -ATPase führt zu einer schnelleren Aufnahme des zytosolischen Calciums ins sarkoplasmatische Retikulum.

Um zu überprüfen, ob die Aktivierung der SERCA durch Insulin auf diesen Mechanismus zurückzuführen ist, wurde durch Western-Blott-Analyse der Einfluss von Insulin auf den Phosphorylierungsstatus des Phospholambans untersucht. Die densitometrische Analyse in der Abb. 9 zeigt die Phospholambanphosphorylierung unter Kontrollbedingungen, nach 60 Minuten Anoxie und nach 5 Minuten Reperfusion in Anwesenheit und Abwesenheit von Insulin. Für die Darstellung wurde das Verhältnis zwischen dem phosphorylierten Phospholamban und totalem Phospholamban ermittelt und das Verhältnis unter normoxischen Bedingungen auf „1“ gesetzt. Die Abbildung zeigt keine signifikanten Unterschiede der Phospholamban-Phosphorylierung zwischen Anoxie und Reperfusion und Kontrollbedingungen. Der Einsatz von Insulin in der Reperfusion induzierte eine Zunahme der Phospholambanphosphorylierung. Diese Insulinvermittelte Phosphorylierungssteigerung konnte durch LY294002 oder KT5283 oder L-NMMA verhindert werden.

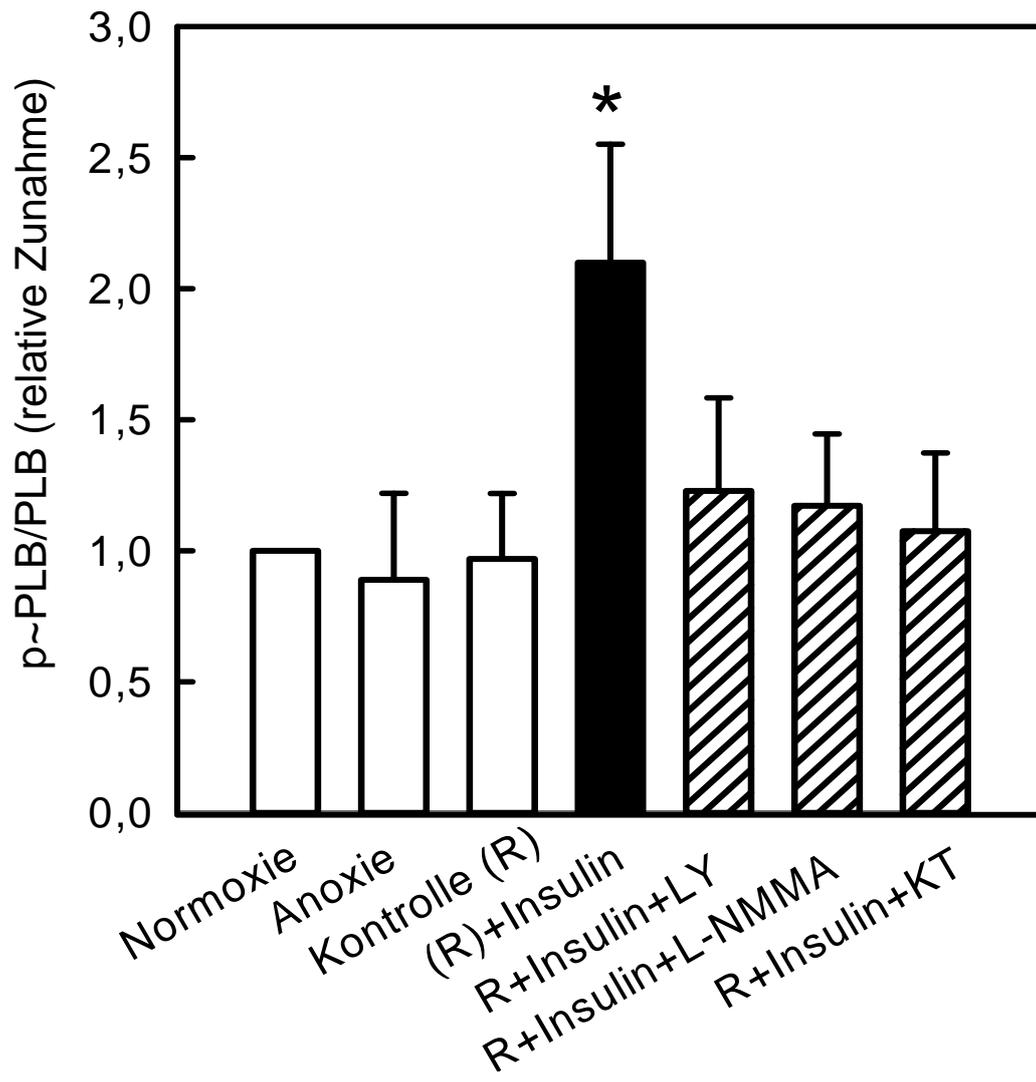
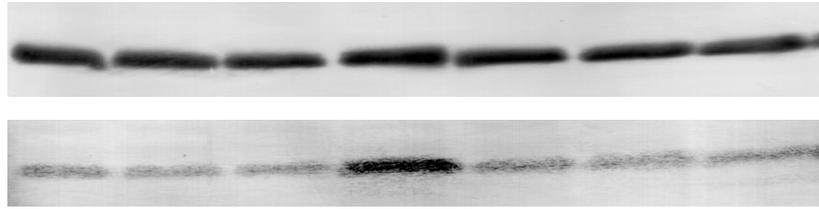


