

Das myokardiale Reperfusionssyndrom unter dem Einfluß des Calpaininhibitors A-705239. Eine Untersuchung funktioneller und mitochondrialer Parameter am Modell des isoliert perfundierten Kaninchenherzen nach Langendorff.

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

vorgelegt von Oliver Götte
aus Bad Hersfeld

Gießen 2004

Aus dem Zentrum für Innere Medizin

Direktor: Prof. Dr. H. Tilmanns

Institut für Klinische Pathophysiologie
und Experimentelle Medizin

Leiter: Prof. Dr. med. H. Neuhof

des Klinikums der Justus-Liebig-Universität Gießen

Gutachter: Prof. Dr. H. Neuhof

Gutachter: PD Dr. Noll

Tag der Disputation: 21.06.2005

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	MYOKARDIALE ISCHÄMIE	2
1.2	REPERFUSIONSSYNDROM	6
1.3	EINFLUß DES ISCHÄMIE-REPERFUSIONS-SYNDROMS AUF DIE MITOCHONDRIENFUNKTION	11
1.4	CALPAIN-CALPASTATIN-SYSTEM	13
1.4.1	<i>Struktureller Aufbau der Calpaine</i>	13
1.4.2	<i>Aktivierung des Calpain-Calpastatin-Systems</i>	17
1.4.3	<i>Physiologische und pathophysiologische Bedeutung von Calpainen</i>	19
1.4.4	<i>Calpaininhibitoren</i>	20
2	FRAGESTELLUNG	22
3	MATERIAL UND METHODEN	23
3.1	MODELL DES ISOLIERT PERFUNDIERTEN HERZENS	23
3.2	PRÄPARATION UND ORGANENTNAHME	27
3.3	VERSUCHSTIERE	29
3.4	VERWENDETER CALPAIN-INHIBITOR	29
3.5	PERFUSIONSMEDIUM	30
3.6	VERSUCHSGRUPPEN UND VERSUCHSABLAUF	31
3.7	VERSUCHSMONITORING	33
3.7.1	<i>Hämodynamische Parameter</i>	33
3.7.2	<i>Nekrose-anzeigende Parameter LDH und CK</i>	34
3.7.3	<i>pH, pCO₂, pO₂, Temperatur</i>	34
3.8	MITOCHONDRIALE OXYMETRIE	36
3.8.1	<i>Testverfahren zur Überprüfung der Intaktheit der mitochondrialen Innenmembran</i>	37
3.8.2	<i>Testverfahren zur Überprüfung der Intaktheit der mitochondrialen Außenmembran</i>	38
3.9	STATISTIK	39
4	ERGEBNISSE	40
4.1	VERSUCHE MIT GLOBALER „NO-FLOW“-ISCHÄMIE	40
4.1.1	<i>Parameter der Hämodynamik</i>	40
4.1.1.1	Relative linksventrikuläre Kontraktionsamplitude	42
4.1.1.2	Koronarer Gesamtwiderstand (w_{cor})	43
4.1.1.3	Herzfrequenz (hf)	45
4.1.2	<i>Nekroseanzeigende Enzyme</i>	45
4.1.2.1	Kreatinphosphokinase (CK)	45
4.1.2.2	Laktatdehydrogenase (LDH)	46

4.2	VERSUCHE OHNE ISCHÄMIE	47
4.2.1	<i>Parameter der Hämodynamik</i>	48
4.2.1.1	Relative linksventrikuläre Kontraktionsamplitude.....	48
4.2.1.2	Koronarer Gesamtwiderstand (w_{cor}).....	50
4.2.1.3	Herzfrequenz (hf).....	50
4.2.2	<i>Nekroseanzeigende Enzyme</i>	50
4.2.2.1	Kreatinkinase (CK).....	51
4.2.2.2	Laktatdehydrogenase (LDH)	52
4.3	MITOCHONDRIALE OXYMETRIE	53
5	DISKUSSION	56
6	ZUSAMMENFASSUNG	62
7	LITERATUR	64
	LEBENS LAUF	78

1 Einleitung

Ischämische Herzerkrankungen, wie der Myokardinfarkt oder die Angina pectoris, stellen ein Haupt-Gesundheitsproblem in der westlichen Welt dar. In den letzten drei Jahrzehnten konnte durch den beträchtlichen Fortschritt auf den Gebieten der Prävention, der Pathogenese und der Therapie die Mortalität merklich gesenkt werden (von circa 65% auf etwa 35%) (66).

Verschiedene Risikofaktoren, wie Hypercholesterinämie, Nikotinkonsum, Hypertension oder Diabetes mellitus gelten als gesichert, das Auftreten von ischämischen Herzkrankheiten zu fördern als Konsequenz der Bildung von arteriosklerotischen Plaques und/oder Thrombosen in dem koronararteriellen Stromgebiet und der Entwicklung von Koronarspasmen. In der Folge kommt es zur Minderperfusion des betroffenen Myokardareals mit konsekutiver kontraktile Dysfunktion und Arrhythmie neigung durch die Zerrüttung des zellulären Metabolismus' und der zellulären Integrität. Die Ischämie führt zu einem Mangel an energiereichen Phosphaten, gesteigerter anaerober Glykolyse mit Laktatbildung und Azidose, intrazellulärer Natrium- und Kalziumüberladung, Strukturänderung von Zellorganellen, elektromechanischer Entkopplung, Membranschädigungen und schließlich zum Zelltod (40, 41).

Von entscheidender Bedeutung für den Patienten ist die frühestmögliche Revaskularisation des betroffenen Myokardareals durch moderne Therapiemodalitäten, wie beispielsweise aortokoronare Bypassoperationen, diverse Thrombolyseverfahren, perkutane transluminale Koronarangioplastie (PTCA), intrakoronare Stent-einlage u.ä., wobei jedoch selbst bei reversibel geschädigtem Myo-

kard durch rasche Interventionen nicht regelmäßig eine initiale Verbesserung der kontraktiven myokardialen Funktion erreicht wird (77). Überdies hinaus kann durch die Reperfusion an sich ein, von dem eigentlichen Ischämieschaden abzutrennender, zusätzlicher Schaden an den zellulären und subzellulären Strukturen bewirkt werden (85). Die zugrundeliegenden pathophysiologischen Mechanismen und deren bisheriger Stand sollen im folgenden einzeln dargestellt werden.

1.1 Myokardiale Ischämie

Metabolische Veränderungen

Das Myokard bezieht unter normalen aeroben Bedingungen seine Energie überwiegend aus der mitochondrialen Oxidation von Acetyl-CoA, welches beim Abbau der Fettsäuren durch β -Oxidation, als auch beim Abbau der Kohlenhydrate durch oxidative Decarboxylierung von Pyruvat entsteht; vorwiegende Substrate hierfür sind freie Fettsäuren (zu etwa 50-60%), Glucose (zu etwa 30%) und Laktat (20%) (60).

Bei ischämischen Ereignissen (z. B. Myokardinfarkt, Herzkatheteruntersuchung, Operationen unter extrakorporaler Zirkulation) kommt es durch die Unterbrechung der Blutzufuhr zum absoluten Sauerstoffmangel mit der Folge des Erliegens des aeroben Stoffwechsels (oxidative Phosphorylierung, β -Oxidation) und zur Stimulation der anaeroben Glycolyse. Hierbei wird die Kapazität, energiereiche Phosphate in Form von ATP und Kreatinphosphat zu bilden, drastisch vermindert (nur 3 Mol ATP / Mol Glucose vs. 38 Mol bei oxidativem Metabolismus), so dass es rasch zur Erschöpfung der ATP-Speicher kommt mit konsekutivem Sistieren der me-

chanischen Kontraktionen und dem intrazellulären Anhäufen saurer Metaboliten (99). Hauptsächlich jedoch führen die durch die Laktatproduktion der anaeroben Glykolyse und die Hydrolyse von ATP entstehenden Protonen zur intra- und extrazellulären Azidose (94), welche wiederum negative Auswirkungen auf die Membranleitfähigkeit, auf metabolische Funktionen und sowohl auf die Kalziumhomöostase als auch auf die Kalziumansprechbarkeit der Myofilamente hat (15, 38, 60).

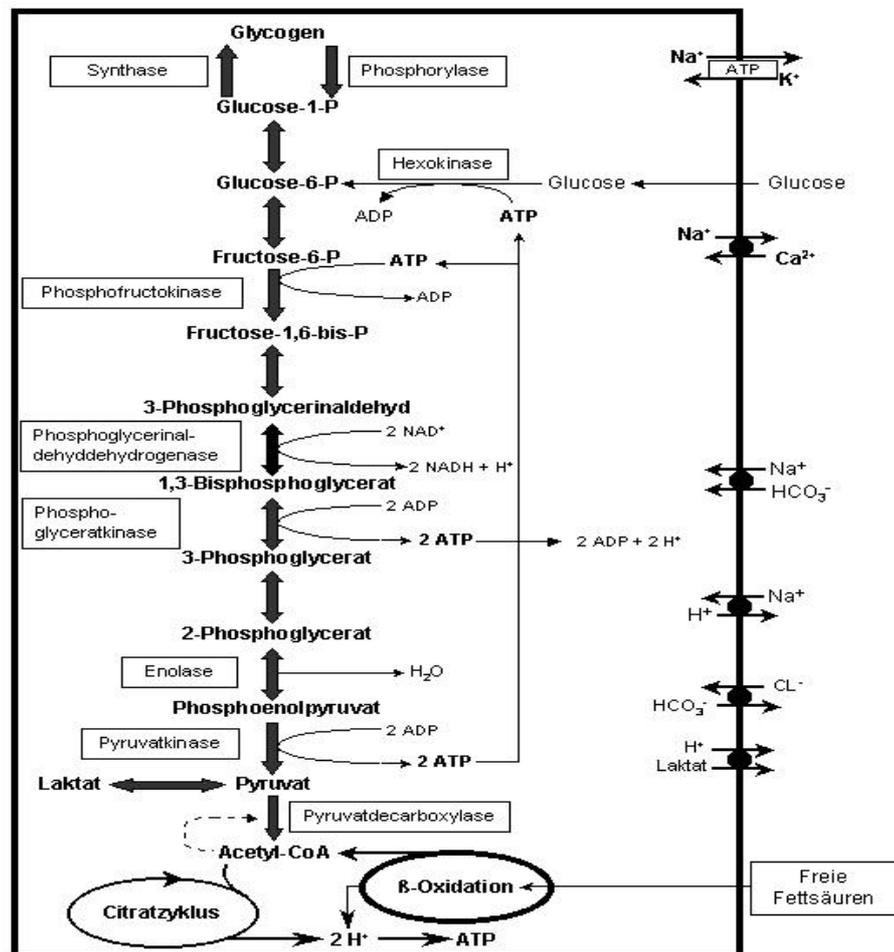


Abbildung 1-1: Übersicht über den Glucosestoffwechsel der Herzmuskelzelle, mit Darstellung der für das Ischämie-Reperfusionssyndrom wichtigen Ionenkanäle (60).

Elektromechanische Veränderungen

Mit der Erschöpfung der zellulären Energieproduktion werden ATP-abhängige Ionenkanäle, insbesondere die sarkolemmale Na^+ - K^+ -ATPase und die Ca^{2+} -ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums (SR- Ca^{2+} -ATPase) insuffizient (45), mit dem Effekt des verminderten Membranpotentials (durch Kaliumaustritt), mitochondrialer Kalziumeinlagerung (protonen-getriebener Kalziumefflux sistiert) und zytosolischer Natrium- und Kalziumanhäufung. Die intrazelluläre Azidose führt über den Na^+ - H^+ -Austauschcarrier (NHE1) zu einem zusätzlichen Natriumeinstrom (siehe Abbildung 1-1), der während der Ischämie nur gering an dem sogenannten Kalzium-„Overload“ via Na^+ - Ca^{2+} -Austauschcarrier beteiligt ist (32, 71). Für erhöhte intrazelluläre Kalziumkonzentrationen werden für adulte Cardiomyozyten im wesentlichen folgende Effekte beschrieben:

- Aktivierung zahlreicher Enzyme, wie Proteinkinasen, Oxidasen, Phospholipasen, lysosomale und zytosolische Proteasen (z. B. Calpain), was zu ultrastrukturellen Schäden führt, sowie zur Produktion freier Radikale (ROS)
- Akkumulation von Kalziumphosphat in der Mitochondrienmatrix führt zur Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung
- Aktivierung Ca^{2+} -abhängiger ATPasen, mit der Folge erhöhten ATP-Verbrauchs als Ursache kontraktile Dysfunktion
- Auftreten von postischämischen Kontrakturen und Arrhythmien
- Präzipitationen in Myofilamenten mit Bildung von „contraction bands“

Laut R.B. Jennings und C. Steenberger liegt die intrazelluläre Konzentration des Kalziums während noch reversibler Ischämiephasen im mikromolaren, während irreversibler Ischämien jedoch im millimolaren Bereich (42). Die Frage, ob die Kalziumüberladung ein sekundäres Phänomen oder letztendlich der auslösende Grund des letalen Ischämie-Reperfusionsschadens ist, bleibt ungeklärt.

Als Konsequenz des ATP-Mangels, der Formation von Sauerstoffradikalen, dem Verlust der Ionenhomöostase und der Akkumulation intrazellulärer, osmotisch wirksamer Substanzen sowie der Aktivierung membranschädigender Enzymkaskaden kommt es unausweichlich zu Zell- und Mitochondrienschwellung und nach entsprechend schweren Ischämien sequentiell zu Membranrupturen, welche einen irreversiblen Zellschaden definieren. (26, 33, 40, 41, 98)

Strukturelle und ultrastrukturelle Veränderungen

Graduelle histologische Unterschiede zwischen schwerer reversibler und irreversibler ischämischer Schädigung der Myozyten lassen sich anhand elektronenmikroskopischer Untersuchungen feststellen. Betroffene, reversibel geschädigte Zellen zeigen hier eine Schwellung der Mitochondrien, Aufhellung der Matrixgranula, Cristaeveränderungen, Zell- und Zellkernödem sowie periphere nukleäre Chromatinaggregationen.

Zeichen der irreversiblen Schädigung sind zusätzlich zu den genannten: Bildung von amorphen mitochondrialen Matrixablagerungen („flocculent densities“: Kalziumphosphat), Fragmentation der Cristae, Myofibrillenüberdehnung („hypercontractions“), Auflösung des sarkoplasmatischen Retikulums sowie sarkolemmale und mitochondriale Membranrupturen (36, 42).

Die bestimmende Determinante der Reversibilität eines ischämischen Insultes schließt zwangsläufig die Ischämiedauer mit ein, jedoch nicht ausschließlich. Ebenso mitbestimmende Faktoren sind hauptsächlich: 1.) Kollateralgefäßbildung, 2.) Grunderkrankungen, wie Diabetes mellitus oder kardiale Hypertrophie, 3.) Gewebs-temperatur und Stoffwechselrate, 4.) individuelle metabolische Reaktion auf die Ischämie, 5.) Ernährungs- und Hormonstatus, 6.) vorausgegangene Ischämien, 7.) Medikamente und 8.) Alter, Geschlecht und Spezies (35). Inwiefern der Reperfusionsschaden einen quantitativen und qualitativen Anteil hat und sich modifizieren lässt, ist Gegenstand aktueller Forschung.

1.2 Reperfusionssyndrom

Während die Wiederherstellung der koronaren Durchblutung nach einem ischämischen Ereignis essentiell notwendig ist, um die weiter fortschreitende ischämische Destruktion zu stoppen, kann durch die Reperfusion selbst, über eine Reihe von intra- und extrazellulären pathophysiologischen Vorgängen, ein zusätzlicher Schaden an den durch die Ischämiephase potentiell reversibel lädierten und somit potentiell überlebensfähigen Kardiomyozyten bewirkt werden, bis hin zur Gewebsnekrose (durch Zellödem und folgende Membranruptur) und zur Apoptoseinduktion (27). Je nach Dauer der vorausgegangenen Ischämiephase kann dieser Reperfusionsschaden („reperfusion injury“) von reversibler oder irreversibler Natur sein, wobei dessen Schwere direkt proportional mit der Ischämiezeit korreliert (11, 46).

Die prolongierte mechanische Dysfunktion, die nach einer einzigen oder nach mehreren, aufeinanderfolgenden kurzen Ischämie-

perioden trotz Wiederherstellung eines normalen oder fast normalen Koronarflusses und Abwesenheit morphologischer Schäden für Stunden bis wenige Tage auftritt („myocardial stunning“) sowie postischämische ventrikuläre Arrhythmien sind typische Erscheinungsformen des reversiblen Reperfusionsschadens .

Mit der Wiederherstellung der Perfusion im betroffenen Areal kommt es durch die Bereitstellung der erforderlichen Substrate zur langsamen Wiederaufnahme des aeroben Zellstoffwechsels; mechanische Aktivitäten stellen sich wieder ein, ATP-Speicher füllen sich, ATP-abhängige Enzyme und Membranproteine werden reaktiviert. Die rasche interstitielle Elimination der in der Ischämieperiode angefallenen osmotischen Substanzen spielt eine große Rolle insofern, dass durch die Reperfusion im Extrazellulärraum relativ schnell wieder physiologische Zustände eintreten, hingegen die Zellmembranen nicht so schnell in der Lage sind, die intrazellulären Metaboliten, insbesondere hohe Konzentrationen an Natrium, Kalzium, Laktat und Protonen, auszuschleusen. Das hierdurch erzeugte osmotische Gefälle bewirkt eine zusätzliche Zellschwellung durch Flüssigkeitseinstrom aus dem Interstitium. Gleichzeitig wird durch die pH-regulierenden Mechanismen (via NHE1, Na^+ - HCO_3^- -Symport, H^+ -Laktat-Symport, $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher) ein intrazellulärer Einstrom von Natrium begünstigt. Dieses gilt neben Membrandefekten als Voraussetzung für den exazerbierten „Kalzium-Overload“ in der Reperfusion, wobei dem sarkolemmalen Na^+ - Ca^{2+} -Austauscher, der über die hohen intrazellulären Na^+ -Konzentration angetrieben wird, die primär kausale Verantwortung hierfür überwiegend zugeschrieben wird (34, 75). Shattock et al. wiesen nach, dass während der Ischämie die sarko-

lemmale Na⁺-K⁺-ATPase in den Zellbinnenraum transloziert und während der Reperfusion nur insuffizient relokalisiert, somit zur transienten Na⁺-Überladung beiträgt (87).

Der „Kalziumoverload“ als Ursache des Reperfusionssyndroms ?

Zusätzlich zu den schon oben erwähnten Folgen steht die zytosolische Ca²⁺-Überladung im Verdacht, energieverbrauchende transmembranöse Kalziumtransporter, wie den Ca²⁺-H⁺-Symport an der mitochondrialen Innenmembran, zu aktivieren und somit für Kontraktionsvorgänge wichtige ATP-Bestände zu verbrauchen (69). Daneben existieren zahlreiche Hinweise auf eine übermäßige Aktivitätssteigerung kalziumabhängiger Proteasen (wie den Calpainen), die zur Proteolyse kontraktiler Filamente oder für den Kontraktionsvorgang wichtiger Proteine (z. B. des Ryanodinrezeptors des SR) und ATPasen führen könnten und daher große Bedeutung bzgl. des Reperfusionssyndroms einnehmen (11, 37, 53, 63).

Die Entstehung freier Sauerstoffradikale als Ursache des Reperfusionssyndroms ?

Verschiedene Studien haben in den letzten Jahren durch 1.) den direkten Nachweis freier Sauerstoffradikale („reactive oxygen species“: ROS, mittels „spin traps“), 2.) die Erzeugung jener mit Demonstration deren negativer Auswirkungen auf das Myokard und 3.) den Einsatz kardioprotektiver Antioxidantien kurz nach der Ischämie gezeigt, dass die Entstehung der ROS einen wesentlichen Anteil an dem frühen Reperfusionsschaden hat (22, 74). So führen die durch das freie Elektron hochreaktiven Radikale unter anderem zur Peroxidation der sarkolemmalen Phospholipide, zur vermindernden Ca²⁺-Ansprechbarkeit der Myofilamente (durch selektive Thiol-

gruppenoxidation), 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 (31, 39, 89, 101, 105, 109). Die beschriebenen Effekte nehmen so wiederum Einfluss auf die Ca^{2+} -Homoöstase und auf die elektromechanische Kopplung der Herzmuskelzelle. Auch werden Reperfusionssarrhythmien auf das schlagartige Entstehen freier Sauerstoffradikale (Hydroxylradikal, Superoxidanion, Singletsauerstoff) in der frühen Reperusionsphase zurückgeführt (16). Die Aktivierung von NAD(P)H-Oxidasen, Xanthinoxidase und Arachidonsäurekaskade, die Störung der mitochondrialen Elektronentransportkette, die Bildung von Peroxynitrit aus NO (EDRF), die Autooxidation von Katecholaminen und die Aktivierung von Makrophagen kommen als radikalerzeugende Quellen in Frage (11, 74).

Das Endothel und die inflammatorische Antwort als Ursache des Reperfusionssyndroms ?