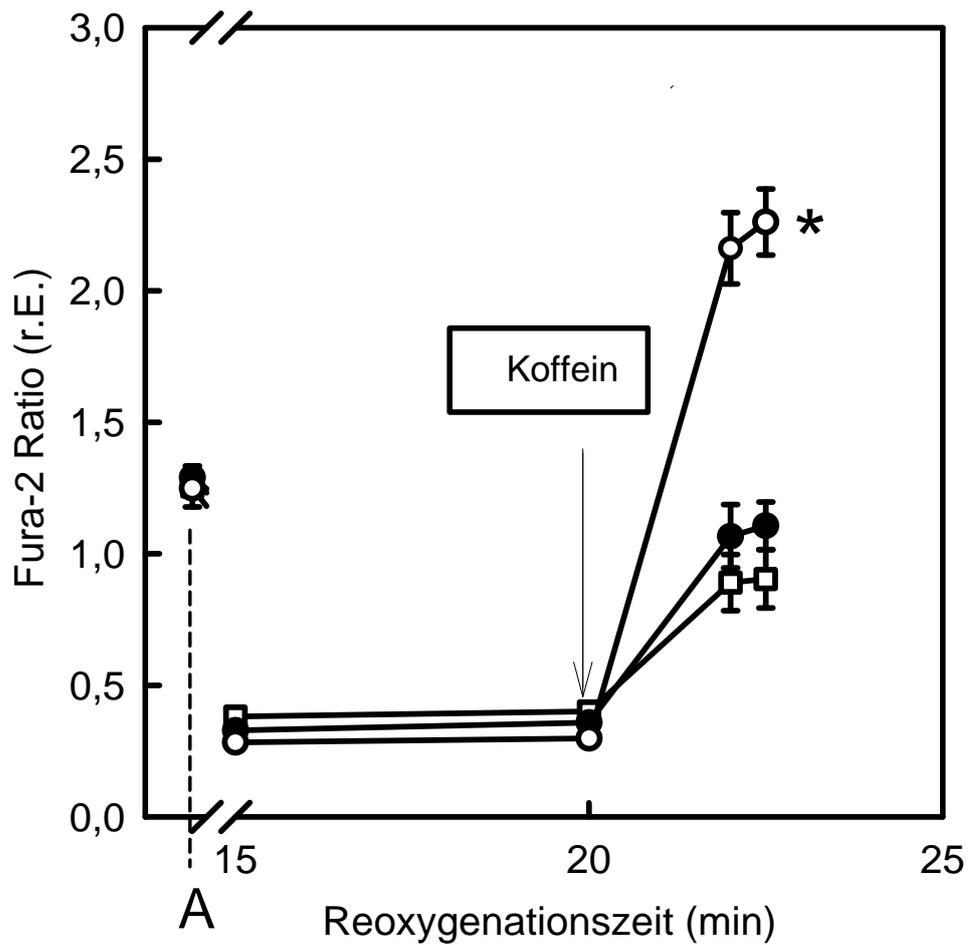
Abb. 9:

Oben: Repräsentative Western-Blot-Analyse des totalen (oben) und phosphorylierten Phospholambans (unten) unter Normoxie, nach 60 min Anoxie und nach 5 min Reperfusion unter Kontrollbedingungen (R), in Gegenwart von Insulin (10 mU/l), Insulin+LY294002 (1 μ M), Insulin+L-NMMA (100 μ M) oder Insulin+KT5823 (1 μ M).

Unten: Densitometrische Analyse des Western-Blots nach Bildung des Verhältnisses zwischen dem phosphorylierten Phospholamban und dem totalen Phospholamban (p~PLB/PLB). Das Verhältnis zwischen dem phosphorylierten Phospholamban und dem totalen Phospholamban (p~PLB/PLB) unter Normoxie wurde auf „1“ gesetzt. Daten sind dargestellt als Mittelwerte \pm SEM (n = 4 Experimente pro Bedingung * p < 0.05 versus alle andere Bedingungen).

4.5.3 Bestimmung des sarkoplasmatischen Ca^{2+} -Gehaltes durch Koffein-induzierte Ca^{2+} - Freisetzung

Da die zuvor beschriebenen Ergebnisse darauf hinweisen, das Insulin in der Reperfusion die Ca^{2+} -Aufnahme in das SR steigert, wurde die Frage untersucht, ob unter Insulin-Behandlung auch die Speicherung von Ca^{2+} ins SR zunimmt. Hierfür wurde ein Koffein- Assay angewandt. Koffein aktiviert die Ryanodin-Rezeptoren des SR und führt zu einer kompletten Entleerung von Ca^{2+} aus dem sarkoplasmatischen Retikulum in das Zytosol (Lukyanenko et al. 2001). Daher kann das Ausmaß der Koffein-induzierten Ca^{2+} -Freisetzung als Maß für die Speicherkapazität des sarkoplasmatischen Retikulums verwendet werden. Wie in der Abb. 10 gezeigt ist, ist die Ca^{2+} -Freisetzung nach Koffein-Gabe bei den mit Insulin behandelten Zellen auf das Doppelte gesteigert. Die Hemmung der PKG mit KT5823 hebt diesen Effekt auf. Diese Ergebnisse belegen, dass die Insulin-vermittelte, beschleunigte Ca^{2+} -Erholung auf eine gesteigerte Ca^{2+} -Sequestrierung ins sarkoplasmatische Retikulum zurückzuführen ist. Diesem Effekt liegt eine PKG-abhängige SERCA-Aktivierung zugrunde.



● Kontrolle O Insulin □ Insulin+KT5823

Abb. 10:

Verlauf des Fura-2 Ratios nach dem Einsatz von Koffein (20 Minuten nach Reperfusionbeginn) unter Kontrollbedingungen (●), in Anwesenheit von Insulin (O) und in Anwesenheit von Insulin+KT5823 (□). Die gestrichelte Linie zeigt den endoxianischen Fura-2-Ratio Wert (A). Daten sind dargestellt als Mittelwerte \pm SEM (n = 22 Zellen für jede Bedingung; * p < 0.05 versus Kontrolle und Insulin+KT5823).

5. DISKUSSION

Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen ob Insulin isolierte Herzmuskelzellen während der Reperfusion gegen die reperfusionsinduzierte Hyperkontraktur schützen kann und ob diese Protektionswirkung auf eine Beeinflussung der Ca^{2+} -Homöostase zurückgeführt werden kann. Weiterhin sollte geklärt werden, über welche Signalwege diese Protektion vermittelt wird. Unsere Experimente zeigen, dass die Gabe von Insulin während der Reperfusion Herzmuskelzellen vor der Hyperkontraktorentwicklung schützt. Dieser Schutz ist auf eine beschleunigte Erholung der zytosolischen Ca^{2+} -Überladung zurückzuführen. Durch diese Insulin-Wirkung wird einer der Auslöser für die Hyperkontraktur beseitigt. Dieser Effekt von Insulin wurde in Gegenwart von Inhibitoren der PI-3-Kinase (PI3K), NO-Synthase (eNOS) oder der Proteinkinase G (PKG) aufgehoben. Dies belegt, dass die Protektionswirkung auf einem PI3K/eNOS/PKG-vermittelten Signalweg beruht.