Die auf die Ischämie / Reperfusion zurückzuführende mikrovaskuläre Schädigung bewirkt über die Expression proinflammatorischer, prokoagulatorischer sowie vasokonstriktiver Mediatoren als auch über eine gestörte Vasomotion Verhältnisse, welche die Wiederherstellung einer normalen koronaren Perfusion behindern. Zusätzlich zum endothelialen Ödem und verminderter NO-Freisetzung führen Mikrothrombosen, Adhäsion von neutrophilen Granulozyten und gesteigerter Vasomotorentonus zur Gefäßwiderstandserhöhung, die bis hin zum totalen Sistieren des Koronarflusses reichen kann („no-reflow“-Phänomen) (12).

Neben den vaskulären Mechanismen erlangt bei längeren (>30 min.) Ischämien die Aktivierung der Komplementkaskade mit der Bildung von vasoaktiven und chemotaktischen Anaphylatoxinen (C3a, C4a, C5a) und zytotoxischer Membranangriffskomplexe (C5b-9, MAC) besondere Bedeutung hinsichtlich des Reperfusionsschadens, in deren Folge es zur Myozytolyse, zur Ausschüttung von Zytokinen und proteolytischen Enzymen sowie zur Bildung von freien Sauerstoffradikalen durch aktivierte Makrophagen kommt (74).

Hinsichtlich der großen klinischen Relevanz des Ischämie-Reperfusionssyndroms wurden bis heute zahlreiche Ansätze gefunden, den Reperfusionsschaden zu minimieren. So zielen beispielsweise die NHE1-Hemmung (durch HOE694, HOE642 oder Amilorid), die selektive Ca^{2+} -Kanalhemmung (Ryanodin, R56865) und hypokalzämische, alkalotische Reperfusionlösungen erfolgreich darauf ab, den Kalziumoverload und das damit verbundene Auftreten von Arrhythmien, Kontrakturen, „myocardial stunning“ und von Zellnekrosen merklich zu verringern (7, 55, 108).

Durch NO-Synthase-Hemmung (durch L-NAME, AMG), Hemmung der Bradykininaktivierung sowie durch Angiotensin-Converting-Enzyminhibition (Rampiril, Enalapril) konnte das myokardiale „stunning“ vermindert werden, wahrscheinlich durch die überwiegend vasodilatierenden Eigenschaften des Bradykinins bzw. Prostazyklins (90, 93, 111).

Glykosaminoglykane, wie Heparin und N-Acetylheparin, bewirken durch die unspezifische Hemmung der Komplementkaskade eine

Hemmung der Granulozytenaktivierung und somit einen Rückgang an reperfusionsbedingten Zellschäden (10).

Substanzen, die in der Lage sind, die Bildung von freien Radikalen zu vermindern (SOD, Katalase, MPG, Dimethylthioharnstoff, Desferrioxamin), konnten, wenn sie innerhalb der ersten fünfzehn Minuten nach Beginn der Reperfusion appliziert wurden, die postischämische kontraktile Dysfunktion und das Auftreten von Arrhythmien signifikant reduzieren (11).

1.3 Einfluß des Ischämie-Reperfusions-syndroms auf die Mitochondrienfunktion

Mitochondrien nehmen im Herzmuskelgewebe etwa 35% des Zellvolumens ein und erzeugen über die oxidative Phosphorylierung circa 95% des für die Herzarbeit benötigten ATP. Daneben sind sie an spezifischen Synthesen (Orotsäure, Phosphatidylethanolamin, Harnstoff) und an der aktiven Steuerung der zellulären Ca^{2+} -Homöostase beteiligt (59). Funktionseingeschränkte Mitochondrien sind als Ursache zahlreicher Krankheiten des Nervensystems und der Skelettmuskulatur bekannt. Hinsichtlich des „myocardial stunning“, einer Form des reversiblen Reperfusionsschadens, existieren mehrere Hinweise auf das Vorliegen mitochondrialer Dysfunktionen. So wurden in reversibel geschädigten Kardiomyozyten sowie in deren Mitochondrien während der frühen Reperfusionsphase erhöhte Ca^{2+} -Konzentrationen gemessen, welche wiederum ATP-verbrauchende Ca^{2+} - H^+ -Carrier an der inneren Mitochondrienmembran aktivieren, den Zellenergiebedarf somit erhöhen und in der Folge zum Missverhältnis zwischen oxidativer metabolischer Rate und mechanischer Funktion („oxygen paradox“) führen (56, 69).

Als molekulare Ursache des Reperfusionsschadens gilt derzeit die Beteiligung freier Sauerstoffradikale (ROS) als gesichert (24, 25); hierdurch könnten auch Bestandteile der Mitochondrien (Atmungskettenenzyme, Membranlipide oder mitochondriale DNA) direkt, oder über die Entstehung von Peroxynitrit (ONOO^-) geschädigt werden und somit zur Funktionsstörung führen. Toyo-oka et al. beschrieben synergistisch deletäre Effekte der ROS und des Ca^{2+} -Overloads auf Enzyme der Atmungskette (105).

Ferner kommt es durch den ischämischen Zellstress zur Translokation pro-apoptotischer Proteine der Bcl-2-Familie, was durch Cytochrom-c-Katalyse (mitochondriales Enzym der Atmungskette) in der Aktivierung der Caspasen-Kaskade über den Apoptose activating factor 1 (AF1) mündet und somit die Apoptose induzieren könnte (115).

Mehrere Studien haben gezeigt, dass Ischämie und Reperfusion zu einer erhöhten Aktivität von kalzium-aktivierten Proteasen, sogenannter Calpaine, führen, welche Zellnekrosen und die Einleitung des programmierten Zelltodes nach sich ziehen können (50).

Die Tatsache, dass diese aktivierten Proteasen an Schädigungen des Zytoskeletts, Zellmembranen und anderen zytoplasmatischen Proteinen, wie Rezeptoren oder Carrierproteinen, beteiligt sind (siehe Kapitel 1.4), wirft die Frage auf, inwiefern sie negative funktionelle und strukturelle Auswirkungen auf Mitochondrien haben. Da Mitochondrien auch eine große Rolle in der Vermittlung des programmierten Zelltodes spielen, wäre es denkbar, mit spezifischen Calpaininhibitoren den Mitochondrienschaden und damit eventuell das Ausmaß der Apoptose zu verringern, zusätzlich zu den etwaigen, frühen kontraktilen, respektive zellenergetischen

Vorteilen, die eine solche Proteasensuppression möglicherweise mit sich brächte.

1.4 Calpain-Calpastatin-System

Für die intakte Funktion aller zellulären Systeme des Organismus sind biosynthetische Prozesse essentiell. Unter kontinuierlich wechselnden Bedingungen der Umgebung stellt die adaptive Biosynthese von Proteinen und Enzymen sowie der kontrollierte Abbau derer die Basis für die Überlebensfähigkeit einer jeden Zelle dar. Adäquate proteolytische Systeme hierfür unterscheiden sich funktionell hinsichtlich ihrer Substratspezifität und ihrer Regulationsmechanismen. In Säugetierzellen wird der Abbau der Proteine durch die folgenden drei Systeme vermittelt:

- Saure lysosomale Proteasen (Cathepsine D, B, L, H)
- Zytoplasmatischer multikatalytischer Proteasenkomplex (Proteasom, Makropain)
- Kalzium-aktivierte neutrale Proteasen (Calpain-System),

wovon dem Calpain-System und seinem endogenen Inhibitor Calpastatin in den letzten Jahren wachsendes Interesse zuteilgeworden ist, da es offensichtlich in einer Vielzahl physiologischer und pathophysiologischer Prozessen in und außerhalb der Zelle involviert ist.

1.4.1 Struktureller Aufbau der Calpaine

Alle Proteasen des Calpain-Systems (E.C 3.4.22.17) sind im Allgemeinen intrazelluläre, zytoplasmatische oder membrangebundene Ca^{2+} -abhängige Cysteinproteinasen. Bisher sind in Säugetieren mindestens dreizehn Isomere der Calpainfamilie charakterisiert worden

(siehe Tabelle 1-1), die aufgrund ihres Vorkommens den ubiquitären (syn. konventionellen, z. B. μ - und m-Calpain) oder den gewebespezifischen Calpainen (z. B. p94, nCL-1 oder Calpain 3 im Skelettmuskel) zugeordnet werden können (78).

Die „klassischen“ ubiquitären Calpaine μ - und m-Calpain (syn. Calpain 1 und 2) sind sich im inaktiven Zustand makromolekular fast identisch: beide Isoformen existieren als Heterodimere, bestehend aus einer großen katalytischen (80kDa, L-chain) und einer kleinen regulatorischen Untereinheit (30kDa, S-chain), wobei letztere in beiden Enzymen homolog sind (ein Genlocus, CAPN4), und die großen Untereinheiten (80kDa) sich nur geringfügig bezüglich der Konformität und der Aminosäuresequenz (zu 61% identisch) unterscheiden (19, 67).

Vier Domänen (I-IV) repräsentieren die große 80kDa Untereinheit, während die 30kDa Untereinheit aus zwei Domänen (V und VI) aufgebaut ist. Hierbei weist Domäne II starke Sequenzhomologien zu anderen Cystein-Proteasen, wie Papain oder den Cathepsinen D, B, H und L auf und wird als nicht durch Kalzium aktivierbar beschrieben. Domäne IV und VI entsprechen calmodulin-ähnlichen Domänen mit fünf EF-Motiven und stellen die Ca^{2+} -bindende Einheit des Enzyms dar. In der Abwesenheit von Kalzium sperren sie das aktive Zentrum von Domäne II. Der Domäne I wird als Propeptid eine auf die katalytische Domäne II inhibitorische Funktion zugesprochen; zusammen mit den Domänen III und V verbindet sie die zwei calmodulin-ähnlichen Domänen mit der katalytischen Einheit. Röntgenstrukturanalytisch wurde eine große topologische Ähnlichkeit der Domäne III mit Untereinheiten von TNF- α und sogenannten C2-Domänen festgestellt (78), welche in vielen Prote-

inen vorkommen, die an intra- und extrazellulären Signalprozessen beteiligt sind (Phospholipasen A2 und C, Proteinkinase C und Synaptotagmin). Es wird vermutet, dass sie zusammen mit der Domäne I an der Substraterkennung beteiligt ist. Die hydrophobe, glycinreiche Domäne V soll eine wichtige Rolle in der Interaktion der Calpaine mit Phospholipiden und Membranen spielen (19, 64, 80, 96, 97).

Zimmermann et al. wiesen an „knockout-Mäusen“ nach, dass zumindest ein normales Allel des für die kleine Untereinheit kodierenden Gens für das frühe fetale Überleben essentiell ist (114). Jedoch sind die genauen Funktionen und Interaktionsmechanismen der einzelnen Domänen, sowie Untereinheiten noch nicht hinreichend geklärt.

Nur wenige dieser typischen Calpaine sind wie die relativ gut beschriebenen μ - und m-Calpaine (nach der in vitro zur Aktivierung benötigten mikro- bzw. millimolaren Ca^{2+} -Konzentrationen benannt) heterodimerisch aufgebaut; die meisten der bislang charakterisierten bestehen nur aus der variablen großen Untereinheit.

Neben diesen „typischen“ Calpainen mit der μ -/m-ähnlichen L-Untereinheit sind in niedrigeren Organismen, wie Nematoden, Pilzen und Hefen bereits auch „atypische“ Calpaine gefunden worden, welche neben der katalytischen Papain-bezogenen Domäne andere amino- und carboxyterminale Domänen enthalten (91).

Innerhalb der Zelle hängt die Verteilung der Calpaine von der Zellart und dem jeweiligen Calpainisozym ab, so ist z. B. in Gliazellen von C6 Mäusen die Calpain 2-Aktivität zu 70% mit der Zellmembran assoziiert, während das Calpain 1 hauptsächlich (80%) im Zytosol gefunden wird (43, 84).

Gen	Genprodukt	Homologe	Vorkommen
CAPN1	Calpain 1, μ -Calpain (80kDa-Untereinheit)	(Typisches Calpain)	ubiquitär
CAPN2	Calpain 2, m-Calpain (80kDa-Untereinheit)	(Typisches Calpain)	ubiquitär
CAPN3	Calpain (p94, nCL-1)	3 (Typisches Calpain)	Skelettmuskel
CAPN4	30kDa-Untereinheit	(Regulatorprotein)	Ubiquitär
CAPN5	Calpain (hTRA-3, nCL-3)	5 TRA-3 (Nemato- den)	ZNS, Hoden, Leber, Niere
CAPN6	Calpain 6 (Calpamodulin, CAPN6)	TRA-3 (Nemato- den)	Plazenta
CAPN7	Calpain 7 (PalBH)	PalB (Pilze), Cp11 (Hefen)	Ubiquitär
CAPN8	Calpain (nCL-2)	8 (Typisches Calpain)	Magen
CAPN9	Calpain (nCL-4)	9 (Typisches Calpain)	Verdauungstrakt
CAPN10	Calpain 10A-H	(Typisches Calpain)	Ubiquitär
CAPN11	Calpain 11	(Typisches Calpain)	Hoden
CAPN12	Calpain 12	(Typisches Calpain)	Follikel
CAPN13	SOLH	SOL (Drosophila)	Ubiquitär

Tabelle 1-1 : Die Familie der zur Zeit charakterisierten Calpaingene, ihren Produkten und deren Homologe in anderen Organismen, sowie der Ort ihrer Expression.

1.4.2 Aktivierung des Calpain-Calpastatin-Systems

Neben diversen Aktivatoren, wie Metallionen (Mg^{2+} , Al^{3+}), Carnitin, Anserin und Methylhistidin scheint der Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration bzw. eine gesteigerte Empfindlichkeit des Enzyms für Kalzium der Hauptaktivierungsmechanismus des Calpain-Systems zu sein (64). Die Bindung von Ca^{2+} -Ionen an die „Calmodulin-ähnlichen“ Domänen (IV und VI) der großen und kleinen Untereinheit soll durch autolytische Spaltung beider Untereinheiten zu einer neuen aktiven Form des Calpainenzym führen, die nach Konformationsänderung und etwaiger Dissoziation ihr aktives Zentrum freigibt, um Substrate, Inhibitoren oder auch eigene Untereinheiten zu binden und zu spalten (72, 91). Jene autolytierten, neuen Calpaine benötigen weniger Ca^{2+} zur Katalyse als ihre Ausgangsformen. Dieser Prozess ist für m-Calpain beschrieben, welches eine die physiologischen Verhältnisse übersteigend hohe Konzentration an freien Ca^{2+} -Ionen (0,75 mM) benötigt, um in „in-vitro“-Versuchen seine maximale proteolytische Aktivität zu erreichen. Ähnliche Ca^{2+} -sensibilisierende Mechanismen wurden für die Interaktion mit verschiedenen Phospholipiden der Zellmembran (2), für die Aktivierung von m-Calpain durch μ -Calpain (103) und für ein zytoskelltäres Aktivatorprotein beschrieben, das einen Komplex mit m-Calpain bildet und schon bei niedrigen Ca^{2+} -Konzentrationen im mikromolaren Bereich zur Autolyse führt (76). Als ubiquitärer, endogener Calpaininhibitor nimmt das Calpastatin in der strikten Enzymregulation eine wichtige Rolle ein; zum einen hemmt es unter physiologischen Ca^{2+} -Konzentrationen sterisch die Autolyse und die katalytische Aktivität der aktiven Form des Cal-

pains als auch die evtl. zur Aktivierung führende Bindung an Zellmembranbestandteile (47, 48), zum anderen ist wiederum m-Calpain in der Lage, Calpastatin zu spalten und somit in seiner inhibitorischen Funktion zu inaktivieren. Tompa et al. wiesen nach, dass Calpastatinfragmente eine aktivierende Funktion auf μ - und m-Calpain besitzen (104).

Die physiologische und pathophysiologische Funktion der Calpainaktivierung wird im wesentlichen durch die Funktion der durch sie gespaltenen Proteine bestimmt. Hierfür kommen beispielsweise folgende Substrate in Betracht, wobei ein gemeinsames Spaltungsmotiv bisher noch nicht identifiziert werden konnte (5, 14, 19, 48, 80, 83):

Zytoskelettale Proteine: Desmin, Vimentin, Talin, Fibronectin, Vinculin, α -Aktinin, Zytokeratin, Spectrin, Tau, Mikrotubuli assoziierte Proteine (MAP1/2), Troponine T, I, C, Ankyrin, Troponomyosin

Membranproteine: Adhäsionsmoleküle (N-CAM, A-CAM, Integrine, Connectine, Titin, Paxillin), Rezeptoren (Ryanodinrezeptor des SR), Regulatorproteine (Phospholamban), Carrierproteine (Ca^{2+} -ATPase)

Enzyme: Kinasen (Protein Kinase C, Kalzium/Calmodulin abhängige Protein Kinase IV), Phosphatasen (Phosphorylasephosphatase, Protein Tyrosinphosphatase 1B), Phospholipase (Phospholipase C), Synthasen (iNOS-Synthase)

Andere: Zytokine (IL-1 α), Transkriptionsfaktoren (YY1, c-Fos, c-Jun), Tumorsuppressoren (p53, NF2), Crystallin

1.4.3 Physiologische und pathophysiologische Bedeutung von Calpainen

Obwohl die genauen Funktionsweisen des Calpain-Calpastatin-Systems noch nicht komplett verstanden sind, deuten eine Vielzahl von Studien auf dessen potentielle Relevanz in der regulierten Proteolyse von Schlüssel- und Strukturproteinen hin. So ist eine Beteiligung des Calpain-Calpastatin-Systems belegt für den Auf- und Umbau des Zytoskeletts („cell remodeling“, (14)), die Muskelzell-differenzierung (18), die Fusion von Myoblasten (9, 65, 102), die Zellzyklusregulation (82), die Plättchenaktivierung (86), sowie für die Apoptoseeinleitung (30, 51).

Das Fehlen oder die verstärkte Aktivierung des Calpainsystems konnte für eine große Anzahl diverser pathologischer Prozesse demonstriert werden. In Zusammenhang mit ischämie-/reperusionsbedingten Prozessen wurden durch die Calpainaktivierung induzierte destruktive Mechanismen an mehreren Organsystemen beschrieben, wie beispielsweise an Hepatozyten (51), dem proximalen Nierentubulussystem (23), an kortikalen Neuronen des ZNS (84), sowie an Kardiomyozyten (73, 92).

Eine gesteigerte Transkription von Calpaingenen (CAPN3) konnte für die Beckengürtel-Muskeldystrophie (LGMD2A) und für die Muskeldystrophie vom Typ Duchenne nachgewiesen werden (84). Mutationen des für Calpain 10A-H codierenden Gens (CAPN10) sollen mit der Entstehung des Typ-2-Diabetes mellitus verbunden sein (78). Ferner wird eine übermäßige Aktivierung der Calpaine bei neurodegenerativen (M. Alzheimer, M. Parkinson), -trauma-

tischen (Waller'sche Degeneration) und demyelinisierenden (Multiple Sklerose) Erkrankungen diskutiert (14, 70).

Stella et al. beschrieben niedrige Calpain-Aktivitäten in Kardiomyozyten als mögliche Ursache einer linksventrikulären Hypertrophie bei essentieller Hypertonie (95).

Eine Ca^{2+} -Akkumulation mit konsekutiver Calpainaktivierung, welche wiederum zur Destruktion und Präzipitation von Crystallinen führt, wird für die Kataraktentstehung verantwortlich gemacht (88). Desweiteren wurden μ - und m-Calpain, sowie Autoantikörper gegen Calpastatin in der extrazellulären Knorpelmatrix von an rheumatoider Arthritis befallenen Gelenken gefunden, was die Frage einer ursächlichen Beteiligung des Proteasensystems impliziert (78). Die Beteiligung des Calpain-Calpastatin-System an der Karzinogenese (Nierenzell-, Lungen- und Mammakarzinomen, Gliomen) wird noch diskutiert (4, 13, 49).

1.4.4 Calpaininhibitoren

Die oben erwähnten Assoziationen der Calpainaktivität an eine Vielzahl pathologischer Vorgänge lassen die Beeinflussung dieses Systems, im Sinne einer direkten oder indirekten Hemmung, als möglichen Therapieansatz sinnvoll und aussichtsreich erscheinen.

Zu diesem Zweck wird zur Zeit eine Vielzahl an synthetischen Inhibitoren der Calpaine entwickelt und beforscht, welche allerdings bis jetzt die hochspezifischen Eigenschaften des endogenen Antagonisten Calpastatins noch nicht erreicht haben, so dass durch sie auch andere Proteasesysteme (siehe Kapitel 1.4) gehemmt oder sogar auch toxische Effekte bewirkt werden. Eine direkte, von außen bewirkte Applikation von Calpastatin scheidet aufgrund der Mole-

külgröße und fehlender Membrangängigkeit aus; denkbar ist evtl. die von außen bewirkte Aktivierung oder vermehrte Expression des endogenen Inhibitors. Zu den endogenen Antagonisten gehören ferner das extrazelluläre α 2-Makroglobulin und die zweite Domäne des Kininogens (80).