Der Einsatz von Insulin in der Frühphase der Reperfusion führt zu einer beschleunigten Normalisierung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration. Da in dieser Phase der Reperfusion das sarkoplasmatische Retikulum als intrazelluläres Ca^{2+} -Speicherorgan überschüssiges Ca^{2+} durch Aktivierung der sarkoplasmatischen Ca^{2+} -ATPase (SERCA) aufnehmen kann und deshalb initial die wichtigste Rolle bei der zytosolischen Ca^{2+} -Erholung spielt, untersuchten wir, ob die Funktion des sarkoplasmatischen Retikulums in reperfundierten Kardiomyozyten in Gegenwart von Insulin verändert ist.

Um die Funktion des sarkoplasmatischen Retikulums als intrazelluläres Speicherorgan zu untersuchen, wurde die Aufnahme des zytosolischen Calciums in das sarkoplasmatische Retikulum durch Thapsigargin gehemmt. Thapsigargin ist ein Hemmstoff der SERCA und verhindert so die Rückspeicherung des zytosolischen Calciums in das sarkoplasmatische Retikulum (Lytton et al. 1991). Die Ergebnisse zeigen, dass die durch Insulin beschleunigte Ca^{2+} -Erholung aufgehoben wird, wenn die SERCA gehemmt wird. Dieser Befund deutet darauf hin, dass der Effekt von Insulin auf die Ca^{2+} -Erholung auf eine Beeinflussung der SERCA zurückzuführen ist.

Als nächstes wurde untersucht ob Insulin die SERCA-Aktivität beeinflusst. Hierzu wurde die Phospholamban-Phosphorylierung bestimmt da die Aktivierung der

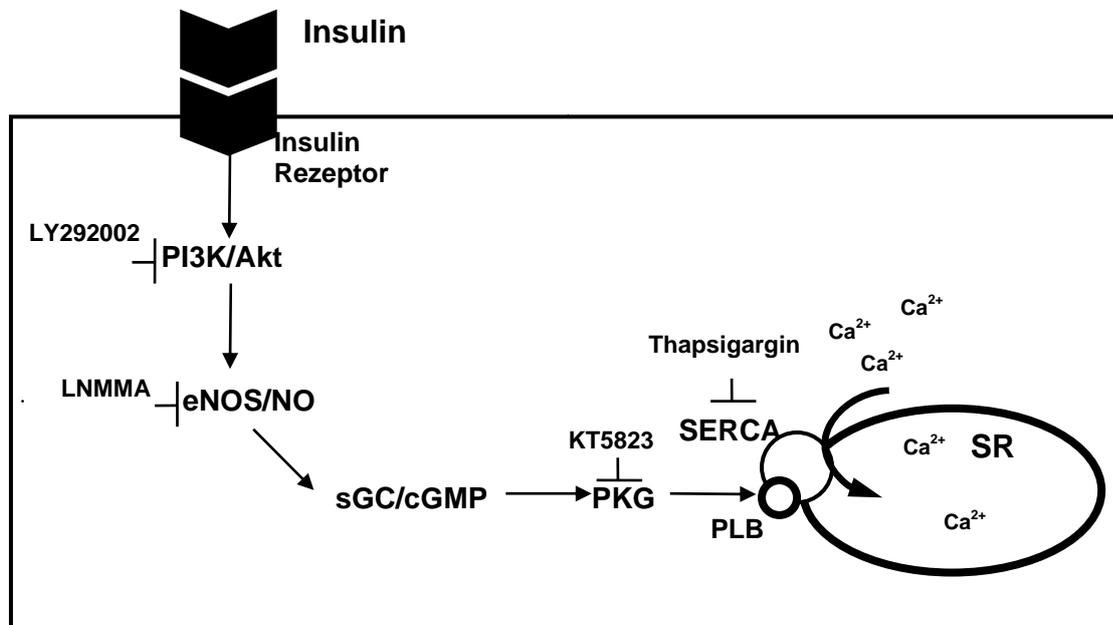
SERCA von dem Phosphorylierungsstatus des Phospholambans abhängt. In der nichtphosphorylierten Form hemmt Phospholamban die SERCA, eine Phosphorylierung des Phospholambans führt zur Aktivierung der SERCA (Simmerman et al. 1998). Es zeigte sich, dass unter Insulin die Phosphorylierung von Phospholamban zunimmt. Dieses Ergebnis deutet auf eine Aktivierung der SERCA verbunden mit einer gesteigerten Ca^{2+} -Aufnahme ins sarkoplasmatischen Retikulum in Anwesenheit von Insulin hin (Abdallah et al. 2005; Sabine et al. 1995).

Um zu überprüfen, ob die gesteigerte Phospholamban-Phosphorylierung unter Insulin-Applikation tatsächlich zu einer erhöhten Ca^{2+} -Rückspeicherung ins sarkoplasmatische Retikulum führt, wurde am Ende der Reperfusion der Speicherstatus des sarkoplasmatischen Retikulums durch Applikation von Koffein bestimmt. Koffein öffnet die Ryanodin-Kanäle des SR's und bewirkt dadurch eine maximale Ca^{2+} -Entleerung aus dem SR in das Zytosol (Lukyanenko et al. 2001). Bei den mit Insulin behandelten Zellen war die nach Koffein-Gabe freigesetzte Ca^{2+} -Menge deutlich gesteigert. Dieser Befund zeigt in Verbindung mit den Thapsigargin-Experimenten und der Bestimmung der Phospholamban-Phosphorylierung, dass der Einsatz von Insulin während der Reperfusion zu einer gesteigerten Ca^{2+} -Sequestrierung ins SR führt, die auf eine gesteigerte SERCA-Aktivität zurückzuführen ist.