Synthetische Calpaininhibitoren beinhalten die Gruppen der **peptidischen Aldehyde** (Calpaininhibitor 1 und 2, MDL 28170), der **Oxirane** (CA-074, E64, E64d), der **Ketone** (Z-LLY-CHN₂), der **Ketoamide** (AK275, AK295), der **Mercaptoacrylate** (PD150), sowie andere **nicht-peptidische** Inhibitoren und **Zinkionen** (1, 6, 44, 62, 107).

2 Fragestellung

Hinsichtlich der klinischen Bedeutung des myokardialen Ischämie-Reperfusionssyndroms und der wahrscheinlichen Beteiligung des Calpain-Calpastatin-Systems hieran, soll in der vorliegenden Arbeit der konzentrationsabhängige Einfluss des neuen, nicht-peptidischen Calpaininhibitors A-705239 auf den Ischämieschaden und das Reperfusionsverhalten untersucht werden. Hierzu wurden Kaninchenherzen im Versuchsaufbau nach Langendorff isoliert zellfrei retrograd perfundiert, einer normothermen, globalen „now-flow“-Ischämie von 45 Minuten ausgesetzt und für 60 Minuten reperfundiert. Anhand hämodynamischer (Herzfrequenz, Koronarwiderstand, isovolumetrischer Kontraktionsdrücke) und laborchemischer Parameter (Nekrose-anzeigende Enzyme LDH und CK) sollte (i) die myokardiale Globalfunktion und zelluläre Integrität erfasst und (ii) mitochondriale Schädigungen mittels respirometrischer Untersuchung an Herzmuskelhomogenaten quantitativ und qualitativ aufgedeckt sowie etwaige Effekte durch den Einsatz des Inhibitors hieran objektiviert werden.

3 Material und Methoden

3.1 Modell des isoliert perfundierten Herzens

Das angewandte Modell ist dem Versuchsaufbau von Oskar Langendorff (21) nachempfunden und stellt ein offen kommunizierendes System dar. Das Prinzip hierbei besteht in der retrograden Perfusion des Herzens über einen Katheter, der entgegengesetzt des physiologischen Blutflusses in der Aorta platziert wird. Das benutzte Perfusat verlässt schließlich das Herz über die Vena cava superior et inferior und die eröffnete Arteria pulmonalis.

Die Entscheidung, ob mit konstantem Druck oder mit konstanter Volumenstromstärke (Flow) perfundiert werden sollte, fiel auf die druckkonstante Perfusionsart, da der Flow als abhängiger Messparameter einen Aufschluss über eine etwaige Vasomotion geben sollte.

In Analogie zu dem Ohm'schen Gesetz gilt folgende Beziehung zwischen Strömungswiderstand, Perfusionsdruck und Flow:

$$R = \frac{\Delta p (= \text{konst.})}{\Phi} \quad (1)$$

Da die Druckdifferenz Δp bei druckkonstanter Perfusion als Konstante auftritt, ist demnach der Flow Φ proportional zum Kehrwert des Strömungswiderstandes R . Nach dem Hagen-Poiseuilleschen Gesetz besteht folgendes Verhältnis zwischen dem Strömungswiderstand R , dem Radius r , der Gefäßlänge l und der Viskosität η :

$$R = \frac{8 \cdot l \cdot \eta}{\pi \cdot r^4} \quad (2)$$

Da Gefäßlänge, Viskosität und der Perfusionsdruck hier als konstante Größen agieren, ergibt sich aus Gleichung eins und zwei, dass sich der Flow Φ proportional zur vierten Potenz des Gefäßradius verhält:

$$\Phi \sim r^4 \quad (3)$$

Somit erweist sich der Flow und der aus ihm abgeleitete Gesamtwiderstand als ein sehr sensitiver Parameter zur Erfassung einer Vasomotion.

Das Perfusionsmodell (siehe Abb. 3-1) bestand im wesentlichen aus einem doppelwandigen Perfusatbehältnis und einem Schlauchsystem aus Silikon- und Polyethylenschläuchen durch welche das Perfusat mittels einer Rollerpumpe dem Herzen zugeführt wurde. In dem Perfusatbehältnis erfolgte die Anreicherung mit Sauerstoff über einen Bubbler bis zu einem Sauerstoffpartialdruck von etwa 540-600 mmHg. Durch variable Kohlendioxidbeimischung konnte der pH-Wert auf 7,39 bis 7,44 während der gesamten Versuchsdauer eingestellt werden. Der Rollerpumpe nachgestellt war ein Mikrofilter und ein höhenverstellbares und mit der Atmosphäre verbundenes Überlaufgefäß, welches durch Niveauänderung die Einstellung des Perfusionsdruckes auf 70mmHg gestattete. Das überschüssige Volumen, welches die Rollerpumpe förderte, gelangte über einen Rücklauf in das Perfusatresevoir zurück.

Zur Bestimmung des Koronarflusses diente ein sich kurz vor dem Perfusionskatheter befindliches Flowmeter, das die Durchströmung auf Grundlage elektromagnetischer Induktion maß. Um Luftembolien zu vermeiden, die z.B. durch einen Defekt im Schlauchsystem oder während der Versuchsvorbereitung entstehen konnten, war zwischen dem Überlauf und dem Flowmeter eine Blasenfalle integriert.

Das mittels einer Krokodilklemme an einem Stativ befestigte Herz wurde sofort nach der Präparation in ein kleines, mit warmer Perfusionslösung gefülltes Becherglas überführt und mit einer Rotlichtwärmeleuchte bestrahlt, um normotherme Bedingungen zu gewährleisten. Zur Temperaturhomöostase dienten auch die doppelwandigen Behältnisse, die von einer Thermopumpe kontinuierlich mit warmem Wasser (39°C) durchspült wurden und die Blasenfalle, das Herzbehältnis und das Perfusateservoir umgaben bzw. bildeten. Das venöse Perfusat wurde schließlich zur Bestimmung der Laborparameter in gewissen Perioden gesammelt (s. Kapitel 3.6).

Die Messvorrichtung für die linksventrikuläre Kontraktionskraft bestand aus einer Schlauch-Ballon-Kombination, die über eine Verzweigung Anschluss an ein höhenverstellbares und mit Aqua dest. gefülltes Überlaufgefäß hatte, mit welchem die Vorlast im Ballon durch Höhenverstellung auf 3mmHg einreguliert wurde. Mittels eines Zwei-Wege-Hahns konnte die Verbindung zu dem mit der Außenwelt kommunizierenden Überlauf geöffnet oder geschlossen und somit eine Wahl über den Kontraktionsmodus ermöglicht werden. Bei Öffnung des Zwei-Wege-Hahns konnte sich der Ballon entleeren und die Kontraktionen erfolgten auxoton, an-

denfalls war die Verbindung nach außen unterbrochen und es resultierten isovolumetrische Kontraktionen. Die Messeinheit hierfür, wie auch für die Druckmessung im Perfusionskatheter, bestand aus mechano-elektrischen Druckwandlern. Mit Beginn des Versuches wurde ein bipolares EKG angelegt, dessen Registrierung ebenso wie die der Kontraktionsamplitude, des Perfusionsdruckes und des Koronarflows auf einem Mehrkanalschreiber fortdauernd erfolgte.

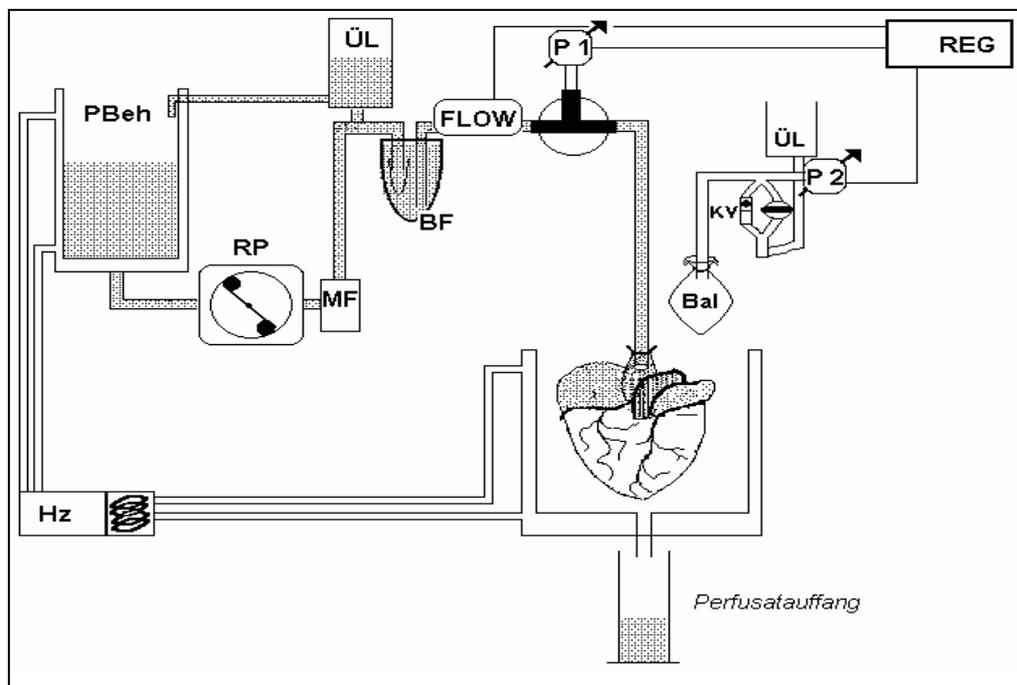


Abbildung 3-1: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus.

Bal - Latexballon (Hugo Sachs Elektronik KG, March; Größe 12, Volumen 1,3 ml); **BF** - Blasenfalle; **Flow** - Koronarflußmessung (Meßkopf: Blood Flow Transducer 300A, Fa. Empco[®], USA; Verstärker: Blood Flowmeter SP2202, Fa. Gould, USA); **HZ** - Thermopumpe (Thermomix UB, Fa. Braun, Melsungen); **KV** - Kugelventil; **MF**-Mikrofilter (Ultipor[®], Pall Biomedica, Portsmouth; Porengröße 40µm); **P1** - Perfusionsdruckmessung (Combitrans[®] Monitoring Set, Fa. Braun, Melsungen); **P2** - Linksventrikuläre Druckmessung (Combitrans[®] Monitoring Set, Fa. Braun, Melsungen); **Pbeh** - Perfusatbehältnis; **Reg** - Registrierung: Mehrkanal-EKG-Schreiber (Uniscript DU 210, Fa. Picker, München); **RP** - Pumpe: Schlauch-Rollen-Pumpe, Masterflex[®] 7566-10 (Cole & Parmer Instrument Co., Chicago, USA); **ÜL** – Überlaufgefäß

3.2 Präparation und Organentnahme

Nach Beendigung der Vorbereitung am Perfusionsmodell, dem Nullabgleich und der Kalibrierung der Druckabnehmer erfolgte die Narkoseeinleitung der Tiere mittels einer 1:1 verdünnten Pentobarbital-Natrium-Applikation (ca. 25mg Nembutal[®]/kg Körpergewicht; CEVA GmbH, Bad Segeberg) und die Koagulationsprophylaxe mit 1000 I.E. Heparin pro kg Körpergewicht, was der Applikation von 1 ml/kg KG einer 1:4 verdünnten Liquemin[®]-Lösung (Hoffmann-La Roche AG) entspricht. Beides geschah über eine mittels einer 25-G-Butterfly kanülierten Ohrvene. Darauf folgte die Umlagerung und Fixierung in Rückenlage.

Zur Vorbereitung der Tracheotomie wurden ca. 10 ml Lokalanästhetikum (Xylocain[®] 2%, Astra Chemicals GmbH, Wedel) subkutan infiltriert. Nach dem Hautschnitt und der Freipräparation der Trachea erfolgte die Tracheotomie ca. 0,4 cm unterhalb des Ringknorpels und die Kanülierung mit einem Kunststofftubus (I.D. 3,5mm), über den die kontinuierliche Beatmung mit Raumluft mittels einer Starlingpumpe (Fa. Braun, Melsungen) durchgeführt wurde.

Nach Vertiefung der Narkose bis zur Schmerzfreiheit mit Nembutal[®] erfolgte die Längsinzision des Abdomens und die Thoraxeröffnung durch Ablösen des Diaphragmas von den ventralen Abschnitten der Rippenbögen und durch mediane Sternotomie. Nun wurde stumpf der Thymus abpräpariert, perikardiotomiert und -reseziert, um die V. cava inferior et superior sowie die Aorta ascendens darzustellen.

Nach dem Abklemmen von V. cava superior et inferior wurde die Aorta ascendens kurz vor dem Arcus aortae quer inzidiert, um den Perfusionskatheter (I.D. 4 mm) einzubringen und zu fixieren, über den sodann, nach sorgfältiger Sicherstellung der Luftblasenfreiheit, die aortokoronare Injektion einer 4°C kalten kardioplegen Lösung nach Brettschneider (Custodiol[®], Dr. Köhler Chemie GmbH, Alsbach) erfolgte. Zur Gewährleistung des Abflusses wurden während der Injektion die Vena cava superior et inferior sowie die Venae pulmonales eröffnet. Nach Injektion von ca. 25-30 ml der kardioplegen Lösung erlosch die mechanische Herzaktivität und es konnte mit dem Herauslösen des Herz-Lungen-Paketes begonnen werden, welches daraufhin freihängend mit einer an einem Stativ befestigten Krokodilklemme fixiert wurde. Es folgte dann das Ablösen der Lungen und der Trachea sowie des umliegenden Bindegewebes und eine Inzision des linken Atriums, durch welche der noch zusammengefaltete Latexballon zur Druckmessung im linken Ventrikel positioniert wurde (siehe Abbildung 3-2). Unter Berücksichtigung auf Blasenfreiheit wurde nach dem Verbinden des Katheters mit dem Perfusionssystem das Herz an das EKG angeschlossen und nun retrograd mit einem Druck von $80 \pm 0,8$ mmHg perfundiert.

Anschließend folgte das Entfalten des Ballons und die Registrierung der auxotonen Kontraktionen in den ersten zehn Minuten der steady-state-Periode. Nach dieser Zeit wurde der Modus der Kontraktion geändert (isovolumetrisch) und bis zum Ende des Versuches beibehalten. Die gesamte Präparationszeit dauerte etwa 20 Minuten, wobei die Kardioplegiezeit durchschnittlich drei Minuten in Anspruch nahm.

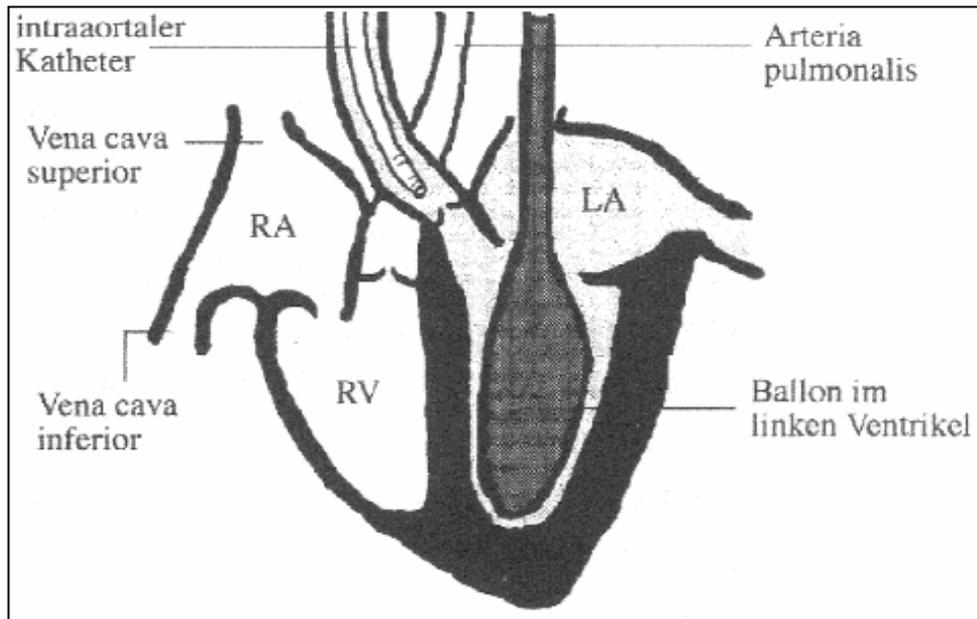


Abbildung 3-2: Schema des isoliert perfundierten Herzens.

3.3 Versuchstiere

Für die 75 Organentnahmen wurden Bastardkaninchen beiderlei Geschlechts mit einem Körpergewicht von 2,8 bis 3,4 kg verwendet. Die Tiere wurden von der Firma Behring-Werke Marburg parasitenfrei aufgezogen und waren durchschnittlich 5-6 Monate alt. Die Organentnahmen wurden dem Regierungspräsidium Gießen angezeigt und gemäß dem Tierschutzgesetz durchgeführt.

3.4 Verwendeter Calpain-Inhibitor

Eingesetzt wurde A-705239 (Firma BASF / Knoll, Ludwigshafen, BRD), ein synthetischer, wasserlöslicher Proteaseninhibitor (ketoamidisches Benzoylalaninderivat mit Aminovinylbenzylresten in P²/P³) mit guter Gewebe- und Membrangängigkeit, sowie hoher oraler Bioverfügbarkeit. MG = 421.5; Bindekonstanten $K_i=13,3 \pm 1,5$ nmol für Calpain I, 27 ± 6 und 22 ± 3 nmol für die Cathepsine B und L.

3.5 Perfusionsmedium

Als Perfusat wurde eine oxygenierte Krebs-Henseleit-HAES-Pufferlösung (KHHP) verwendet. Der jeweils frische Ansatz erfolgte durch Mischung von Hydroxyaethylstärke, Elektrolytlösung, 10%iger Glucose sowie der Zugabe von Natrium-Pyruvat. Mit 0,9%iger Natriumbikarbonatlösung wurde der pH-Wert auf 7,4 eingestellt und konnte während des Versuches durch variable Kohlenstoffdioxidbeimischung konstant gehalten werden. Die Temperatur im Perfusionssystem betrug 37,5°C. Der Sauerstoffpartialdruck lag zwischen 560 und 590 mmHg.

Elektrolyt- lösung	NaCl	CaCl ₂ ·2H ₂ O	KH ₂ PO ₄	MgCl ₂ ·6H ₂ O	KCl	Vol- % im Perf usat
	7,16g	1,75g	0,75g	1,35g	1,26g	
	Aqua dest. ad 1000 ml					21
Hydroxy- aethylstärke	HAES [®] -steril 10%, Fresenius, Bad Homburg					69
Glucose	Glucose [®] 10%, Fresenius, Bad Homburg					3
Natriumbi- karbonat	Natriumbikarbonat 0,9%, Fresenius, Bad Homburg					7
Pyruvat	Pyruvat-Natrium-Salz (C ₃ H ₃ O ₃ Na); 1g pro Liter Perfusat					

Endkonzentrationen im Perfusat (in mmol/l):

Na ⁺	Cl ⁻	K ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺
38	110,8	4,5	2,38	1,33
PO ₄ ³⁻	Pyruvat	HCO ₃ ⁻	Glucose	
1,10	10,0	~24	2,5 g/l	

3.6 Versuchsgruppen und Versuchsablauf

Die insgesamt 75 auszuwertenden Versuche verteilten sich auf neun Versuchsgruppen. Versuche, die in der steady-state-Periode (den ersten 15 Minuten) Kontraktionsamplituden von 60mmHg nicht erreichten, wurden von der Auswertung ausgeschlossen.

Die ersten vier Versuchsserien untersuchten die konzentrationsabhängige Wirkung des Calpaininhibitors (CIH) auf hämodynamische und Nekrose-anzeigende Parameter nach einer Ischämiephase von 45 Minuten und anschließender Reperfusion von 60 Minuten. Hierzu wurde das Perfusat vor Versuchsbeginn mit dem Inhibitor (CIH) in drei verschiedenen Konzentrationen inkubiert. Durch Unterbrechung der Perfusatzufuhr nach Ablauf der steady-state-Periode wurde eine globale Ischämie des Herzens erzeugt. Versuchsgruppe 1 diente als Kontrollgruppe.

Versuchsgruppe 1	n=10	45 min Ischämie, 60 min Reperfusion	Kontrollversuche ohne CIH
Versuchsgruppe 2	n=10	45 min Ischämie, 60 min Reperfusion	CIH 10^{-8} mol pro Liter Perfusat
Versuchsgruppe 3	n=10	45 min Ischämie, 60 min Reperfusion	CIH 10^{-7} mol pro Liter Perfusat
Versuchsgruppe 4	n=10	45 min Ischämie, 60 min Reperfusion	CIH 10^{-6} mol pro Liter Perfusat

In den folgenden Versuchsgruppen 5 und 6 wurde der Calpaininhibitor in den Konzentrationen von 10^{-8} und 10^{-6} mol pro Liter Perfusat eingesetzt, allerdings wurde das Herz keiner Ischämie ausgesetzt. Die reine Perfusionszeit verlängerte sich also hier um 45 Minuten. Versuchsgruppe 7 diente als Kontrollgruppe.

Versuchsgruppe 5	n=6	Keine Ischämie	CIH 10^{-8} mol pro Liter Perfusat
Versuchsgruppe 6	n=6	Keine Ischämie	CIH 10^{-6} mol pro Liter Perfusat
Versuchsgruppe 7	n=6	Keine Ischämie	Kontrollversuche ohne CIH

In den Versuchsserien 8 und 9 wurden Gewebeproben des linken Ventrikels gewonnen, um die mitochondriale Respiration vor Ischämie, nach Ischämie und nach Reperfusion unter CIH-Einfluß zu untersuchen. Die Biopsien wurden nach Ablauf der steady-state-Periode (Biopsie A), nach Ablauf der Ischämie (Biopsie B) und nach der Reperfusion (Biopsie C) vorgenommen. Um nur einen Versuch für zwei zeitlich versetzte Gewebeentnahmen ausnutzen zu können, erfolgte die erste Biopsie nach Ligatur des Ramus interventricularis anterior und Ramus posterior ventriculi sinistri durch Exzision des von der Ligatur distalen Areals (ca. $0,7 \text{ cm}^2$). Die zweite Biopsie (B oder C) wurde dann proximal der Ligatur, entweder nach der Ischämiephase oder nach der Reperusionsphase entnommen.

Versuchsgruppe 8	n=8	45 min Ischämie, 60 min Reperfusion, Biop- sien A, B und C	Kontrollversuche ohne CIH
Versuchsgruppe 9	n=9	45 min Ischämie, 60 min Reperfusion, Biop- sien A, B und C	CIH 10^{-8} mol pro Liter Perfusat

3.7 Versuchsmonitoring

3.7.1 Hämodynamische Parameter

Die Messung der hämodynamischen Parameter Herzfrequenz (hf; Schläge/min), linksventrikulärer systolischer und diastolischer Druck (P_{sys} bzw. P_{dia} ; mmHg), Koronarperfusion (flow; ml/min) und Perfusionsdruck (ap; mmHg) erfolgte kontinuierlich und wurde auf einem Mehrkanal-EKG-Schreiber (Uniscript DU 210, Fa. Picker, München) registriert. Nach Versuchsende wurden diese Aufzeichnungen zu vorgegebenen Zeitpunkten ausgewertet und auf einen PC übertragen. Durch Wiegen des Herzens nach Versuchsende, den Daten der Kontraktionsdrücke, der Koronarperfusion und des Perfusionsdruckes wurde mit folgenden Formeln der koronare Gesamtwiderstand (Koronarresistenz w_{cor}) sowie die Kontraktionsamplitude (amp) berechnet:

- *Koronardurchblutung pro Gramm Herzgewicht (flq):*

$$\text{flq} = \frac{\text{flow}}{\text{hw}} \left[\frac{\text{ml}}{\text{min} \cdot \text{g}} \right]$$

- *Koronarer Gesamtwiderstand (Koronarresistenz w_{cor}):*

$$w_{\text{cor}} = \frac{\Delta p}{\Phi} = \frac{\text{ap}}{\text{flq}} \left[\frac{\text{mmHg} \cdot \text{min} \cdot \text{g}}{\text{ml}} \right]$$

- *Linksventrikuläre Kontraktionsamplitude (amp):*

$$\text{amp} = P_{\text{sys}} - P_{\text{dia}} \quad [\text{mmHg}]$$

- *Relative Linksventrikuläre Kontraktionsamplitude (amp%):*

$$\text{amp}\% = (\text{amp} \times 100) / \text{ampMW10-15}^* [\%]$$

* wobei AmpMW10-15 aus den Mittelwerten der linksventrikulären Kontraktionsamplituden (10 und 15 min nach Versuchsbeginn) in der steady-state-Phase ermittelt wurde.

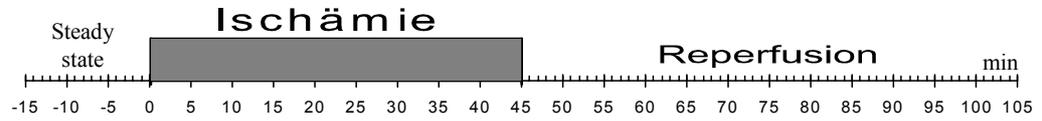
3.7.2 Nekrose-anzeigende Parameter LDH und CK

Um die Nekroseparameter LDH und CK zu bestimmen, wurden dem venösen Perfusat der Versuchsgruppen 1–7 in fest definierten Intervallen (siehe Abbildung 3-3) Proben entnommen und diese bis zur Bestimmung in Eppendorff-Hütchen bei -4°C aufbewahrt. Die photometrische Analyse der Proben wurde durch das Institut für klinische Chemie der Justus-Liebig-Universität Gießen, Leiter Prof. Katz, nach den Empfehlungen der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie durchgeführt.

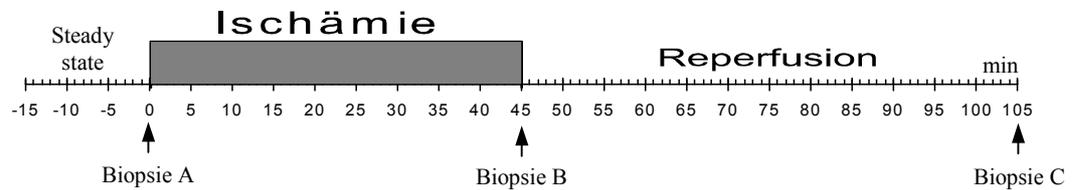
3.7.3 pH, pCO₂, pO₂, Temperatur

Zur Konstanthaltung des Sauerstoffpartialdruckes (pO₂) und des pH während des gesamten Versuches wurde das Perfusat in regelmäßigen Abständen überwacht. Dazu wurden dem Perfusat präkardial Proben entnommen und mittels eines Säure-Basen-Analysators (ABL 2 Radiometer, Kopenhagen) pO₂, pCO₂ und pH gemessen. Durch Zugabe von CO₂ und O₂ über den Bubbler im Perfusatresevoir konnten diese Werte bei Bedarf nachreguliert werden. Die Perfusatemperatur ($37,5^{\circ}\text{C}$) konnte über die Thermopumpe (Thermomix UB, Fa. Braun, Melsungen) eingestellt werden und wurde ebenfalls in regelmäßigen Intervallen mit einem digitalen Thermometer gemessen.

(1) Versuchsgruppen 1-4



(2) Versuchsgruppen 8 und 9,
Biopsieentnahmen



(3) Perfusatsammelperioden in den
Gruppen 1-6

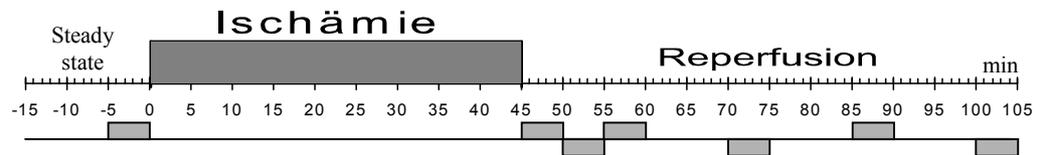


Abbildung 3-3: Zeitplan der Versuchsgruppen 1-4, Entnahmezeiten der Biopsien in den Versuchsgruppen 8 und 9 sowie Sammelperioden zur Bestimmung von CK und LDH im venösen Perfusat der Gruppen 1-6

3.8 Mitochondriale Oxymetrie

Um Schädigungen auf mikrozellulärer Ebene durch Ischämie und/oder Reperfusion aufzudecken, wurden Herzmuskelbiopsien vor der Ischämiephase, direkt danach und nach der Reperfusionsphase gewonnen (s. Kapitel 3.6). Mittels respirometrischer Untersuchungen ist es möglich, durch geeignete Kombination verschiedener Substrate (u.a. Pyruvat und Succinat) mit Hemmstoffen die gesamte Funktion der Mitochondrien zu untersuchen und somit Störungen im Energiestoffwechsel aufzudecken.

Hierzu wurde das Biopsat (etwa 100 mg) direkt nach der Präparation in einer auf Eis stehenden und mit frischem Storage-Puffer (s.u.) gefüllten Petrischale mittels Schere und Pinzetten sorgfältig in einzelne Fasern zerteilt. Dieses Präparat wurde dann über Nacht in Storage-Puffer auf Eis durch einen Kurierdienst in das Muskellabor der Neurologischen Universitätsklinik Halle-Wittenberg, Leitung Priv. Doz. Dr. F.N. Gellerich, verschickt, wo die respirometrischen Messungen erfolgten.

Dort wurden nach erneuter Präparation und Permeabilisierung der Muskelfasern nach der sog. „skinned fiber“-Technik nach Veksler et al. (106) durch das milde Detergenz Saponin die mitochondriale Atmungsgeschwindigkeiten für die Substrate Pyruvat und Malat im Oxygraphen OROBOROS[®] der Firma Anton PAAR (Graz, Österreich) gemessen (Einheit: nmol O₂/min/mg) und registriert. In mehreren Versuchen war zuvor belegt worden, dass die Lagerungszeiten in der Storage-Pufferlösung nach Präparation bis zu 30 Stunden betragen können, ohne dass die mitochondriale Funktion dadurch Einbußen nimmt (106).

Zusammensetzung des Storage Puffer:

(Das Medium wurde bis zur Verwendung bei -18°C gelagert; die gepufferte Ca^{2+} -Konzentration betrug $0,1 \mu\text{mol/l}$.)

MES	KH₂PO₄	Taurin	Dithiothreitol	Imidazol
49 mM	3 mM	20 mM	0.5 mM	20 mM
MgCl₂	ATP	CrP	K₂-Ca-EGTA	K-EGTA
9,5 mM	5,2 mM	15 mM	1,9 mM	8,1 mM
pH	7,1			

3.8.1 Testverfahren zur Überprüfung der Intaktheit der mitochondrialen Innenmembran

Messung der Maximalatmung (state-3) und der Ruheatmung (state-4):

Nach dem Aufarbeiten der Muskelfasern wurden diese den Substraten Pyruvat / Malat zugesetzt, was den Sauerstoffverbrauch nur geringfügig erhöhte; die Stimulation der mitochondrialen Atmung erfolgte durch Zugabe von anorganischem Phosphat und ADP im Überschuss (5 mM), das mit Hilfe des Adn-Translokators im Austausch gegen mitochondrial gebildetes ATP in den Matrixraum transportiert und dort sofort phosphoryliert wird. Hierbei erhöht sich der Sauerstoffverbrauch maximal, welches als ein Indiz für die maximal mögliche Kapazität der an der Atmungskette beteiligten Enzyme des Mitochondriums gelten kann (state-3-Atmung). Durch Zugabe von Atractylat (1,8 mM) kann spezifisch der Adn-Translokator gehemmt werden, so dass durch das Fehlen von ADP im mitochondrialen Matrixraum der Sauerstoffverbrauch limitiert wird und sich die Ruheatmung (state-4-Atmung) einstellt.

Messung der Leak-Atmung:

Darauf erfolgte die Zugabe von Antimycin A (46 μM), das selektiv den Elektronentransport am Komplex III der Atmungskette unterbricht. Aus der Differenz zwischen der state-4-Atmung und der Antimycin-resistenten Atmung erhält man die Leak-Atmung, die Informationen über Permeabilitätsänderungen in der mitochondrialen Innenmembran gewährt.

Berechnung des respiratorischen Kontrollquotienten (RCI):

Der respiratorische Kontrollquotient errechnet sich als Quotient aus State-3- und State-4-Atmung; er quantifiziert die Kopplung zwischen Substratoxidation und ATP-Bildung. Schädigungen der Innenmembran ermöglichen einen Rückfluss von Protonen vom Intermembranraum zurück in den Matrixraum ohne Beteiligung an der ATP-Synthese (state-4-Atmung erhöht, damit Quotient kleiner).

3.8.2 Testverfahren zur Überprüfung der Intaktheit der mitochondrialen Außenmembran

Cytochrom-c-Test

Das Prinzip dieses Tests beruht darauf, daß Cytochrom-c als wichtiges Enzym der Atmungskette reversibel an der Außenseite der mitochondrialen Innenmembran gebunden ist. Normalerweise verhindert die intakte Außenmembran ein Entfernen des Cytochrom-c. Bei Auftreten von Leaks in der Außenmembran kann es das Mitochondrium verlassen, und es kommt zu einer Verminderung der maximalen (state-3-)Atmungsraten, die durch Zusatz von exogenem Cytochrom-c behoben werden kann. Ein Leak in der Außenmembran würde sich hierbei als Atmungsgeschwindigkeitsanstieg

nach exogener Cytochrom-c-Zugabe darstellen. Als Maß für die Intaktheit der Außenmembran wurde der Quotient der beiden Atmungsgeschwindigkeiten vor und nach Zusatz von Cytochrom-c gewählt. Ein steigender Quotient zeigt somit eine Beschädigung der Außenmembran an.

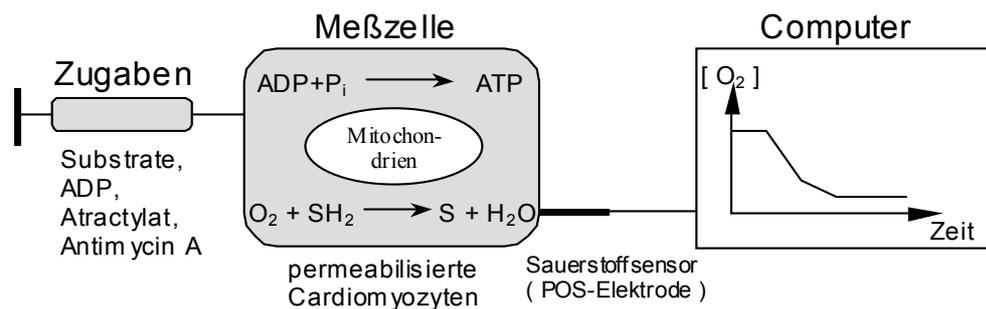


Abbildung 3-4: Schematische Darstellung der respirometrischen Untersuchung der Mitochondrienfunktion.

3.9 Statistik

Die statistische Analyse der Ergebnisse wurde mit Hilfe des Programmes Statgraphics-Plus[®] erstellt. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte und die Standardabweichung der Mittelwerte (SEM). Im Rahmen der statistischen Analyse wurde in bezug auf Unterschiede zwischen den Gruppen die einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) mit nachfolgendem t-test für ungepaarte Stichproben durchgeführt. Das Signifikanzniveau dieser Studie beträgt $p \leq 0,05$. Zur Evaluierung eines Unterschiedes in den Überlebensraten zwischen der behandelten und der Kontrollgruppe diente der exakte Test nach Fisher.

4 Ergebnisse

4.1 Versuche mit globaler „no-flow“-Ischämie

4.1.1 Parameter der Hämodynamik

Im angewandten Modell des isoliert-perfundierten Kaninchenherzens diente Versuchsgruppe 1 als Kontrollversuchsreihe ohne den Einsatz des Calpaininhibitors bei einer Ischämiezeit von 45 Minuten. Hierbei lagen zu Beginn der Versuche (Zeitpunkt $t=0$) die Mittelwerte der auxotonen linksventrikulären Druckamplitude (amp) bei $80,3 \pm 4,3$ (SE) mmHg und der relativen Druckamplitude (amp%) bei $98,4 \pm 0,8$ %. Der aus Koronarfluß, Perfusionsdruck und Herzgewicht berechnete Koronarwiderstand (w_{cor}) lag bei $3,61 \pm 0,39$ mmHg x min x 10g x ml⁻¹ und die der Herzfrequenz (hf) bei $155 \pm 15,7$ min⁻¹. Die Varianzanalyse (ANOVA) ergab für obige Messparameter zwischen den einzelnen Versuchsgruppen (VG 1-4) keinen signifikanten Unterschied ($p>0,05$) zu Versuchsbeginn, so dass hier von einer gleichen Grundgesamtheit ausgegangen werden kann und die Betrachtung von relativen Veränderungen durch Gruppenvergleich möglich ist.

	amp [mmHg]	amp %	w_{cor} [mmHg x min x 10g x ml ⁻¹]	hf [min ⁻¹]
VG 1 Kontrolle	$80,3 \pm 4,3$	$98,4 \pm 0,8$	$3,61 \pm 0,39$	$155,0 \pm 15,7$
VG 2 CIH 10 ⁻⁸ mol/l	$99,3 \pm 8,2$	$101,3 \pm 1,5$	$3,32 \pm 0,34$	$149,1 \pm 13,9$
VG 3 CIH 10 ⁻⁷ mol/l	$67,3 \pm 8,3$	$100,9 \pm 1,5$	$3,59 \pm 0,47$	$170,1 \pm 9,8$
VG 4 CIH 10 ⁻⁶ mol/l	$69,9 \pm 7,9$	$97,6 \pm 1,6$	$2,64 \pm 0,23$	$191,5 \pm 6,4$

Tabelle 4.1-1: Hämodynamikparameter nach Ablauf der „steady-state“-Phase (t=0)

Die entsprechenden Werte sind in Tabelle 4-1.1 dargestellt. Hierbei ist außerdem zu beachten, dass im Versuchsmodell der Aortenperfusiondruck (ap) bei $80 \pm 4,4$ mmHg konstant gehalten wurde.

In VG 1 (Kontrollgruppe) ergab sich bis zum Versuchsende im Mittel eine relative Abnahme der isovolumetrischen Druckamplitude auf $37,3 \pm 10$ (SEM) %, eine Zunahme der Koronarresistenz auf $9,92 \pm 3,72$ mmHg x min x 10g x ml⁻¹ und ein Abfall der Herzfrequenz auf 111 ± 20 min⁻¹. Auffällig in dieser Gruppe ist die vorzeitige Abbruchrate von insgesamt sieben Herzen innerhalb von 15 Minuten nach Beginn der Reperfusionphase durch Asystolie, Kammerflimmern oder ischämische Kontraktur.

In VG 2 (CIH 10⁻⁸ mol/l) blieben neun Herzen bis zum Versuchsende funktionell unauffällig, in den beiden anderen Versuchsserien (VG 3 und VG 4, CIH 10⁻⁷ bzw. 10⁻⁶ mol/l) schieden jeweils sechs Herzen im Verlauf der Reperfusionphase aus der Bewertung aus.

	amp [mmHg]	amp %	wcor [mmHg x min x 10g x ml ⁻¹]	hf [min ⁻¹]
VG 1 Kontrolle	$28,5 \pm 13,5$	$37,3 \pm 10,1$	$9,92 \pm 3,72$	$111,0 \pm 20,0$
VG 2 CIH 10-8 mol/l	$45,0 \pm 9,2$	$46,9 \pm 10,0$	$7,05 \pm 1,32$	$128,4 \pm 15,5$
VG 3 CIH 10-7 mol/l	$24,0 \pm 10,4$	$27,1 \pm 9,0$	$11,36 \pm 3,29$	$127,0 \pm 24,7$
VG 4 CIH 10-6 mol/l	$21,8 \pm 10,3$	$27,3 \pm 13,1$	$8,16 \pm 1,57$	$140,7 \pm 37,4$

Tabelle 4.1-2: Hämodynamikparameter nach Ablauf der Reperfusion-Phase (t=105)

4.1.1.1 Relative linksventrikuläre Kontraktionsamplitude

Die relative linksventrikuläre Kontraktionsamplitude (amp%) erreichte in VG 2 (CIH 10^{-8} mol/l) postischämische Spitzenwerte von 127 ± 8 % des Ausgangswertes und stabilisierte sich dann mit Werten zwischen 46 ± 10 bis 55 ± 10 % bis zum Versuchsende. VG 3 (CIH 10^{-7} mol/l) zeigte postischämische Spitzen bis 101 ± 12 %, und die vier überlebenden Herzen hatten am Ende relative Drücke von 27 ± 9 %. In VG 4 (CIH 10^{-6} mol/l) wurden Spitzen bis 95 ± 16 % kurz nach Beginn der Reperfusion erreicht; die vier überlebenden Herzen entwickelten noch relative Drücke von 27 ± 13 % am Ende des Versuches. Die nachfolgend graphische Darstellung zeigt diese Ergebnisse im Überblick:

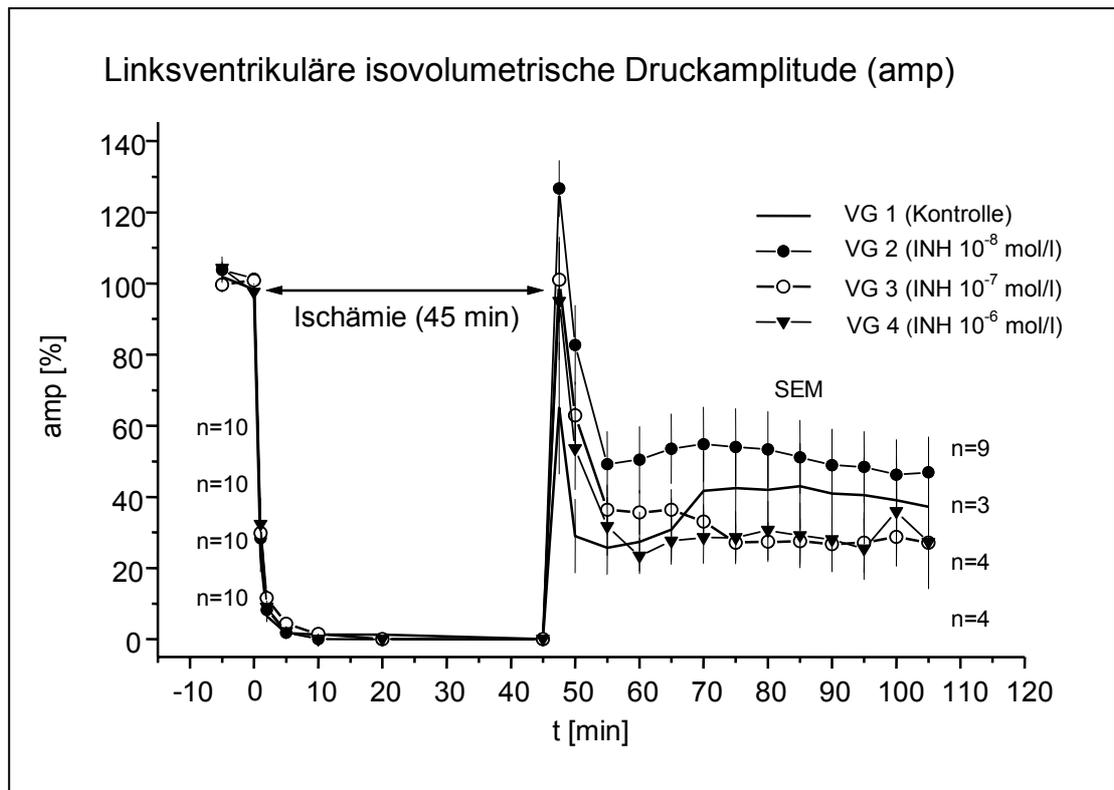


Abbildung 4.1-1: Relative systolische Druckamplitude im Verlauf der Versuchszeit in Prozent des Basalwertes (Mittelwerte der Zeitpunkte $t=-5$ und $t=0$). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes.