Im Modell isoliert reperfundierter Herzen konnte gezeigt werden, dass Insulin die PI3-Kinase, Akt-Kinase und NO-Synthase aktivieren kann (Gao et al. 2002; Sack et al. 2003; Hausenloy et al. 2007). In der vorliegenden Arbeit wurde überprüft, ob dieser Signalweg die Protektionswirkung auf Ebene der Herzmuskelzellen vermittelt. Es wurde zunächst gezeigt, dass die Effekte von Insulin auf die zytosolische Ca^{2+} -Erholung und die Hyperkontraktur in Anwesenheit von Hemmstoffen der PI3-Kinase (LY294002) und NO-Synthase (L-NMMA) aufgehoben werden können. Außerdem wurde gezeigt, dass Insulin zu einer Steigerung der eNOS-Phosphorylierung und zu einer Steigerung der Aktivität der NO-Synthase führt und dass dies durch eine Hemmung der PI3-Kinase verhindert werden kann. Die Ergebnisse zeigen, dass der Insulin-vermittelte Signalweg beginnend mit der Aktivierung der PI3-Kinase und nachfolgend der NO-Synthase für den protektiven Effekt essentiell ist.

Eine Steigerung der NO-Synthase Aktivität führt zu einer NO-vermittelten Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase und zu einem Anstieg des zellulären cGMP-Spiegels und konsekutiv zu einer Aktivierung der Proteinkinase G (PKG) (Brusq et al. 1999). Brusq und Mitarbeiter zeigten, dass eine Aktivierung der PKG eine Phosphorylierung des SERCA-modulierenden Proteins Phospholamban bewirken kann. In reperfundierten Kardiomyozyten konnten wir zeigen, dass der cGMP-vermittelte Signalweg, der durch ANP-Rezeptor-Agonisten oder zell-permeable PKG-Aktivatoren aktiviert werden kann, zu einer Steigerung der Phospholamban-Phosphorylierung führt (Abdallah et al. 2005).

Um zu untersuchen ob PKG als Downstream Kinase der eNOS in unserem Schädigungsmodell eine entscheidende Rolle spielt und die schnellere sarkoplasmatische Ca^{2+} -Aufnahme und die beschleunigte zytosolische Ca^{2+} -Erholung vermittelt, wurde die PKG durch KT5823 gehemmt. Die Daten zeigen, dass die protektiven Effekte von Insulin in Anwesenheit des PKG-Inhibitors aufgehoben sind. Die Aktivierung der PKG durch Insulin stellt daher die zweite Hälfte des Insulin-vermittelten Signalwegs dar, über den Insulin reperfundierte Herzmuskelzellen schützt. Im folgenden Schema sind die wesentlichen Ergebnisse dieser Arbeit dargestellt:



Schema der zellulären Signalkaskade der Insulin-vermittelten Protektion gegen den myokardialen Reperfusionsschaden:

PI-3K/AKT, PI-3 Kinase/ AKT Kinase; eNOS, endotheliale NO Synthase, sGC, lösliche Guanylatzyklase; cGMP, zyklisches Guanosin-Monophosphat; PKG, Proteinkinase G; SERCA, Ca²⁺ Pumpe des sarkoplasmatischen Retikulums; PLB, Phospholamban; SR, sarkoplasmatisches Retikulum, LY 294002; PI3K-Inhibitor, LNMMA; NO Synthase-Inhibitor, KT5823; PKG-Inhibitor, Thapsigargin; SERCA-Inhibitor.

- i) Insulin aktiviert die NO-Synthase über den PI3K/Akt-Kinase-Signalweg.
- ii) Die Aktivierung der NO-Synthase führt zu einer Aktivierung der PKG, die wiederum eine Steigerung der Phospholamban-Phosphorylierung herbeiführt und so die SERCA aktiviert.
- iii) Durch eine gesteigerte SERCA- Aktivität kann das sarkoplasmatische Retikulum eine größere Menge von zytosolischem Ca²⁺ sequestrieren.
- iv) Eine gesteigerte Ca²⁺-Sequestrierung ins sarkoplasmatische Retikulum führt zu einer beschleunigten Ca²⁺-Erholung in der Frühphase der Reoxygenation. Durch Verminderung der zytosolischen Ca²⁺-Überladung wird die Zelle vor der reperfusioninduzierten Hyperkontraktur geschützt.

Insgesamt wurde so der Signalweg aufgeklärt, über den die Protektion von reoxygenierten Kardiomyozyten gegen Hyperkontraktur durch die Applikation von Insulin vermittelt wird.

Es wurde bereits in mehreren experimentellen und klinischen Studien im Rahmen eines Ischämie-Reperfusionsgeschehens gezeigt, dass die Gabe von Insulin protektiv wirkt.

Die experimentellen Studien zeigten, dass der Einsatz von Glukose-Insulin-Kalium am isoliert reperfundierten Herzen zu einer besseren Erholung der kontraktile Funktion und des Energiestatus` der Kardiomyozyten führt (Angelos et al. 2002). Weitere Studien zeigten, dass Insulin am isolierten Herzen während der Frühphase der Reperfusion zu einer Reduktion der Infarktgröße und zu einer Verminderung des Zelltods führt (Jonassen et al. 2000) und dass dieser myokardprotektive Effekt glucoseunabhängig ist (Jonassen et al. 2001). Als Signalweg wurde eine Insulin-vermittelte Aktivierung der PI3- Kinase und der Akt-Kinase mit anschließender eNOs-Aktivierung identifiziert (Gao et al. 2002).

Die klinischen Studien zeigten, dass bei der Behandlung von Patienten mit myokardialem Infarkt der Einsatz von Glukose-Insulin-Kalium während der

Reperfusion zu einer Reduktion der „in-hospital-mortality“ führt (Sodi – Pallares et al. 1962; Apstein et al. 1998; Diaz et al. 1998). Weitere positive Ergebnisse bezüglich Infarktgröße, Pumpfunktion und Mortalität wurden nach einer Insulingabe während der Angioplastie bei einer Subgruppe von Patienten ohne Zeichen einer Herzinsuffizienz gezeigt (van der Horst et al. 2003). In einer anderen Studie führte Insulingabe unter gleichzeitiger thrombolytischer Therapie nach einem Monat zu einer Reduktion des Auftretens von Herztod, Reinfarkt und Arrhythmien und nach einem Jahr zu einer signifikanten Verbesserung der linksventrikulären Herzfunktion (Krljanac et al. 2005). In einer anderen großen Studie führte die Behandlung von Patienten nach myokardialen Infarkt mit Glukose-Insulin-Kalium für 24 Stunden allerdings zu keinem Unterschied bezüglich Mortalität, kardialer Erholung und der Häufigkeit von kardiogenem Schock und Reinfarkt im Vergleich zur Kontrollgruppe (Mehta et al. 2005). Ein Parameter der möglicherweise zu diesem Ausgang der Studie führte, könnte der unterschiedliche Applikationszeitpunkt der Insulingabe nach Beginn der Ischämie sein, so wurde beispielsweise bei den meisten Patienten dieser Studie Insulin erst nach der Reperfusion gegeben (Apstein 2005). In unseren Experimenten wurde gezeigt, dass eine Insulin-Applikation in der Frühphase der Reoxygenation die Herzmuskelzellen vor dem Reperfusionsschaden schützt, so, dass eine verspätete Gabe unter Umständen wirkungslos bleibt wenn das Myokard bereits irreversibel geschädigt ist.