Ein Vergleich der vier Versuchsgruppen bezüglich der relativen Kontraktionsamplitude (siehe Abbildung 4.1-1) in der Reperfusionsphase (45.–105. Minute) ergibt einen signifikanten Unterschied ($p < 0,01$) zwischen der Kontrollgruppe (VG 1) und der mit in der Konzentration 10^{-8} mol/l CIH behandelten Gruppe (VG 2). Ebenfalls signifikante Unterschiede ergaben sich bei dem Vergleich der Versuchsgruppe VG 2 mit VG 3 (CIH 10^{-7} mol/l; $p < 0,05$) und VG 4 (CIH 10^{-6} mol/l; $p < 0,01$). Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und den Gruppen mit der höherdosierten Inhibitorkonzentration (VG 3 und VG 4), sowie zwischen den beiden Gruppen konnten nicht aufgedeckt werden.

4.1.1.2 Koronarer Gesamtwiderstand (w_{cor})

Der koronare Gesamtwiderstand lag in VG 2 (Calpaininhibitor in der Konzentration 10^{-8} mol/l) postischämisch bei Werten von $2 \pm 0,12$ mmHg x min x $10g \times ml^{-1}$ und stieg im Verlauf der Reperfusion stetig bis auf $7 \pm 1,3$ mmHg x min x $10g \times ml^{-1}$ an. Die Versuchsgruppen 3 (CIH 10^{-7} mol/l) und 4 (CIH 10^{-6} mol/l) stiegen postischämisch von Werten von $2,7 \pm 0,2$ bzw. $2,6 \pm 0,3$ mmHg x min x $10g \times ml^{-1}$ auf Werte zwischen 8 und 11 mmHg x min x $10g \times ml^{-1}$ nach der Reperfusion an (siehe Tabelle 4.1-2 und Abbildung 4.1-2).

Für die Versuchsgruppe 2 (CIH 10^{-8} mol/l) ergibt sich ein hochsignifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe ($p < 0,01$); die niedrigeren Werte zeigen hier eine deutlich geringere Verlegung des koronaren Stromgebietes an. Vergleiche zwischen VG 3 (CIH 10^{-7} mol/l) und VG 4 (CIH 10^{-6} mol/l) zur Kontrollgruppe VG 1 zeigten keine signifikanten Unterschiede.

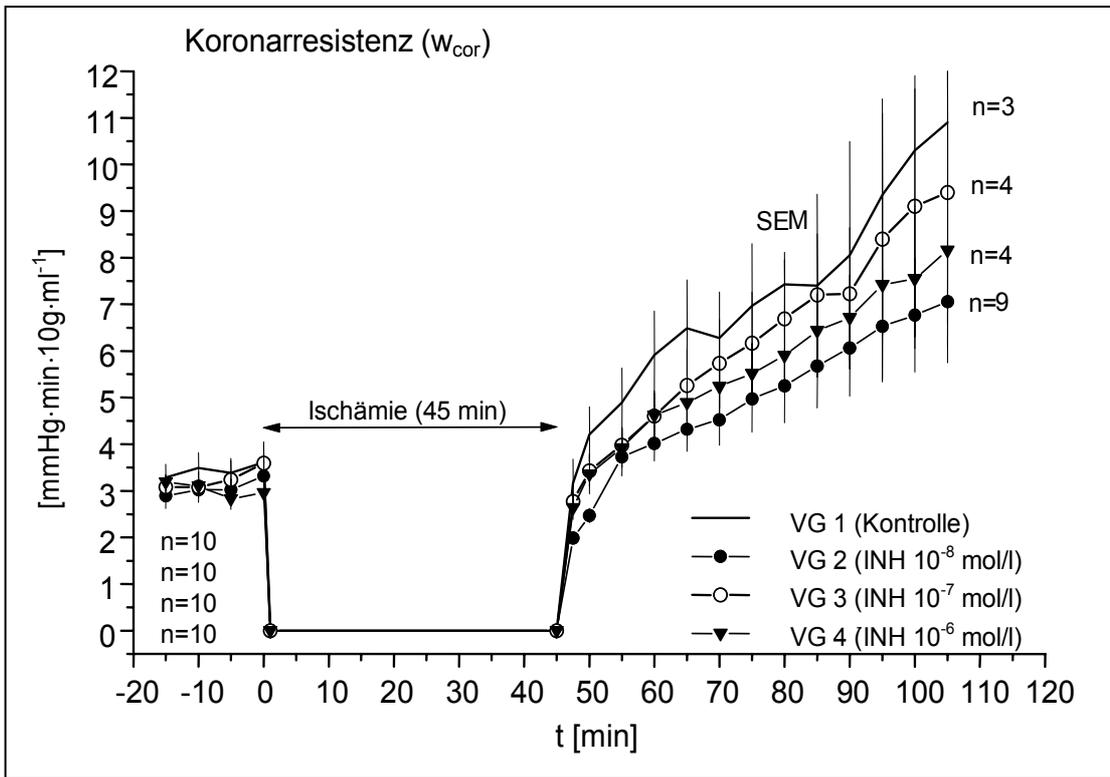


Abbildung 4.1-2: Koronarer Widerstand im Verlauf der Versuchszeit der Versuchsgruppen VG 1-4. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes.

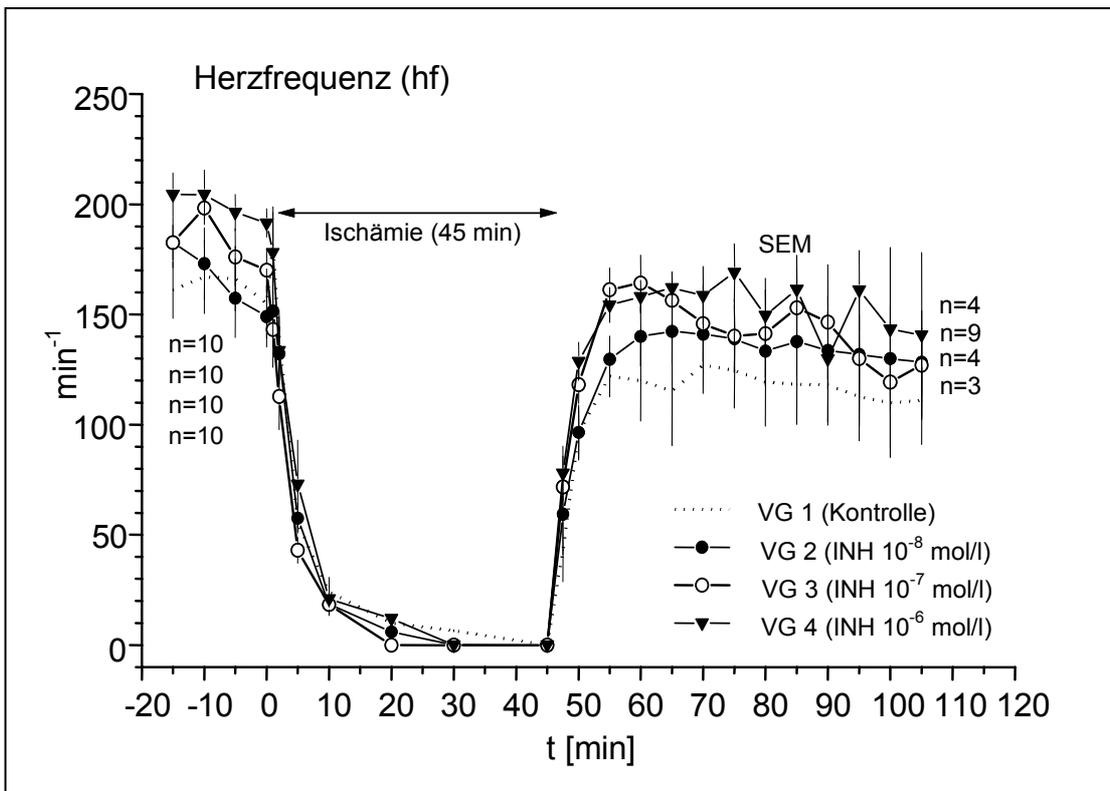


Abbildung 4.1-3: Herzfrequenz im Verlauf der Versuchszeit der Versuchsgruppen VG 1-4. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes.

4.1.1.3 Herzfrequenz (hf)

Bei den Gruppenvergleichen hatten die Werte der Herzfrequenz in den Gruppen VG 3 (CIH 10^{-7} mol/l) und VG 4 (CIH 10^{-6} mol/l) über den Zeitraum der Reperfusion eine signifikant höhere Tendenz ($p < 0,01$) als die Werte der Kontrollgruppe. Die Herzfrequenz der Gruppe VG 2 (CIH 10^{-8} mol/l) stellte sich als signifikant niedriger gegenüber den Werten der Gruppe VG 4 (CIH 10^{-6} mol/l) heraus. Alle anderen Vergleiche zeigten keine Unterschiede unterhalb des Signifikanzniveaus (siehe Abbildung 4.1-3).

4.1.2 Nekroseanzeigende Enzyme

Die dem Effluvium entnommenen Proben zur Quantifizierung einer kardiomyozytären Schädigung anhand der Laktatdehydrogenase und Kreatinphosphokinase zeigten präischämisch im Gruppenvergleich keine relevanten Unterschiede. In der Kontrollgruppe betrug die venöse Freisetzung der CK präischämisch 21 ± 8 U/l, die der LDH 51 ± 2 U/l; nach Ablauf der Reperfusion stiegen diese Werte auf 166 ± 49 U/l (CK), respektive 118 ± 20 U/l (LDH) an.

4.1.2.1 Kreatinphosphokinase (CK)

Die Freisetzung der CK in VG 2 (CIH 10^{-8} mol/l) stieg von präischämisch 11 ± 3 U/l auf nur 44 ± 10 U/l nach Ablauf der Reperfusion an. Die Enzymaktivitäten der anderen Gruppen waren deutlich höher (siehe Abbildung 4.1-4). Ein Vergleich der Gruppen in der Reperusionsphase zeigte eine signifikant niedrigere Freisetzung der CK in der mit 10^{-8} mmol/l CIH-behandelten Gruppe (VG 2) gegenüber der Kontrollgruppe (VG 1; $p < 0,05$), sowie gegenüber der mit 10^{-6} mmol/l CIH-behandelten Gruppe (VG 4; $p < 0,01$).

Die Vergleiche der anderen Gruppen untereinander ergaben keine Unterschiede unterhalb des Signifikanzniveaus.

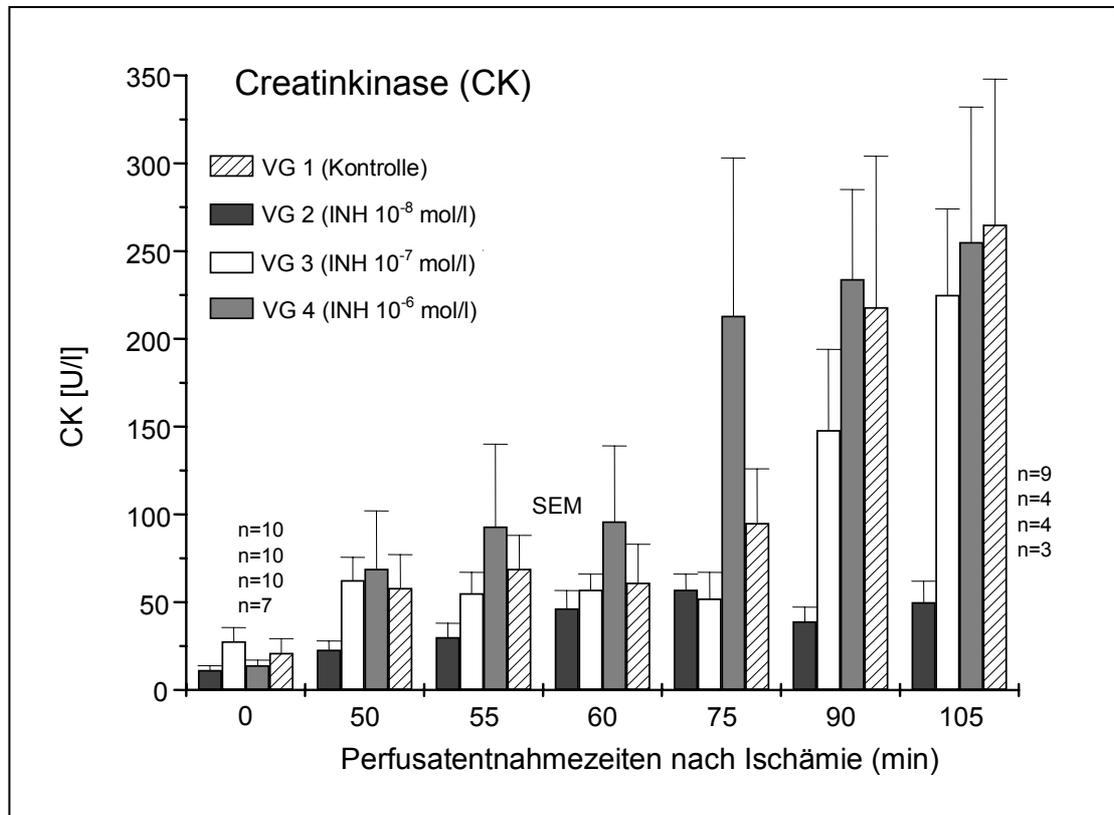


Abbildung 4.1-4: Enzymaktivitäten der Kreatinkinase zu den entsprechenden Sammelzeitpunkten (jeweils 5 Minuten). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM.

4.1.2.2 Laktatdehydrogenase (LDH)

Die postischämische Freisetzung der LDH im Effluvium der Versuchsgruppe VG 2 stieg von 47 ± 1 U/l auf nur 63 ± 4 U/l nach Ablauf der Reperfusion an (siehe Abbildung 4.1-5). Die Gruppenvergleiche zeigten einen signifikant niedrigeren Anstieg der LDH-Aktivitäten der Versuchsgruppe 2 (CIH in der Konzentration 10^{-8} mmol/l) verglichen mit der Kontrollgruppe VG 1 ($p < 0,05$), VG 3 ($p < 0,05$) und VG 4 ($p < 0,01$). Die anderen Vergleiche zeigten keine Unterschiede.

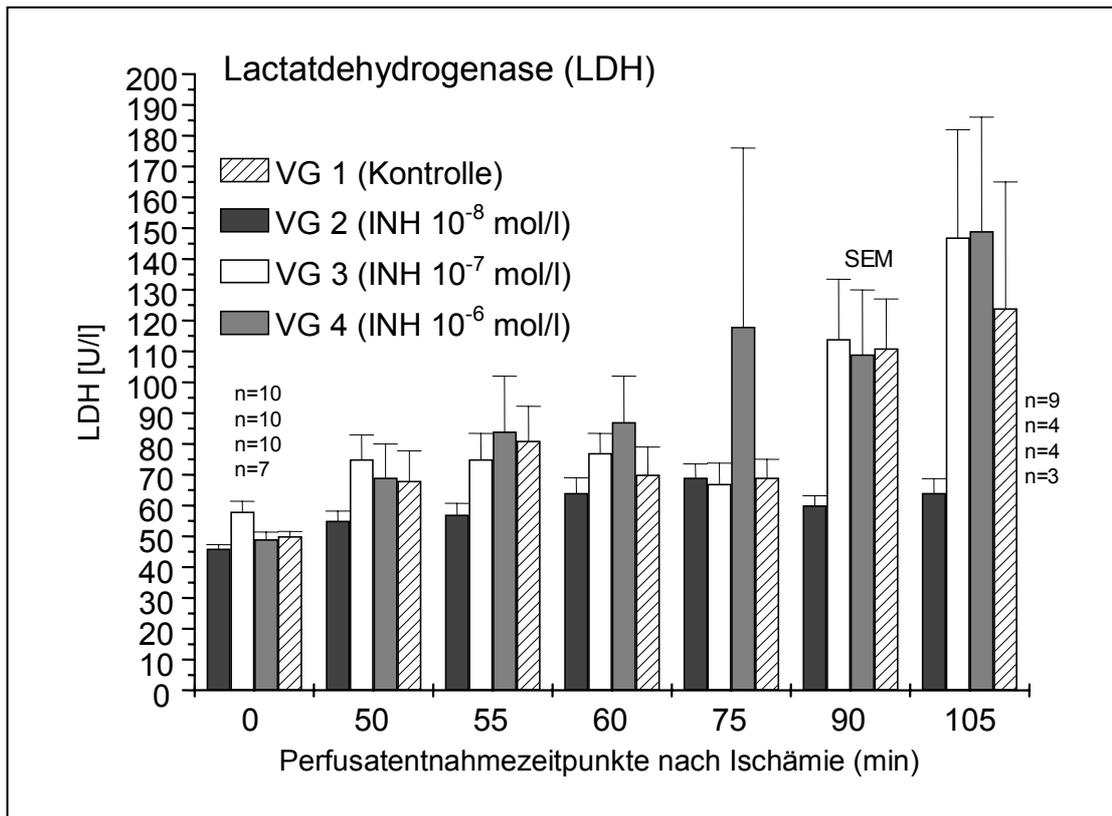


Abbildung 4.1-5: Enzymaktivitäten der Laktatdehydrogenase zu den entsprechenden Sammelperioden (jeweils 5 Minuten). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM.

4.2 Versuche ohne Ischämie

Wie oben demonstriert entwickelte A-705239 in der Konzentration von 10^{-6} mmol/l in den Ischämie-/Reperfusionversuchen auffallend schlechte Resultate. Um aufzudecken, ob der Einsatz des Inhibitors in der höheren Konzentration negative funktionelle Auswirkung hat, wurden Versuche ohne Ischämiephase durchgeführt mit Einsatz des Inhibitors in den Konzentrationen 10^{-8} (VG 5) und 10^{-6} mol/l (VG 6); die Ergebnisse wurden untereinander und mit der Kontrollgruppe (VG 7, ohne Substanzzusatz) verglichen.

4.2.1 Parameter der Hämodynamik

4.2.1.1 Relative linksventrikuläre Kontraktionsamplitude

Die Werte der relativen Kontraktionsamplitude (amp%) lagen zum Zeitpunkt $t=0$ in VG 5 (CIH 10^{-8} mol/l) bei $99 \pm 1\%$, in VG 6 (CIH 10^{-6} mol/l) bei $99 \pm 2\%$ und nahmen im Verlauf des Versuches auf Werte von $41 \pm 3\%$ bzw. $28 \pm 3\%$ ab (siehe Abbildung 4.2-1). Die Kontrollwerte lagen anfangs bei $99 \pm 1\%$ und fielen auf $51 \pm 5\%$. Im Gruppenvergleich ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zu Versuchsbeginn. In VG 6 (CIH 10^{-6} mol/l) schied ein Herz zum Zeitpunkt $t = 80$ min wegen Kammerflimmern aus der Auswertung aus. Signifikant schlechter waren die Druckamplituden von VG 6 (CIH 10^{-6} mol/l) im Vergleich zu VG 5 (CIH 10^{-8} mol/l) und zur Kontrolle (VG 7; $p < 0,01$).