Die frühe Phase der Reperfusion nach einer Myokardischämie ist ein klinisch wichtiges therapeutisches Fenster für neue Therapieansätze gegen den Herzinfarkt (Piper et al. 2008; Rodríguez-Sinovas et al. 2007). Im Rahmen unserer Studie wurde gezeigt, dass die PKG die Ziel-Kinase des Insulinvermittelten myokardprotektiven Signalweges ist und das sarkoplasmatische Retikulum als Ziel-Organell hat. Die Analyse dieses Signalweges bietet neue Möglichkeiten zur Myokardprotektion. Von besonderer Bedeutung ist die Identifizierung der Proteinkinase G in diesem Signalweg. Eine Aktivierung dieser Kinase kann auch durch ANP-Rezeptor-Agonisten erfolgen. An Patienten mit akutem Myokardinfarkt und primärer Angioplastie konnten durch Agonisten der partikulären Guanylylzyklase (pGC) protektive Effekte bezüglich der Funktion des linken Ventrikels und des Auftretens von reperfusionsassoziierten Komplikationen, wie z.B. Herzrhythmusstörungen oder persistierende ST-Hebungen erzielt werden (Kuga et al. 2003). Kitakaze et al.

Zeigten 2007, dass die intravenöse Therapie mit ANP bei Patienten mit Myokardinfarkt und stattgehabter Reperfusionstherapie zu einer Erhöhung der Ejektionsfraktion und zu einer Reduktion von Infarktgröße und Inzidenz des plötzlichen Herztodes führt.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Hintergrund und Ziele:

Experimentelle und klinische Studien haben gezeigt, dass die Applikation von Insulin während der Reperfusion zuvor ischämischen Myokards protektiv wirkt, aber die zugrunde liegenden Mechanismen sind noch unbekannt. In dieser Studie untersuchten wir in isolierten Kardiomyozyten adulter Ratten, die einer simulierten Ischämie (Hypoxie) und Reperfusion (Reoxygenation) unterzogen wurden, ob die Gabe von Insulin während der Reperfusion gegen die Entwicklung von Hyperkontraktur schützen kann. Die Hyperkontraktur von Kardiomyozyten charakterisiert den frühen Reperfusionsschaden auf zelluläre Ebene und ist für die Entstehung der Gewebnekrose verantwortlich. Die Effekte von Insulin auf die protektiven Kinasen, d. h. PI3-Kinase und cGMP-abhängige Proteinkinase G (PKG), und auf die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration in reoxygenierten Kardiomyozyten wurden untersucht.

Ergebnisse:

Die Applikation von Insulin (10 mU/L) während der Reoxygenation schützte die Kardiomyozyten gegen die Hyperkontraktorentwicklung. Die zytosolische Ca^{2+} -Erholung in den ersten Minuten der Reperfusion wurde in Anwesenheit von Insulin beschleunigt. Die protektiven Effekte von Insulin auf die zytosolische Ca^{2+} -Erholung und auf die Hyperkontraktorentwicklung wurden in Gegenwart von Hemmstoffen der PI3-Kinase (LY294002, 1 μM), der eNOS (L-NMMA, 100 μM), der PKG (KT 5823, 1 μM) oder der SERCA (Thapsigargin, 150 nM) aufgehoben.

Insulin führte zur verstärkten Phosphorylierung von eNOS und Phospholamban und erhöht die Speicherkapazität des sarkoplasmatischen Retikulums in reoxygenierten Kardiomyozyten.

Schlussfolgerung:

Insulin schützt Kardiomyozyten gegen die reperfusionsinduzierte Hyperkontraktur durch eine beschleunigte Erholung der zytosolischen Calciumüberladung in der frühen Reperfusionsphase. Die beschleunigte Erholung des zytosolischen Calciums ist auf erhöhte Calciumsequestrierung in das sarkoplasmatische Retikulum durch Aktivierung der SERCA zurückzuführen. Diesem Schutzmechanismus liegt eine Aktivierung des protektiven Signalweges PI3-Kinase/eNOS und PKG zugrunde.

7. SUMMARY

Objectives:

Experimental and clinical studies have shown that administration of insulin during reperfusion is cardioprotective, but the underlying mechanisms are still unknown. In this study, we investigated in isolated rat cardiomyocytes subjected to simulated ischemia (hypoxia) and reperfusion (reoxygenation) whether administration of insulin during reoxygenation reduces reoxygenation-induced hypercontracture, a hallmark of acute reperfusion injury. The effects of insulin on potential pro-survival kinases, i.e., PI 3-kinase, NO synthase (eNOS), and cGMP-dependent protein kinase (PKG), and on cytosolic Ca^{2+} -control in reoxygenated cardiomyocytes were investigated.

Results:

Administration of insulin (10mU/L) during reoxygenation protected cardiomyocytes against hypercontracture development. Cytosolic Ca^{2+} -recovery during the first 2 minutes of reoxygenation was accelerated. The beneficial effects of insulin on cytosolic Ca^{2+} -recovery and hypercontracture were suppressed in the presence of inhibitors of PI 3-kinase (LY294002, 1 μM), eNOS (L-NMMA, 100 μM), PKG (KT 5823, 1 μM), or sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA) (thapsigargin, 150 nM). Insulin increased phosphorylation and activity of eNOS and augmented phospholamban phosphorylation in reoxygenated cardiomyocytes. Correlated with phospholamban phosphorylation, insulin also augmented SR Ca^{2+} -load.

Conclusions:

Insulin protects cardiomyocytes against reoxygenation-induced hypercontracture. This is due to acceleration of cytosolic Ca^{2+} -recovery by enhanced Ca^{2+} -sequestration into the sarcoplasmic reticulum via SERCA activation. This protective mechanism is activated through the survival pathway consisting of PI3-kinase, eNOS, and PKG.

8. LITERATUR

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

Mechanism of cGMP-mediated protection in a cellular model of myocardial reperfusion injury. *Cardiovasc Res.*; 66:123-131.

Allshire A, Piper HM, Cuthbertson KSR, Cobbold PH (1987).

Cytosolic free calcium in single rat heart cells during anoxia and reoxygenation. *Biochem J*; 244: 381-385.

Angelos MG, Murray HN, Gorsline RT, Klawitter PF (2002).

Glucose, insulin and potassium (GIK) during reperfusion mediates improved myocardial bioenergetics Resuscitation. *Dec*; 55(3):329-36.

Apstein CS (1998).

Glucose-insulin-potassium for acute myocardial infarction: remarkable results from a new prospective, randomized trial. *Circulation*; 21:2223-2226.

Apstein CS, Opie LH (2005).

A challenge to the metabolic approach to myocardial ischaemia. *Eur Heart J*. 2005 May;26(10):956-9. Epub Mar 29.

Barrabes JA, Garcia-Dorado D, Ruiz-Meana M, Piper HM, Solares J, Gonzales MA, Oliveras J, Pilar Herrejon M, Soler Soler J (1996).

Myocardial segment shrinkage during coronary reperfusion in situ. Relation to hypercontracture and myocardial necrosis. *Pflugers Arch*. 431:519-526.

Bell RM, Yellon DM (2003).

Bradykinin limits infarction when administered as an adjunct to reperfusion in mouse heart: the role of PI3K, Akt and eNOS. *J Mol Cell Cardiol*. Feb;35(2):185-93.

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

Effect of C-type natriuretic peptide on rat cardiac contractility. *Br J Pharmacol*; 128 (1): 206-212.

Cordeiro JM, Howlett SE, Ferrier GR (1994).

Simulated ischaemia and reperfusion in isolated guinea pig ventricular myocytes. *Cardiovasc Res*; 28: 1794-802.

Dennis SC, Gevers W, Opie LH (1991).

Protons in ischemia: Where do they come from; where do they go to?. *J Mol Cell Cardiol*; 23: 1077-1086.

Diaz R, Paolasso EA, Piegas LS, Tajer CD, Moreno MG, Corvalan R, Isea JE, Romero G (1998).

Metabolic modulation of acute myocardial infarction. *Circulation*. 2221:2227-34.

Fabiato A, Fabiato F (1978).

Effects of pH on the myofilaments and the sarcoplasmic reticulum of skinned cells from cardiac and skeletal muscle. *J Physiol*; 276: 233-255.

Ganote CE (1983).

Contraction bands necrosis and irreversible myocardial injury. *J Mol Cell Cardiol*. 15:67-73.

Gao F, Gao E, Yue TL, Ohlstein EH, Lopez BL, Christopher TA, Ma XL (2002).

Nitric oxide mediates the antiapoptotic effect of insulin in myocardial ischemia-reperfusion: the roles of PI3-kinase, Akt, and endothelial nitric oxide synthase phosphorylation. *Circulation*. 105:1497-1502.

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

Selective inhibition of the contractile apparatus: a new approach to modification of infarct size, infarct composition, and infarct geometry during coronary artery occlusion and reperfusion. *Circulation*. 85:1160-1174.

Garcia-Dorado D.

Myocardial reperfusion injury: a new view. *Cardiovasc Res* (Feb 15 2004) 61:363–364.

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

A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem*; 260:3440-3450.

Haigney MC, Miyata H, Lakatta EG, Stern MD, Silverman HS (1992).

Dependence of hypoxic cellular calcium loading on Na^+ - Ca^{2+} exchange *Circ Res*; 71: 547-557.

Harrison SM, Frampton E, Mc Call E., Boyett MR, Orchard CH (1992).

Contraction and intracellular Ca^{2+} , Na^+ and H^+ during acidosis in rat ventricular myocytes. *Am J Physiol*; 262: C348-357.

Hausenloy DJ, Yellon DM (2004).

New directions for protecting the heart against ischaemia-reperfusion injury: targeting the Reperfusion Injury Salvage Kinase (RISK)-pathway.

Cardiovasc Res. Feb 15; 61(3):448-60. Review.

Hausenloy DJ, Tsang A, Yellon DM (2005).

The reperfusion injury salvage kinase pathway: a common target for both ischemic preconditioning and postconditioning. *Trends Cardiovasc Med*; 15: 69-75.

Hausenloy DJ, Yellon DM (2007).

Reperfusion injury salvage kinase signalling: taking a RISK for cardioprotection. *Heart Fail Rev*. Dec; 12(3-4):217-34. Review.

Hempel A, Friedrich M, Schlüter KD, Forssmann WG, Kuhn M, Piper HM (1997).

ANP protects against reoxygenation-induced hypercontracture in adult cardiomyocytes. *Am J Physiol* 273:H244-H249.

Jonassen A.K., Aasum E., Riemersma R.A., Mjos O.D., Larsen T.S. (2000).
Glucose–insulin–potassium reduces infarct size when administered during
reperfusion. *Cardiovasc. Drugs Ther.* 14(6):615–623.

Jonassen A.K., Brar B.K., Mjos O.D., Sack M.N., Latchman D.S., Yellon D.M. (2000).
Insulin administered at reoxygenation exerts a cardioprotective effect in myocytes by
a possible anti-apoptotic mechanism. *J Mol Cell Cardiol* 32:757–764.

Jonassen A.K., Sack M.N., Mjos O.D., Yellon D.M. (2001).
Myocardial protection by insulin at reperfusion requires early administration and is
mediated via Akt and p70s6 kinase cell-survival signaling. *Circ Res* 89:1191–1198.

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

Kitakaze M, Asakura M, Kim J et al. (2007).
Human atrial natriuretic peptide and nicorandil as adjuncts to reperfusion treatment
for acute myocardial infarction (J-WIND): Two randomised trials. (2007) *Lancet*
370(9597):1483-1492.