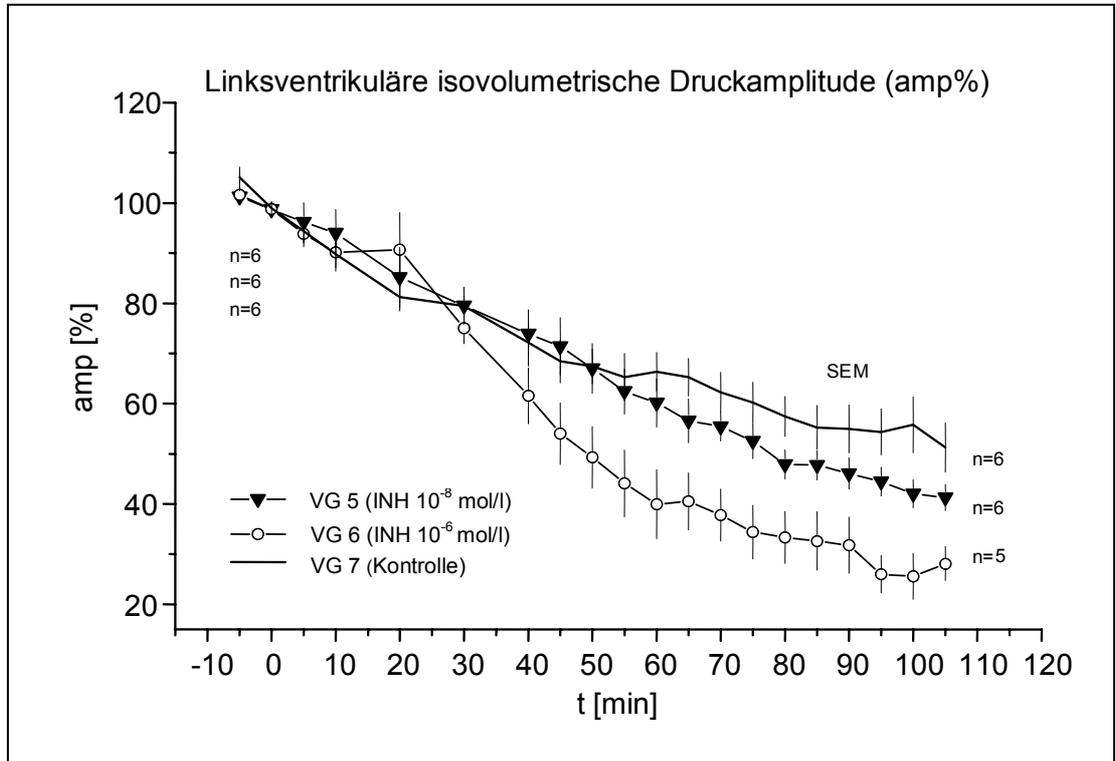


Abbildung 4.2-1: Relative linksventrikuläre Kontraktionsamplitude im Verlauf der Versuchszeit ohne Ischämiephase in den Versuchsgruppen VG 5-7. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM.

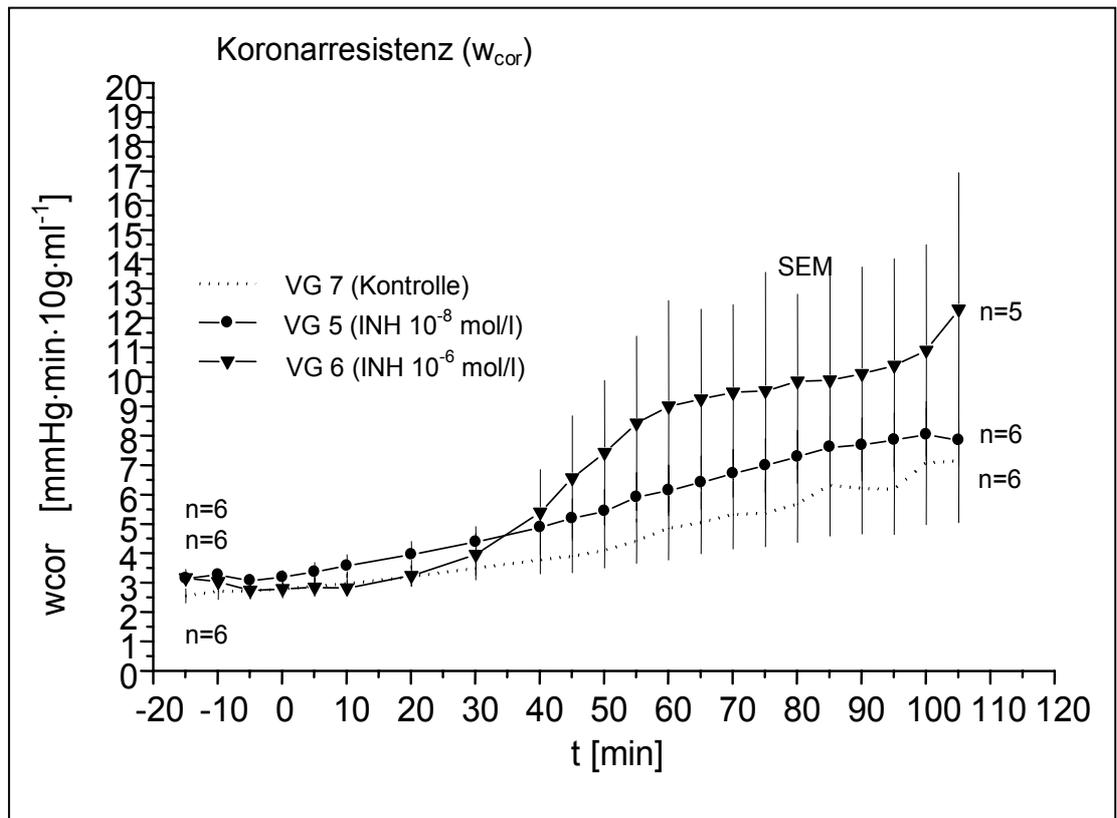


Abbildung 4.2-2: Koronarresistenz im Verlauf der Versuchszeit ohne Ischämiephase in den Versuchsgruppen VG 5-7. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM.

4.2.1.2 Koronarer Gesamtwiderstand (w_{cor})

Der koronare Gesamtwiderstand stieg in der Kontrollgruppe (VG 7) von $2,8 \pm 0,3 \text{ mmHg} \times \text{min} \times 10\text{g} \times \text{ml}^{-1}$ auf $7,1 \pm 2,1 \text{ mmHg} \times \text{min} \times 10\text{g} \times \text{ml}^{-1}$ in der Kontrollgruppe an. In VG 6 (CIH 10^{-6} mol/l) erreichte er gegen Ende des Versuches $12,3 \pm 4,7 \text{ mmHg} \times \text{min} \times 10\text{g} \times \text{ml}^{-1}$, in VG 5 (CIH 10^{-8} mol/l) nur $7,8 \pm 0,9 \text{ mmHg} \times \text{min} \times 10\text{g} \times \text{ml}^{-1}$ (siehe Abbildung 4.2-2). Der Anstieg in VG 6 (CIH 10^{-6} mol/l) war im Vergleich zu VG 5 (CIH 10^{-8} mol/l) und VG 7 signifikant höher ($p < 0,05$).

4.2.1.3 Herzfrequenz (hf)

Die Herzfrequenz (siehe Abbildung 4.2-3) zeigte bei der Anwendung von A-705239 in der Konzentration von 10^{-8} mol/l (VG 5) die niedrigsten Werte nach Ablauf der Versuchszeit ($97 \pm 22 \text{ min}^{-1}$); jedoch konnten zwischen den Gruppen keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

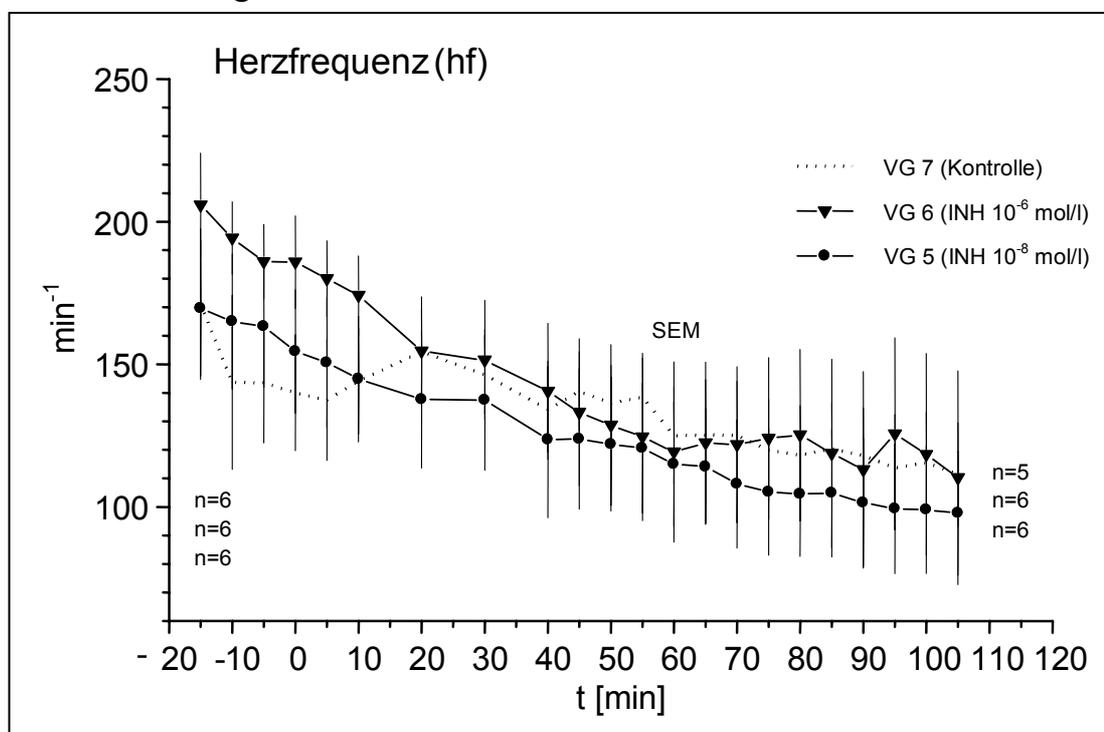


Abbildung 4.2-3: Herzfrequenz im Verlauf der Versuchszeit ohne Ischämiephase in den Versuchsgruppen VG 5-7. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM.

4.2.2 Nekroseanzeigende Enzyme

4.2.2.1 Kreatinkinase (CK)

Die Aktivität der CK zu Anfang des Versuches lag im Mittel bei 44 ± 13 U/l in VG 5 (CIH 10^{-8} mol/l) und bei 38 ± 29 in VG 6 (CIH 10^{-6} mol/l); zum Zeitpunkt $t=105$ lagen die Werte von VG 5 bei 53 ± 9 U/l, die von VG 6 bei 77 ± 27 U/l (siehe Abbildung 4.2-4). Ein signifikanter Unterschied bestand nicht.

Auf die Analyse der Kontrollwerte wird hinsichtlich der fehlenden Ischämiephase verzichtet.

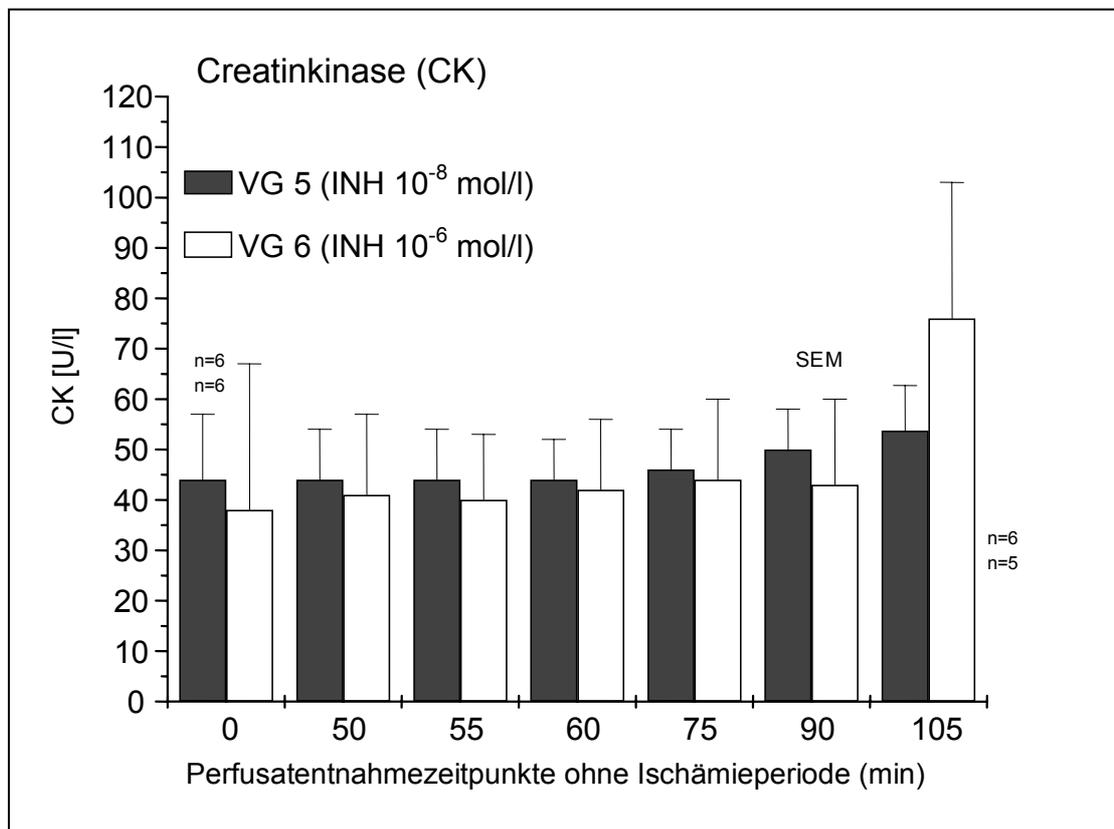


Abbildung 4.2-4: Aktivität der Creatinkinase zu den entsprechenden Sammelperioden (jeweils 5 Minuten). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM.

4.2.2.2 Laktatdehydrogenase (LDH)

Die Aktivität der LDH lag in VG 5 (CIH 10^{-8} mol/l) anfangs bei 53 ± 4 U/l und veränderte sich bis zum Versuchsende kaum auf 54 ± 3 U/l an. In VG 6 (CIH 10^{-6} mol/l) zeigte sich ebenfalls kaum eine Veränderung von 51 ± 5 U/l auf 59 ± 5 U/l (siehe Abbildung 4.2-5). Im Vergleich der beiden Gruppen konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Auf die Analyse der Kontrollwerte wird hinsichtlich der fehlenden Ischämiephase verzichtet.

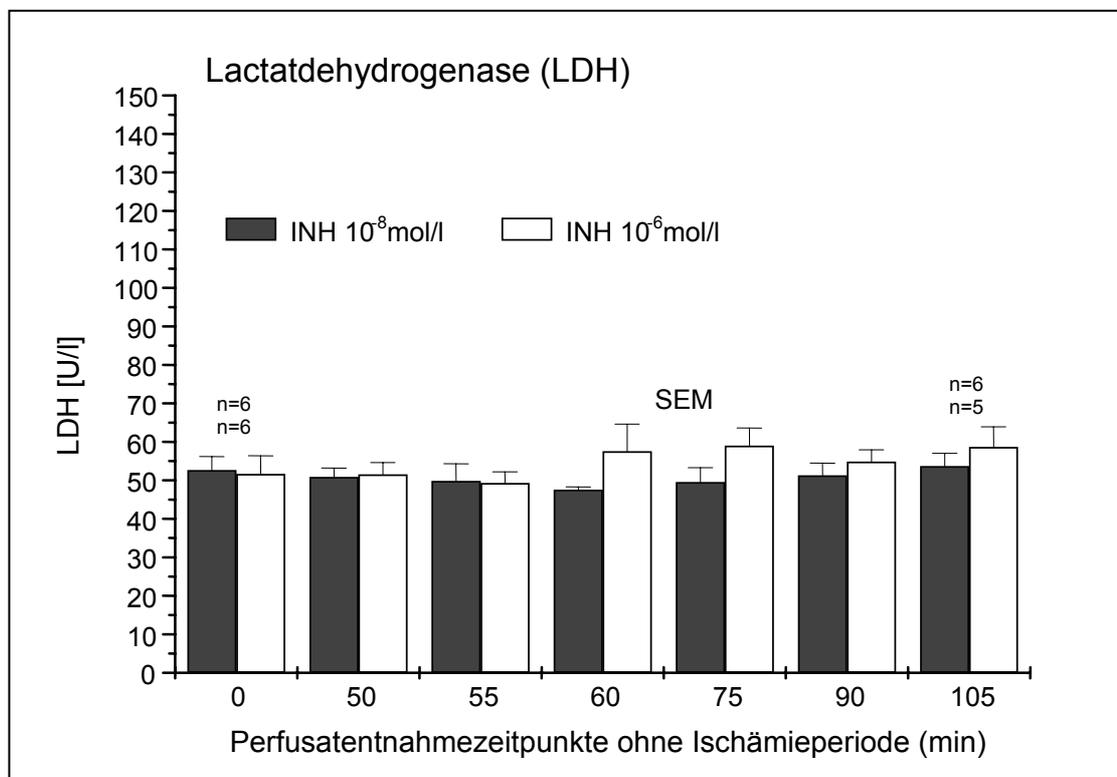


Abbildung 4.2-5: Aktivität der Laktatdehydrogenase zu den entsprechenden Sammelperioden (jeweils 5 Minuten). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM.

4.3 Mitochondriale Oxymetrie

Die Zugabe von A-705239 in der Konzentration von 10^{-8} mol/l (VG 9) hatte präischämisch keinen Einfluß auf die gemessenen mitochondrialen Funktionsparameter im Vergleich zu der nichtbehandelten Kontrollgruppe (VG 8). So konnte von einer gleichen Ausgangsgruppe ausgegangen werden. Nach 45-minütiger Ischämie wurde in der Kontrollgruppe (VG 8) ein signifikanter Abfall der state-3-Atmung von $6,4 \pm 1,1$ auf $3,5 \pm 1,3$ nmol O₂/min/mg für die Substrate Pyruvat und Malat beobachtet. Durch die präischämische Zugabe des Calpaininhibitors kam es zu einem deutlich niedrigerem Abfall der state-3-Atmung von $6,8 \pm 1,3$ auf $5,0 \pm 0,8$ nmol O₂/min/mg, vereinbar mit einer geringer ausgeprägten Schädigung der mitochondrialen Funktion. Nach Ablauf der Reperfusionphase fiel die state-3-Atmung der Kontrollgruppe weiter auf Werte von $2,6 \pm 1,3$ nmol O₂/min/mg; Werte der Inhibitor-behandelten Gruppe (VG 9) lagen nach der Reperfusion bei $4,2 \pm 1,2$ nmol O₂/min/mg und unterschieden sich damit signifikant von der Kontrollgruppe. Durch den Einsatz von A-705239 wurde die state-3-Atmung nach der Reperfusion nur um 38% reduziert versus 59% in der Kontrollgruppe (siehe Abbildung 4.3-1).

Die Calpaininhibition führte im Vergleich zur Kontrolle zu einem schwächeren Anstieg der state-4-Respiration und zu einem höheren RCI (respiratory control index) jeweils nach Ischämie- und Reperfusionphase; anders als in der Kontrollgruppe waren jedoch die

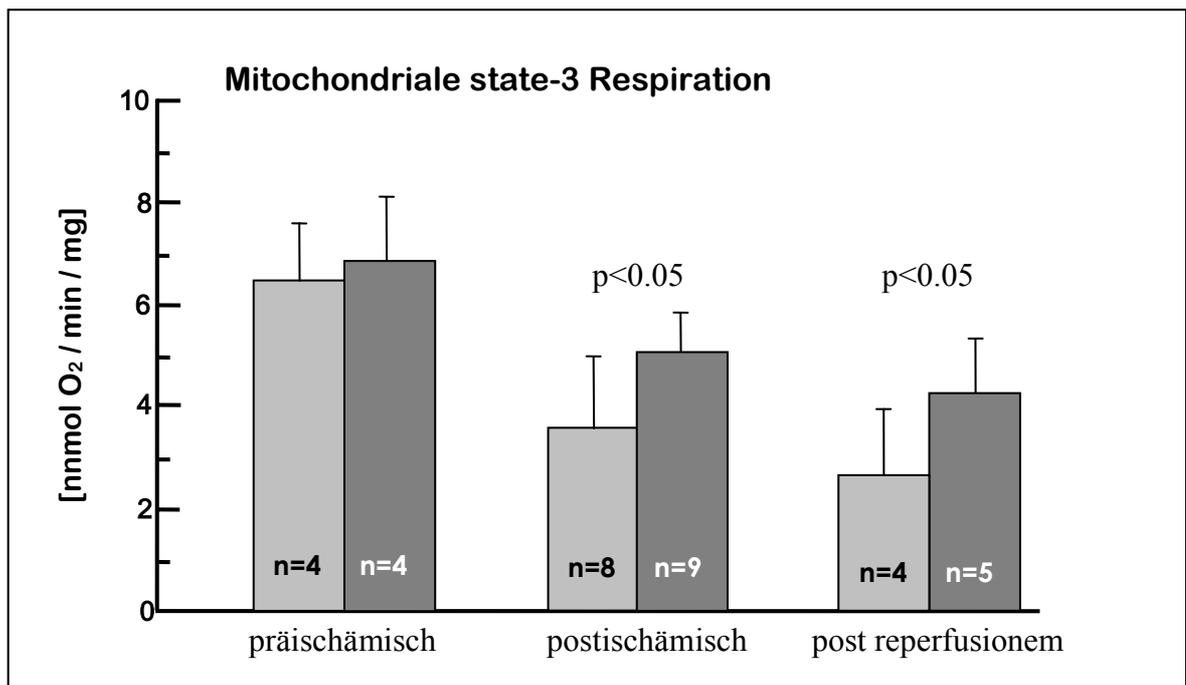


Abbildung 4.3-1: Mitochondriale state-3-Respiration der Herzmuskelhomogenate vor und nach 45minütiger Ischämiephase, sowie nach 60minütiger Reperfusion. Die Kontrollgruppe (VG 8) erscheint hier hellgrau, die inhibitorbehandelte Gruppe (A-705239 in 10^{-8} M; VG 9) dunkelgrau hinterlegt.

state-4-Werte innerhalb der Gruppe nach Ischämie und nach Reperfusion nicht signifikant von den Werten vor der Ischämie zu unterscheiden (vgl. Tabelle 4.3-1), so dass davon ausgegangen werden kann, dass es unter Calpaininhibition zu keiner nennenswerten Beeinflussung der state-4-Atmung kam.

Der RCI war postischämisch und auch nach der Reperfusion in der unter CIH-Einfluß-stehenden Gruppe doppelt so hoch wie in der Kontrollgruppe, jedoch nur postischämisch signifikant unterschiedlich von der Kontrollgruppe bei einem Stichprobenumfang von neun versus vier nach der Reperfusion.

Durch den Einsatz des Calpaininhibitors wurde der Effekt der durch Ischämie und Reperfusion gesteigerten leak-Atmung (gesteigerte Durchlässigkeit der mitochondrialen Innenmembran für Protonen) im Vergleich zur Kontrolle deutlich reduziert: plus 66% vs.

	n	State-3-Respiration [nmolO ₂ /min/mg]	State-4-Respiration [nmolO ₂ /min/mg]	RCI	Leak-Atmung [nmolO ₂ /min/mg]	Stimulation durch Cytochrom c [%]
Kontrolle						
<i>Vor Ischämie</i>	4	6,4 ± 1,1	0,5 ± 0,1	12,5 ± 2,7	0,15 ± 0,07	6,0 ± 10,0
<i>Ischämie 45 min</i>	8	3,5 ± 1,3*#	0,9 ± 0,3*	4,4 ± 2,5*	0,32 ± 0,14*	10,0 ± 6,0
<i>Reperfusion 60 min</i>	4	2,6 ± 1,3*#	0,9 ± 0,3*	3,2 ± 2,1*	0,43 ± 0,29	28,0 ± 16,0
A-705239						
<i>Vor Ischämie</i>	4	6,8 ± 1,3	0,6 ± 0,1	12,4 ± 1,1	0,12 ± 0,06	
<i>Ischämie 45 min</i>	9	5,0 ± 0,8*#	0,6 ± 0,2	8,2 ± 2,3*#	0,20 ± 0,14	16,0 ± 9,0
<i>Reperfusion 60 min</i>	5	4,2 ± 1,2*#	0,7 ± 0,2	6,4 ± 2,7*	0,26 ± 0,24	15,0 ± 13,0

Tabelle 4.3-1: Effekte des Calpaininhibitors A-705239 auf die mitochondriale Funktion nach myocardialer Ischämie und Reperfusion. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichung. Signifikante Unterschiede vom Basalwert in der Gruppe sind kursiv und durch * gekennzeichnet, Unterschiede zwischen den Gruppen durch # (p<0,05).

113% postischämisch, bzw. plus 113% vs. 186% nach der Reperfusion.

Die Stimulation der Pyruvat-abhängigen state-3-Respiration durch die Zugabe von Cytochrom c scheint in Anwesenheit des Calpaininhibitors niedriger zu sein. In der Kontrolle kam es nach der Reperfusionsphase zu einem Anstieg von 28,0 ± 16,0 %, unter Inhibitoreinfluß zu einer Zunahme von 15,0 ± 13,0 (s. Tabelle 4.3-1). Dieser Unterschied war jedoch bei einem Stichprobenumfang von n=5 nur tendenziell zu beobachten. Jedoch kommt es anscheinend auch innerhalb der CIH-Gruppe, gegensätzlich zur Kontrollgruppe, zu keiner Zunahme der Stimulierbarkeit nach der Reperfusion, verglichen mit dem postischämischen Wert.

5 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluß eines neu entwickelten Calpaininhibitors (A-705239) auf die Reperfusionphase nach myokardialer Globalischämie am Modell des isoliert perfundierten Kaninchenherzens untersucht in Abhängigkeit seiner Gewebekonzentration. Es konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass die präischämische Applikation des Inhibitors kardioprotektive Effekte in der bislang für die allgemeine Zellvitalität als desaströs belegten Reperfusionphase aufweist.

Die erstaunlich geringe Konzentration von 10^{-8} mol/l, die sich als nötige Perfusatkonzentration herausstellte, um zu optimalen Erholungs- und Überlebensraten postischämisch zu führen, ist offensichtlich auf eine gute Wasserlöslichkeit und Zellpermeabilität bei hoher Bioverfügbarkeit zurückzuführen. Diese Eigenschaften führen zu einer etwa 16-fach erhöhten Konzentration innerhalb der Herzmuskelzelle (61).

Die aus Voruntersuchungen (68) bekannte glockenförmige Dosis-Wirkungsbeziehung des verwendeten Calpaininhibitors zeigt (siehe Abbildung 5-1), dass ober- und unterhalb des Konzentrationsoptimums von 10^{-8} mol/l die protektiven Effekte vermindert werden. Hierfür scheinen neben der eigentlich effektiven Dosis zwei mögliche Gründe in Frage zu kommen: (i) es existieren bislang nicht bekannte schädliche Nebenwirkungen von A-705239 neben der Inhibition von Calpain, die mit steigender Konzentration ins Gewicht fallen und/ oder (ii) eine basale Aktivität der Protease Calpain wird für die Aufrechterhaltung einer normalen Zellfunktion benötigt. Die letztere Vermutung wird von Untersuchungen mit trans-

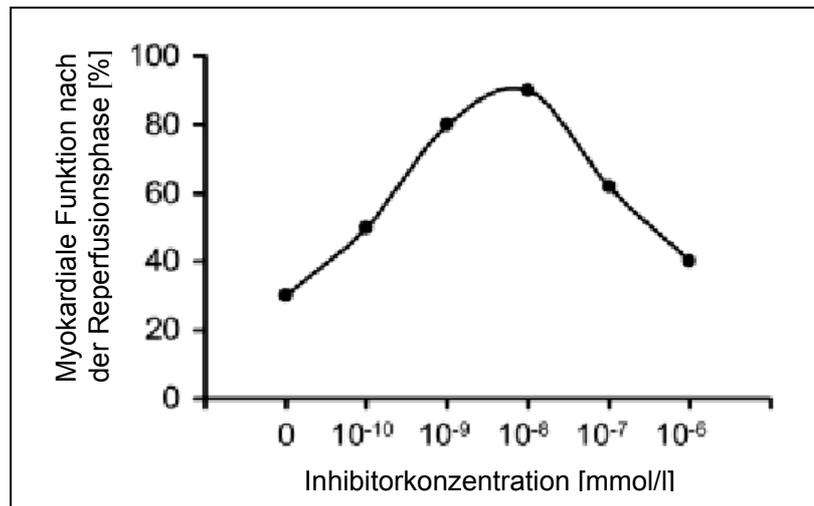


Abbildung 5-1: Dosis-Wirkungsbeziehung zwischen der Konzentration von A-705239 im Perfusat und der Erholungsrate der myokardialen Funktion nach Ablauf der Reperusionsphase (60 min).

genen „knock-out-Mäusen“ gestützt, in denen die Genloci für μ - und m-Calpain ausgeschaltet wurden, was mit dem embryonalen Überleben nicht vereinbar war (3, 114). Mäuse, in denen das Calpainsystem nur partiell ausgeschaltet wurde (μ -Calpain) fielen zwar durch Thrombozytenfunktionsstörungen auf, waren aber dennoch überlebensfähig (8, 112).

In unseren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass der Calpaininhibitor A-705239 signifikant die myokardiale Funktion, die Erholungs- und die Überlebensraten verbessert, wenn er vor der Ischämiephase dem Perfusat zugesetzt wird. Dies steht im Einklang mit den von Saito et al. vorgestellten Ergebnissen an isoliert perfundierten Rattenherzen nach zwölfstündiger hypothermischer Konservierung, in denen durch den Einsatz des Calpaininhibitors-I im Vergleich zur Kontrollgruppe die globale myokardiale Funktion verbessert und die Freisetzung der nekroseanzeigenden Enzyme LDH, CK und GOT verringert werden konnte (81).

Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Anwendung von A-705239 (s. Kapitel 3) ohne Induktion einer ischämischen Situation zu keinen signifikanten Abweichungen der kardialen Funktion

oder der kardiomyozytären Integrität führt, so dass davon ausgegangen werden muß, dass die zusätzliche Inhibition der Calpaine ohne vorangegangene Aktivierung während physiologisch bestehender Zustände der Zellfunktion entweder nicht eintritt und ohne Konsequenzen bleibt oder zu keinen mit unseren Mitteln messbaren Veränderungen führt.

Für die Aktivierung des Calpainsystems, welches primär in den Z-Scheiben- und I-Bandenregionen lokalisiert ist (52), und den sukzessiven Abbau der myokardialen Proteine wird die durch Ischämie und Reperfusion bewirkte zelluläre Kalziumüberhäufung verantwortlich gemacht (79). Die elektronenmikroskopisch gefundene Desintegration von Myofilamenten in verschiedenen Ischämie-Reperfusionsmodellen (28, 110) könnte auf diese Art mit der Calpain-abhängigen Degradation von Desmin, Calspectin (73, 113) und den Troponinen T und I korrespondieren.

Als quantitativer Indikator der myokardialen Zellschädigung während der Reperfusion dienten in unserer Studie die Enzymaktivitäten der Laktatdehydrogenase und Kreatinphosphokinase im Effluvium; die Calpainaktivierung durch Ischämie oder Hypoxie könnte für deren gesteigerte Aktivitäten verantwortlich gemacht werden oder zumindest dazu beitragen, da durch dessen Inhibition, im Einklang mit Ergebnissen anderer Autoren (17, 58), die Freisetzung o.g. Enzyme signifikant reduziert werden konnte.

Neben der direkten Schädigung der Myofilamente wird die mitochondriale Dysfunktion während Ischämie und Reperfusion als entscheidender Faktor der kardialen Dysfunktion und der kardiomyozytären Schädigung angenommen. So weist der Verlust der zytosolischen Enzyme Kreatinphosphokinase und Laktatdehydro-

genase auf die gestörte Integrität des Sarkolemm hin, welche möglicherweise wiederum auf eine verschlechterte Energieversorgung durch die in ihrer Funktion beeinträchtigten Mitochondrien zurückzuführen ist (57).

Die Aktivierung der Calpaine, welche sich auch im intermembranösen Raum und in der mitochondrialen Matrix finden lassen (100), scheint eine essentielle Rolle hierbei zu spielen; so konnte in unseren Ergebnissen der Abfall der mitochondrialen state-3-Atmung, der einerseits durch die Ischämie und andererseits noch stärker durch die anschließende Reperfusionphase bewirkt wird, durch die Hemmung des Calpainsystems signifikant abgeschwächt werden. Eine reduzierte mitochondriale state-3-Respiration deutet auf eine Störung in der Atmungskette, speziell des Komplexes I hin, der als frühes Angriffsziel einer ischämischen und septischen Schädigung gilt (29).

Zusätzlicher zellulärer und subzellulärer Schaden wird in der Reperfusionphase durch Sauerstoffradikale („reactive oxygen species“ – ROS) angerichtet. Je nach Ausmaß der oxidativen Schädigung und der mitochondrialen Kalziumüberflutung kommt es neben der Aktivierung des Calpainsystems, Freisetzung proapoptotischer Faktoren und DNA-Fragmentation (17) zu Permeabilitätsveränderungen an der inneren Mitochondrienmembran durch Öffnung sogenannter „membrane transitional pores“ (54). Das durch die veränderte postischämische Membranpermeabilität begünstigte Anschwellen der Mitochondrien kann zur Zerreißung der äußeren Mitochondrienmembran und der konsekutiven Freisetzung von Cytochrom c führen, welches eine Schlüsselrolle in der Apoptoseinitiierung einnimmt (20, 115). Dieser Schaden konnte in unserer

Studie durch die präischämische Gabe des Calpaininhibitors A-705239 signifikant abgeschwächt werden; hierauf deuten die im Vergleich zu dem Basalwert präischämisch nicht veränderte state-4- und die im Vergleich zur Kontrollgruppe verminderte leak-Respiration in den Ergebnissen der mitochondrialen Oxymetrie hin. Die Stimulation der state-3-Atmung durch die Zugabe von Cytochrom c stellte sich in der inhibitorbehandelten Gruppe als nur tendenziell geringer ausgeprägt als in der Kontrollgruppe dar, so dass in weiteren Untersuchungen zu klären ist, ob und in welchem Ausmaß der Calpain-induzierte Schaden an der Ruptur der äußeren Mitochondrienmembran beteiligt ist und zur Freisetzung von apoptoseinduzierendem Cytochrom c führt.

Als relativ hochspezifischer, hydrophiler Inhibitor des Calpain-systems mit guter Membrangängigkeit zeigte A-705239 gute protektive Effekte bezüglich der durch Ischämie und Reperfusion bedingten kardiomyozytären und mitochondrialen Schädigung im Fall der präischämischen Applikation; es bleibt zu klären, inwiefern der Einsatz in späteren Phasen der Ischämie bzw. der Reperfusion eine ähnlich protektive Wirkung aufweist. Ferner bleibt offen, in welchem Ausmaß apoptoseinduzierende Vorgänge an der postischämischen Funktionsstörung beteiligt sind und durch die Gabe von A-705239 beeinflusst werden können. Es ist bekannt, dass der verwendete Calpaininhibitor gleichwohl auch die lysosomalen Kathepsine B und L hemmt, somit die gezeigten protektiven Effekte bislang nicht allein der Calpaininhibition zuzuschreiben sind und deshalb hier weiterer Klärungsbedarf besteht.

Zusammenfassend kann hinsichtlich der klinischen Relevanz gesagt werden, dass in Situationen, die mit hypoxischen und / oder ischämischen Zuständen einhergehen, wie z.B. bei Transplantationen, kardiochirurgischen Eingriffen mit extrakorporaler Zirkulation oder septischen Krankheitsbildern, die selektive Inhibition des Calpainsystems aufgrund seiner ubiquitären Präsenz eine interessante Möglichkeit der Organpräservierung darstellen könnte und somit weiterer Überlegungen bedarf.

6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Studie wurde der Einfluß des selektiven Calpaininhibitors A-705239 auf das myokardiale Reperfusionssyndrom nach 45-minütiger Globalischämie am Modell des isoliert perfundierten Kaninchenherzens nach Langendorff untersucht.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde A-705239 in den Konzentrationen von 10^{-8} bis 10^{-6} mol/l präischämisch dem Perfusat zugegeben und es wurden die myokardiale Funktion und die zelluläre Integrität der einzelnen Therapiegruppen während der Reperusionsphase von 60 Minuten mit einer unbehandelten Kontrollgruppe verglichen. Als Messgrößen dienten hierbei kardiodynamische (linksventrikuläre auxotone Kontraktionsamplitude, koronarer Gefäßwiderstand, Herzfrequenz) sowie laborchemische Parameter (Enzymaktivitäten der Kreatinkinase und Laktatdehydrogenase im koronaren Effluvium).

Es konnte gezeigt werden, dass der Einsatz von A-705239 in einer Konzentration von 10^{-8} mol/l postischämisch zu einer höheren Überlebensrate und funktionellen Verbesserung führt. Im Vergleich zur Kontrollgruppe ergab sich eine signifikant höhere linksventrikuläre Druckamplitude, ein signifikant niedrigerer Koronarwiderstand und eine geringere Freisetzung der LDH und CK. Daher kann geschlossen werden, dass der präischämische Einsatz von A-705239 in einer Konzentration von 10^{-8} mol/l protektive Effekte aufweist bezüglich der durch Ischämie und Reperfusion bewirkten kardiomyozytären Schädigung im Modell des normotherm isoliert perfundierten Kaninchenherzens.

Aufgrund auffallend schlechterer Resultate bei der Anwendung von A-705239 in einer Konzentration von 10^{-6} mol/l wurden im zweiten Teil der Arbeit, hinsichtlich einer etwaigen negativen Auswirkung der Substanz in jener Konzentration, Versuche ohne Ischämiephase durchgeführt. Hier konnten weder funktionelle noch laborchemische Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen mit den Konzentrationen 10^{-8} , 10^{-6} mol/l und der Kontrollgruppe aufgezeigt werden.

Im dritten Teil der Arbeit wurde der Einfluß von A-705239 in der Konzentration von 10^{-8} mol/l auf die mitochondriale Dysfunktion nach 45-minütiger Ischämie und anschließender Reperfusionphase anhand oxymetrischer Analysen von Herzmuskelhomogenaten untersucht; hierzu wurden präischämisch, postischämisch und nach der Reperusionsphase Biopsien aus dem linken Ventrikel gewonnen, speziell präpariert und der oxymetrischen Analyse zugeführt. Hierbei zeigte sich eine signifikant niedrigere Abnahme der mitochondrialen state-3-Respiration postischämisch in der inhibitorbehandelten Gruppe, einhergehend mit einem deutlich reduzierten Schaden der oxydativen Phosphorylierung. Ferner wurde die postischämische leak-Atmung vermindert und somit die Permeabilität der inneren Mitochondrienmembran durch den Einsatz des Inhibitors vermindert.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die beobachteten protektiven Effekte eines Calpaininhibitors auf das Reperusionsyndrom von klinischer Relevanz sein könnten und sich hierfür die weitere pharmakologische Testung von A-705239 aufgrund seiner hervorragenden Eigenschaften anbietet.

7 Literatur

1. Arlinghaus L, Mehdi S, Lee KS
Improved posthypoxic recovery with a membrane-permeable calpain inhibitor.
Eur J Pharmacol 1991; 209(1-2): 123-5.
2. Arthur JS, Crawford C
Investigation of the interaction of m-calpain with phospholipids: calpain-phospholipid interactions.
Biochim Biophys Acta 1996; 1293(2): 201-6.
3. Arthur JSC, Elce JS, Hegadorn C, Williams K, Greer PA
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 2000; 20: 4474-4481.
4. Atencio IA, Ramachandra M, Shabram P, Demers GW
Calpain inhibitor 1 activates p53-dependent apoptosis in tumor cell lines.
Cell Growth Differ 2000; 11(5): 247-53.
5. Atsma DE, Bastiaanse EM, Jerzewski A, Van der Valk LJ, Van der Laarse A
Role of calcium-activated neutral protease (calpain) in cell death in cultured neonatal rat cardiomyocytes during metabolic inhibition.
Circ Res 1995; 76(6): 1071-8.
6. Auerswald EA, Gabrijelcic-Geiger D, Pfeifer D, et al.
Human μ -calpain: autolysis, antibodies and cloning.
Eur J Cell Biol 1999; 49: 53-58.
7. Avkiran M
Rational basis for use of sodium-hydrogen exchange inhibitors in myocardial ischemia.
Am J Cardiol 1999; 83(10A): 10G-17G.
8. Azam M, Andrabi SS, Sahr KE, et al.
Disruption of the mouse m-calpain gene reveals an essential role in platelet function.
Mol Cell Biol 2001; 21: 2213-2220.

9. Barnoy S, Glaser T, Kosower NS
Calpain and calpastatin in myoblast differentiation and fusion: effects of inhibitors.
Biochim Biophys Acta 1997; 1358(2): 181-8.
10. Black SC, Gralinski MR, Friedrichs GS, Kilgore KS, Lucchesi BR
Cardioprotective effect of heparin and N-acetylheparin in an in vivo model of myocardial ischaemic and reperfusion injury.
Cardiovasc Res 1995; 29: 629-636.
11. Bolli R, Marban E
Molecular and cellular mechanisms of myocardial stunning.
Physiol Rev 1999; 79(2): 609-34.
12. Boyle EM, Jr., Pohlman TH, Cornejo CJ, Verrier ED
Endothelial cell injury in cardiovascular surgery: ischemia-reperfusion.
Ann Thorac Surg 1996; 62(6): 1868-75.
13. Braun C, Engel M, Seifert M, et al.
Expression of calpain I messenger RNA in human renal cell carcinoma: correlation with lymph node metastasis and histological type.
Int J Cancer 1999; 84(1): 6-9.
14. Carafoli E, Molinari M
Calpain: a protease in search of a function?
Biochem Biophys Res Commun 1998; 247(2): 193-203.
15. Carrozza JP, Jr., Bentivegna LA, Williams CP, et al.
Decreased myofilament responsiveness in myocardial stunning follows transient calcium overload during ischemia and reperfusion.
Circ Res 1992; 71(6): 1334-40.
16. Ch'en FF, Vaughan-Jones RD, Clarke K, Noble D
Modelling myocardial ischaemia and reperfusion.
Prog Biophys Mol Biol 1998; 69(2-3): 515-38.
17. Chen M, Won DJ, Krajewski S, Gottlieb RA
Calpain and mitochondria in ischemia/reperfusion injury.
J Biol Chem 2002; 277(32): 29181-6.