Krljanac G, Vasiljević Z, Radovanović M, Stanković G, Milić N, Stefanović B, Kostić J,
Mitrović P, Radovanović N, Dragović M, Marinković J, Karadžić A (2005).
Effects of glucose-insulin-potassium infusion on ST-elevation myocardial infarction in
patients treated with thrombolytic therapy. *Am J Cardiol.* Oct 15;96(8):1053-8. Epub
2005 Aug 24.

Kuga H, Ogawa K, Oida A et al. (2003).
Administration of atrial natriuretic peptide attenuates reperfusion phenomena and
preserves left ventricular regional wall motion after direct coronary angioplasty for
acute myocardial infarction. *Circ J* 67:443-448

Ladilov YV, Siegmund B, Piper HM (1995).

Protection of reoxygenated cardiomyocytes against hypercontracture by inhibition of Na^+/H^+ exchange. *Am J Physiol*; 268: H1531-1539.

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

Simulated ischemia increases the susceptibility of rat cardiomyocytes to hypercontracture. *Circ Res*; 80: 69-75.

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

Li Q, Altschuld RA, Stokes BT (1987).

Quantitation of intracellular free calcium in single adult cardiomyocytes by fura-2 fluorescence microscopy: calibration of fura-2 ratios. *Biochem Biophys Res Commun*. 147:120-126.

Lochner A, Harper IS, Salie R, Genade S, Coetzee AR (1994).

Halothane protects the isolated rat myocardium against excessive total intracellular calcium and structural damage during ischemia and reperfusion. *Anesth Analg*; 79: 226-233.

Ludbrook J (1994).

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

Lukyanenko V., Viatchenko-Karpinski S, Smirnov A, Wiesner TF, Györke S (2001).
Dynamic Regulation of Sarcoplasmic Reticulum Ca^{2+} Content and Release by Luminal Ca^{2+} -Sensitive Leak in Rat Ventricular Myocytes. *Biophysical Jour* 81:785-79

Lytton J, Westlin M, Hanley MR (1991).

Thapsigargin inhibits the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum Ca-ATPase family of calcium pumps. *J Biol Chem*. Sep 15;266(26):17067-71.

Mehta S.R., Yusuf S., Diaz R., Zhu J., Pais P., Xavier D., et al. CREATE-ECLA trial group investigators (2005).

Effect of glucose–insulin–potassium infusion on mortality in patients with acute ST-segment elevation myocardial infarction: the CREATE-ECLA randomized controlled trial. *JAMA* 293:437–446.

Orchard , Kentish (1990).

Effects of changes of pH on the contractile function of cardiac muscle. *Am J Physiol*; 258: C967-981.

Owens LM, Fralix TA, Murphy E, Cascio WE, Gettes LS (1996).

Correlation of ischemia-induced extracellular and intracellular ion changes to cell-to-cell electrical uncoupling in isolated blood-perfused rabbit hearts. Experimental Working Group. *Circulation*; 94 (1): 10-13.

Padilla F, García-Dorado D, Agulló L, Barrabés JA, Inserte J, Escalona N, Meyer M, Mirabet M, Pina P, Soler-Soler J. (2001)

Intravenous administration of the natriuretic peptide urodilatin at low doses during coronary reperfusion limits infarct size in anesthetized pigs. *Cardiovasc Res* 51(3):592-600.

Padilla F, García-Dorado D, Agulló L, Inserte J, Paniagua A, Mirabet S, Barrabés JA, Ruiz-Meana M, Soler-Soler J (2000).

L-Arginine administration prevents reperfusion-induced cardiomyocyte hypercontracture and reduces infarct size in the pig. *Cardiovasc Res* 46(3):412-20.

Piper HM, Probst I, Schwartz P, Hütter FJ, Spiekermann PG (1982).

Culturing of calcium stable adult cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol.* 14:397-412.

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

The first minutes of reperfusion: a window of opportunity for cardioprotection. *Cardiovasc Res.* 61:365-3671.

Piper H. M. , Kasseckert S. A, Schlüter K.-D , Abdallah Y. (2008).

Pathophysiology of myocardial reperfusion injury.

Dtsch med Wochenschr 133: 586-590.

Piot C, Croisille P, Staat P, Thibault H, Rioufol G, Mewton N, Elbelghiti R, Cung TT, Bonnefoy E, Angoulvant D, Macia C, Raczka F, Sportouch C, Gahide G, Finet G, André-Fouët X, Revel D, Kirkorian G, Monassier JP, Derumeaux G, Ovize M (2008).

Effect of cyclosporine on reperfusion injury in acute myocardial infarction.

N Engl J Med. Jul 31;359(5):473-81.

Rodríguez-Sinovas A, Abdallah Y, Piper HM, Garcia-Dorado D (2007).

Reperfusion injury as a therapeutic challenge in patients with acute myocardial infarction. Heart Fail Rev. Dec;12(3-4):207-16.

Rupprecht HJ, vom Dahl J, Terres W, Seyfarth KM, Richardt G, Schultheis HP, Buerke M, Sheehan FH, Drexler H. (2000).

Protective effects of the Na⁺/H⁺ exchange inhibitor cariporide in patients with anterior myocardial infarction undergoing direct PTCA. Circulation. 101:2902-2908.

Sabine B, Willenbrock R, Haase H, Karczewski P, Wallukat G, Dietz R, Krause EG (1995).

Cyclic GMP-mediated phospholamban phosphorylation in intact cardiomyocytes. Biochem Biophys Res Commun. 214:75-80.

Sack Michael N., Yellon Derek M., Hon FRCP, FACC

Insulin therapy as an adjunct to reperfusion after acute coronary ischemia

A proposed direct myocardial cell survival effect independent of metabolic modulation. J Am Coll Cardiol, 2003; 41:1404-1407.

Schäfer C, Ladilov YV, Siegmund B, Piper HM (2000).

Importance of bicarbonate transport for protection of cardiomyocytes against reoxygenation injury. Am J Physiol Heart Circ Physiol 278(5):H1457-63.

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

NO donor SIN-1 protects against reoxygenation-induced cardiomyocyte injury by a dual action. Am J Physiol;267:H1461-H1466.

Schlüter KD, Schreiber D (2005).

Adult ventricular cardiomyocytes: isolation and culture. *Methods Mol Biol.*; 290:305-314.

Siegmund B, Koop A, Klietz T, Schwartz P, Piper HM (1990).

Sarcolemmal integrity and metabolic competence of cardiomyocytes under anoxia-reoxygenation. *Am J Physiol*; 258: H285-291.

Siegmund B, Klietz T, Piper HM (1991).

Temporary contractile blockade prevents hypercontracture in anoxic -reoxygenated cardiomyocytes. *Am J Physiol*; 260: H426-435.

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

Recovery of anoxic-reoxygenated cardiomyocytes from severe Ca^{2+} -overload. *Am J Physiol*; 263: H1262-1269.

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

Importance of sodium for recovery of calcium control in reoxygenated cardiomyocytes. *Am J Physiol*; 267: H506-513.

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

Halothane protects cardiomyocytes against reoxygenation-induced hypercontracture. *Circulation*.96:4372-4379.

Simmerman HK, Jones LR (1998).

Phospholamban: Protein structure, mechanism of action, and role in cardiac function. *Physiol Rev*.78:921-947.

Sodi-Pallares D, Testelli M, Fishelder F (1962).

Effects of an intravenous infusion of a potassium-insulin-glucose solution on the electrocardiographic signs of myocardial infarction. *Am J Cardiol*. 9:166–181.

Staat P, Rioufol G, Piot C (2005).

Postconditioning the human heart. *Circulation* 112: 2143-2148.

Theroux P. (2000).

Myocardial cell protection: a challenging time for action and a challenging time for clinical research. *Circulation*. 101:2874-2876.

Tsang A, Hausenloy DJ, Mocanu MM, Yellon DM (2004).

Postconditioning: a form of "modified reperfusion" protects the myocardium by activating the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway. *Circ Res*. 95:230-232.

Thibault H, Piot C, Staat P, Bontemps L, Sportouch C, Rioufol G, Cung TT, Bonnefoy E, Angoulvant D, Aupetit JF, Finet G, André-Fouët X, Macia JC, Raczka F, Rossi R, Itti R, Kirkorian G, Derumeaux G, Ovize M (2008).

Long-term benefit of postconditioning. *Circulation*. Feb 26;117(8):1037-44. Epub Feb 11.

Van der Horst I.C., Zijlstra F., van't Hof A.W., Doggen C.J., de Boer M.J., Suryapranata H. (2003).

Zwolle Infarct Study Group. Glucose–insulin–potassium infusion in patients treated with primary angioplasty for acute myocardial infarction: the glucose–insulin–potassium study: a randomized trial. *J Am Coll Cardiol* 42:784–791.

Zhao ZQ, Corvera JS, Halkos ME, Kerendi F, Wang NP, Guyton RA, Vinten-Johansen J. (2003).

Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning.

Am J Physiol Heart Circ Physiol. Aug;285(2):H579-88. Erratum in: *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004 Jan;286(1):H477.

9. ERKLÄRUNG

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

10. DANKSAGUNG

Herrn Professor Dr. Dr. H. M. Piper danke ich für die Bereitstellung des Themas, für die gute Betreuung

Herrn Dr. Yaser Abdallah und Frau Dr. Claudia Schäfer danke ich für die intensive Unterstützung, die gute Zusammenarbeit, sowie für zahlreiche Anregungen und Hilfestellungen die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herzlicher Dank sage ich alle Mitarbeitern des Institutes und besonders des Calciumlabors für die gute Zusammenarbeit und Hilfestellungen

Von ganzem Herzen danke ich meinem Mann, Dimitri, für die liebevolle Unterstützung, die Motivation und das Verständnis bei allen meinen Entscheidungen

Ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, Maria und Thoma, die mich immer unterstützt und gefördert haben und mir hilfsbereit zur Seite standen.

Recht herzlich möchte ich mich bei Herrn Dr. S.A. Kasseckert für die guten Ratschläge bedanken.

**Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen
Version der Arbeit entfernt.**

**The curriculum vitae was removed from the
electronic version of the paper.**

PUBLIKATIONEN:

1. Y. Abdallah, A. Gkatzoflia, H. Pieper, E. Zoga, S. Walther, S. Kasseckert, M. Schäfer, K.D. Schlütter, H.M. Piper, C. Schäfer.
Mechanism of cGMP – mediated protection in a cellular model of myocardial reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 2005, 66:123-131.

2. Abdallah Y., Gkatzoflia A., Gligorievski D, Kasseckert S, Euler G, Schlüter KD, Schäfer M., Piper H.M., Schäfer C..
Insulin protects cardiomyocytes against reoxygenation-induced hypercontracture by a survival pathway targeting SR Ca²⁺ storage.
Cardiovasc Res 2006, 70:346-53.

Kongresse:

- 70. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie- Herz und Kreislaufforschung, April 2004, Mannheim, Poster
und
- 82. Jahrestagung der Deutschen Physiologischen Gesellschaft, März 2003, Bochum, Poster
Mechanismus der Insulin-vermittelten Myokardprotektion gegen den Reperfusionsschaden
- 33. Jahrestagung der Gesellschaft für Neonatologie und Pädiatrische Intensivmedizin.
C. Richter, A. Gkatzoflia, KP Zimmer, M. Heckmann. Zentrum für Kinderheilkunde und Jugendmedizin, Justus- Liebig- Universität, Gießen
Schweres neonatales Abstinenzsyndrom nach transdermaler Fentanylapplikation in der Schwangerschaft. *Z Geburtshilfe Neonatol* 2007; 211.

Mitglied der GRID Studie (Giessen Research Centre In Infectious Diseases):

Untersuchung bei Sepsis von Wechselwirkungen von Erreger und Patient (Frühgeborene) und molekularen Veränderungen. Es werden gemeinsamen Genexpressions-Profilen, die als Antwort auf infektiöse oder entzündliche Reize im

Wirt aktiviert werden, untersucht. Durch eine genomweite Analyse (Arraytechnik) werden verschiedener Gengruppen, die im Rahmen der Erkrankung eine entscheidende Rolle zu spielen scheinen, identifiziert.

SPRACHEN/ EDV KENNTNISSE

Deutsch, Englisch: fließend in Wort und Schrift

Griechisch: Muttersprache

MS – Windows, MS – Office,

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

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

ISBN: 978-3-8359-5581-3