18. Cottin P, Brustis JJ, Poussard S, et al.
Ca(2+)-dependent proteinases (calpains) and muscle cell differentiation.
Biochim Biophys Acta 1994; 1223(2): 170-8.
19. Croall DE, DeMartino GN
Calcium-activated neutral protease (calpain) system: structure, function, and regulation.
Physiol Rev 1991; 71(3): 813-47.
20. Ding WX, Shen HM, Ong CN
Calpain activation after mitochondrial permeability transition in microcystin-induced cell death in rat hepatocytes.
Biochem Biophys Res Commun 2002; 291(2): 321-31.
21. Döring HJ, Dehnert H
The isolated and perfused heart according to Langendorff.
Biomestechnik-Verlag March GmbH, 1988 127p.
22. Duncker DJ, Schulz R, Ferrari R, et al.
"Myocardial stunning" remaining questions.
Cardiovasc Res 1998; 38(3): 549-58.
23. Edelstein CL, Yaqoob MM, Alkhunaizi AM, et al.
Modulation of hypoxia-induced calpain activity in rat renal proximal tubules.
Kidney Int 1996; 50(4): 1150-7.
24. Felix SB, Stangl V, Frank TM, et al.
Release of a stable cardiodepressant mediator after myocardial ischaemia during reperfusion.
Cardiovasc Res 1997; 35(1): 68-79.
25. Ferrari R
The role of mitochondria in ischemic heart disease.
J Cardiovasc Pharmacol 1996; 28(Suppl 1): S1-10.
26. Feuvray D
Intracellular pH regulation and myocardial ischemia-reperfusion injury.
In: Mochizuki S, Takeda N, Nagano M, et al. (eds.): The ischemic heart, vol 1. Boston. Kluwer Academic Publishers, 1998; 241-263.
27. Freude B, Masters TN, Robicsek F, et al.
Apoptosis is initiated by myocardial ischemia and executed during reperfusion.
J Mol Cell Cardiol 2000; 32(2): 197-208.

28. Gao WD, Liu Y, Mellgren R, Marban E
Intrinsic myofilament alterations underlying the decreased contractility of stunned myocardium. A consequence of Ca²⁺-dependent proteolysis?
Circ Res 1996; 78(3): 455-65.
29. Gellerich FN, Trumbeckaite S, Hertel K, et al.
Impaired energy metabolism in hearts of septic baboons: diminished activities of complex I and complex II of the mitochondrial respiratory chain.
Shock 1999; 11: 336-341.
30. Gil-Parrado S, Fernandez-Montalvan A, Assfalg-Machleidt I, et al.
Ionomycin-activated calpain triggers apoptosis. A probable role for Bcl-2 family members.
J Biol Chem 2002; 277(30): 27217-26.
31. Goldhaber JI, Qayyum MS
Oxygen free radicals and excitation-contraction coupling.
Antioxid Redox Signal 2000; 2(1): 55-64.
32. Griffiths EJ, Ocampo CJ, Savage JS, et al.
Mitochondrial calcium transporting pathways during hypoxia and reoxygenation in single rat cardiomyocytes.
Cardiovasc Res 1998; 39(2): 423-33.
33. Gross GJ, Kersten JR, Warltier DC
Mechanisms of postischemic contractile dysfunction.
Ann Thorac Surg 1999; 68(5): 1898-904.
34. Hayashi H, Satoh H, Katoh H, et al.
Regulation of [Na⁺]_i and [Ca²⁺]_i during myocardial ischemia and reperfusion in a single-cell model.
In: Mochizuki S, Takeda N, Nagano M, et al. (eds.): The ischemic heart, vol 1. Boston. Kluwer Academic Publishers, 1998; 249-264.
35. Hearse DJ
Protection against injury during myocardial ischemia and reperfusion: concepts and strategies.
In: Mochizuki S, Takeda N, Nagano M, et al. (eds.): The ischemic heart, vol 1. Boston. Kluwer Academic Publishers, 1998; 357-366.

36. Heinrichs CM
Ischämie und Reperfusion. Eine ultrastrukturelle Studie an Hund- und Schweinmyokard
Dissertationsschrift. Justus-Liebig-Universität; 1990.
37. Iizuka K, Kawaguchi H, Yasuda H, Kitabatake A
The role of calcium activated neutral protease on myocardial cell injury in hypoxia.
Jpn Heart J 1992; 33(5): 707-15.
38. Ikeda T, Wakabayashi S, Shigekawa M
Mechanisms of inhibition of Na⁺-H⁺ exchanger (NHE1) by ATP depletion: implications for myocardial ischemia.
In: Mochizuki S, Takeda N, Nagano M, et al. (eds.): *The ischemic heart*, vol 1. Boston. Kluwer Academic Publishers, 1998; 189-198.
39. Janmey PA
The cytoskeleton and cell signaling: component localization and mechanical coupling.
Physiol Rev 1998; 78(3): 763-81.
40. Jennings RB, Reimer KA
The cell biology of acute myocardial ischemia.
Annu Rev Med 1991; 42: 225-46.
41. Jennings RB, Reimer KA, Jones RN, Peyton RB
High energy phosphates, anaerobic glycolysis and irreversibility in ischemia.
Adv Exp Med Biol 1983; 161: 403-19.
42. Jennings RB, Steenberger C
Ca²⁺ ion shifts in vivo in reversible and irreversible ischemic injury.
In: Mochizuki S, Takeda N, Nagano M, et al. (eds.): *The ischemic heart*, vol 1. Boston. Kluwer Academic Publishers, 1998; 151-176.
43. Johnson P
Calpains (intracellular calcium-activated cysteine proteinases): structure-activity relationships and involvement in normal and abnormal cellular metabolism.
Int J Biochem 1990; 22(8): 811-22.
44. Kakkar R, Raju RV, Mellgren RL, Radhi J, Sharma RK
Cardiac high molecular weight calmodulin binding protein contains calpastatin activity.
Biochemistry 1997; 36(39): 11550-5.

45. Kaplan P, Hendriks M, Mattheussen M, Mubagwa K, Flammeng W
Effect of ischemia and reperfusion on sarcoplasmic reticulum calcium uptake.
Circ Res 1992; 71(5): 1123-30.
46. Katagiri T, Geshi E, Arata H, et al.
Pathophysiological behaviour of the myocardium in acute ischemia and reperfusion, with special emphasis on the sarcoplasmic reticulum.
In: Mochizuki S, Takeda N, Nagano M, et al. (eds.): The ischemic heart, vol 1. Boston. Kluwer Academic Publishers, 1998; 137-149.
47. Kawasaki H, Emori Y, Suzuki K
Calpastatin has two distinct sites for interaction with calpain--effect of calpastatin fragments on the binding of calpain to membranes.
Arch Biochem Biophys 1993; 305(2): 467-72.
48. Kawasaki H, Kawashima S
Regulation of the calpain-calpastatin system by membranes (review).
Mol Membr Biol 1996; 13(4): 217-24.
49. Khan QA, Dipple A, Anderson LM
Protease inhibitor-induced stabilization of p21(waf1/cip1) and cell-cycle arrest in chemical carcinogen-exposed mammary and lung cells.
Mol Carcinog 2002; 33(1): 1-8.
50. Kohli V, Gao W, Camargo CA, Jr., Clavien PA
Calpain is a mediator of preservation-reperfusion injury in rat liver transplantation.
Proc Natl Acad Sci U S A 1997; 94(17): 9354-9.
51. Kohli V, Madden JF, Bentley RC, Clavien PA
Calpain mediates ischemic injury of the liver through modulation of apoptosis and necrosis.
Gastroenterology 1999; 116(1): 168-78.
52. Kumamoto T, Kleese WC, Cong JY, et al.
Localization of the Ca(2+)-dependent proteinases and their inhibitor in normal, fasted, and denervated rat skeletal muscle.
Anat Rec 1992; 232(1): 60-77.

53. Kunimatsu M, Tada T, Narita Y, et al.
Activation of calpain in myocardial infarction: an immunohistochemical study using a calpain antibody raised against active site histidine-containing peptide.
Cardiovasc Pathol 1999; 8(1): 7-15.
54. Kushnareva YE, Sokolove PM
Prooxidants open both the mitochondrial transition pore and a low-conductance channel in the inner mitochondrial membrane.
Arch Biochem Biophys 2000; 376: 377-388.
55. Kusuoka H, Camilion de Hurtado MC, Marban E
Role of sodium/calcium exchange in the mechanism of myocardial stunning: protective effect of reperfusion with high sodium solution.
J Am Coll Cardiol 1993; 21(1): 240-8.
56. Kusuoka H, Kitakaze M, Koretsune Y, Inoue M, Marban E
Pathophysiology and pathogenesis of contractile failure in stunned myocardium.
Jpn Circ J 1991; 55(9): 878-84.
57. Lesnefsky EJ, Moghaddas S, Tandler B, Kerner J, Hoppel CL
Mitochondrial dysfunction in cardiac disease: ischemia-reperfusion, aging and heart-failure.
J Mol Cell Cardiol 2001; 33: 1065-1089.
58. Liu X, Schellmann RG
Calpain mediates progressive plasma membrane permeability and proteolysis of cytoskeleton-associated paxillin, talin and vinculin during renal cell death.
J Pharmacol Exp Ther 2003; 301: 63-70.
59. Löffler G
Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie.
Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag, 1999, Vol. 3, 755p.
60. Lopaschuk GD, Clanachan AS
The source and fate of protons in the reperfused ischemic heart.
In: Mochizuki S, Takeda N, Nagano M, et al. (eds.): *The ischemic heart*, vol 1. Boston. Kluwer Academic Publishers, 1998; 199-213.

61. Lubisch W, Beckenbach E, Bopp S, et al.
Benzoylalanine-derived ketoamides carrying vinylbenzyl amino residues: discovery of potent calpain inhibitors with oral bioavailability.
J Med Chem 2003; 46: 2404-2412.
62. Ma H, Yang HQ, Takano E, Hatanaka M, Maki M
Amino-terminal conserved region in proteinase inhibitor domain of calpastatin potentiates its calpain inhibitory activity by interacting with calmodulin-like domain of the proteinase.
J Biol Chem 1994; 269(39): 24430-6.
63. Matsumura Y, Kusuoka H, Inoue M, Hori M, Kamada T
Protective effect of the protease inhibitor leupeptin against myocardial stunning.
J Cardiovasc Pharmacol 1993; 22(1): 135-42.
64. Moldoveanu T, Hosfield CM, Lim D, et al.
A Ca(2+) switch aligns the active site of calpain.
Cell 2002; 108(5): 649-60.
65. Moncman CL, Wang K
Effects of thiol protease inhibitors on myoblast fusion and myofibril assembly in vitro.
Cell Motil Cytoskeleton 1998; 40(4): 354-67.
66. Morishita R, Aoki M, Matsushita H, et al.
Gene therapy for myocardial infarction.
In: Mochizuki S, Takeda N, Nagano M, et al. (eds.): The ischemic heart, vol 1. Boston. Kluwer Academic Publishers, 1998; 531-544.
67. Murachi T
Intracellular regulatory system involving calpain and calpastatin.
Biochem Int 1989; 18(2): 263-94.
68. Neuhof C, Goette O, Trumbeckaite S, et al.
A novel water-soluble and cell-permeable calpain inhibitor protects myocardial and mitochondrial function in postischemic reperfusion.
Biol Chem 2003; 384: 1597-1603.

69. Nishio K, Konno N, Arata Y, et al.
Oxygen consumption and mitochondrial membrane potential in postischemic myocardium.
In: Mochizuki S, Takeda N, Nagano M, et al. (eds.): *The ischemic heart*, vol 1. Boston. Kluwer Academic Publishers, 1998; 125-135.
70. Nixon RA
Calcium-activated neutral proteinases as regulators of cellular function. Implications for Alzheimer's disease pathogenesis.
Ann N Y Acad Sci 1989; 568: 198-208.
71. Ostadal B, Ostadalova I, Dhalla NS
Development of cardiac sensitivity to oxygen deficiency: comparative and ontogenetic aspects.
Physiol Rev 1999; 79(3): 635-59.
72. Pal GP, Elce JS, Jia Z
Dissociation and aggregation of calpain in the presence of calcium.
J Biol Chem 2001; 276(50): 47233-8.
73. Papp Z, van der Velden J, Stienen GJ
Calpain-I induced alterations in the cytoskeletal structure and impaired mechanical properties of single myocytes of rat heart.
Cardiovasc Res 2000; 45(4): 981-93.
74. Park JL, Lucchesi BR
Mechanisms of myocardial reperfusion injury.
Ann Thorac Surg 1999; 68(5): 1905-12.
75. Piper HM, Garcia-Dorado D, Ovize M
A fresh look at reperfusion injury.
Cardiovasc Res 1998; 38(2): 291-300.
76. Prigge JT, Kirkpatrick-Keller DC, Killefer J
Isolation and characterization of a calpain activator in chicken skeletal muscle.
Poult Sci 1998; 77(9): 1411-6.
77. Redwood SR, Ferrari R, Marber MS
Myocardial hibernation and stunning: from physiological principles to clinical practice.
Heart 1998; 80(3): 218-22.

78. Reverter D, Sorimachi H, Bode W
The structure of calcium-free human m-calpain: implications for calcium activation and function.
Trends Cardiovasc Med 2001; 11(6): 222-9.
79. Robinson A
Inhibiting calpain, rescuing cells.
Cmaj 1996; 154(2): 193-5.
80. Saïdo TC, Sorimachi H, Suzuki K
Calpain: new perspectives in molecular diversity and physiological-pathological involvement.
Faseb J 1994; 8(11): 814-22.
81. Saito T, Mishima A, Asano M, et al.
Protective effects of calpain inhibitor for prolonged hypothermic cardiac preservation.
Jpn J Thorac Cardiovasc Surg 1999; 47(4): 145-52.
82. Santella L, Kyoïzuka K, De Riso L, Carafoli E
Calcium, protease action, and the regulation of the cell cycle.
Cell Calcium 1998; 23(2-3): 123-30.
83. Sato N, Fujio Y, Yamada-Honda F, et al.
Elevated calcium level induces calcium-dependent proteolysis of A-CAM (N-cadherin) in heart--analysis by detergent-treated model.
Biochem Biophys Res Commun 1995; 217(2): 649-53.
84. Sazontova TG, Matskevich AA, Arkhipenko YV
Calpains: physiological and pathophysiological significance.
Pathophysiology 1999; 6: 91-102.
85. Schaer GL, Karas SP, Santoian EC, et al.
Reduction in reperfusion injury by blood-free reperfusion after experimental myocardial infarction.
J Am Coll Cardiol 1990; 15(6): 1385-93.
86. Schoenwaelder SM, Yuan Y, Cooray P, Salem HH, Jackson SP
Calpain cleavage of focal adhesion proteins regulates the cytoskeletal attachment of integrin α 5 β 3 (platelet glycoprotein IIb/IIIa) and the cellular retraction of fibrin clots.
J Biol Chem 1997; 272(3): 1694-702.

87. Shattock MJ
Ionic mechanisms of reperfusion injury.
In: Mochizuki S, Takeda N, Nagano M, et al. (eds.): *The ischemic heart*, vol 1. Boston. Kluwer Academic Publishers, 1998; 177-188.
88. Shearer T, Shih M, Mizuno T, David L
Crystallins from rat lens are especially susceptible to calpain-induced light-scattering compared to other species.
Cur Eye Res 1996; 15: 860-868.
89. Smart SC, Sagar KB, Schultz JE, Warltier DC, Jones LR
Injury to the Ca²⁺ ATPase of the sarcoplasmic reticulum in anesthetized dogs contributes to myocardial reperfusion injury.
Cardiovascular Research 1997; 36: 174-184.
90. Söffker G:
Der Einfluß von Bradykinin und seiner Autakoide Prosta-zyklin und Stickstoffmonoxid auf das Reperfusionssyndrom am Modell des isolierten Kaninchenherzens unter besonderer Beachtung funktioneller Parameter
Dissertationsschrift. Justus-Liebig-Universität; 1997.
91. Sorimachi H, Ishiura S, Suzuki K
Structure and physiological function of calpains.
Biochem J 1997; 328: 721-738.
92. Sorimachi Y, Harada K, Saido TC, et al.
Downregulation of calpastatin in rat heart after brief ischemia and reperfusion.
J Biochem (Tokyo) 1997; 122(4): 743-8.
93. Stangl V, Frank TM, Schror K, et al.
Interaction of adenosine and prostacyclin in coronary flow regulation after myocardial ischemia.
Eur J Pharmacol 1999; 377(1): 43-50.
94. Stanley WC, Lopaschuk GD, Hall JL, McCormack JG
Regulation of myocardial carbohydrate metabolism under normal and ischaemic conditions. Potential for pharmacological interventions.
Cardiovasc Res 1997; 33(2): 243-57.
95. Stella P, Soldati L, Ciurlino D, et al.
Erythrocyte calpain activity and left ventricular mass in essential hypertension.
J Hypertens 1997; 15(12 Pt 2): 1775-8.

96. Suzuki K, Ohno S
Calcium activated neutral protease--structure-function relationship and functional implications.
Cell Struct Funct 1990; 15(1): 1-6.
97. Suzuki K, Sorimachi H, Yoshizawa T, Kinbara K, Ishiura S
Calpain: Novel family members, activation and physiological function.
Biol. Chem. Hoppe-Seyler 1995; 376: 523-529.
98. Swynghedauw B
Molecular mechanisms of myocardial remodeling.
Physiol Rev 1999; 79(1): 215-62.
99. Taegtmeyer H, King LM, Jones BE
Energy substrate metabolism, myocardial ischemia and targets for pharmacotherapy.
Am J Cardiol 1998; 82(5A): 54K-60K.
100. Tavares A, Duque-Magalhaes MC
Demonstration of three calpains in the matrix of rat liver mitochondria.
Biomed Biochim Acta 1991; 50: 523-529.
101. Tavazzi B, Di Pierro D, Bartolini M, et al.
Lipid peroxidation, tissue necrosis, and metabolic and mechanical recovery of isolated reperfused rat heart as a function of increasing ischemia.
Free Radic Res 1998; 28(1): 25-37.
102. Temm-Grove CJ, Wert D, Thompson VF, Allen RE, Goll DE
Microinjection of calpastatin inhibits fusion in myoblasts.
Exp Cell Res 1999; 247(1): 293-303.
103. Tompa P, Baki A, Schad E, Friedrich P
The calpain cascade. Mu-calpain activates m-calpain.
J Biol Chem 1996; 271(52): 33161-4.
104. Tompa P, Mucsi Z, Orosz G, Friedrich P
Calpastatin subdomains A and C are activators of calpain.
J Biol Chem 2002; 277(11): 9022-6.
105. Toyo-oka T, Arisaka H, Sanma H, et al.
Synergistic deleterious effect of micromolar Ca ions and free radicals on respiratory function of heart mitochondria at cytochrome C and its salvage trial.
Biochem Biophys Res Commun 1989; 163(3): 1397-403.

106. Trumbeckaite S:
Der Nachweis akuter Störungen der Mitochondrienfunktion bei Sepsis, Ischämie und Reperfusion: respiratorische und enzymatische Untersuchungen an permeabilisierten Muskelfasern
Dissertationsschrift. Martin-Luther-Universität; 2000.
107. Urthaler F, Wolkowicz PE, Digerness SB, Harris KD, Walker AA
MDL-28170, a membrane-permeant calpain inhibitor, attenuates stunning and PKC epsilon proteolysis in reperfused ferret hearts.
Cardiovasc Res 1997; 35(1): 60-7.
108. Vandeplassche G, Thone F, Borgers M
Protective effects of R 56 865 against ischemic damage in the isolated rabbit heart.
Eur J Pharmacol 1991; 202(2): 259-68.
109. Vander Heide RS, Hill ML, Reimer KA, Jennings RB
Effect of reversible ischemia on the activity of the mitochondrial ATPase: relationship to ischemic preconditioning.
J Mol Cell Cardiol 1996; 28(1): 103-12.
110. Verdouw PD, van den Doel MA, de Zeeuw S, Duncker DJ
Animal models in the study of myocardial ischaemia and ischaemic syndromes.
Cardiovasc Res 1998; 39(1): 121-35.
111. Wildhirt SM, Weismueller S, Schulze C, et al.
Inducible nitric oxide synthase activation after ischemia/reperfusion contributes to myocardial dysfunction and extent of infarct size in rabbits: evidence for a late phase of nitric oxide-mediated reperfusion injury.
Cardiovasc Res 1999; 43(3): 698-711.
112. Yano Y, Shiba E, Kambayashi J, et al.
The effects of calpeptin (a calpain specific inhibitor) on agonist induced microparticle formation from the platelet plasma membrane.
Thromb Res 1993; 71(5): 385-96.
113. Yoshida K, Inui M, Harada K, et al.
Reperfusion of rat heart after brief ischemia induces proteolysis of caldesmon (nonerythroid spectrin or fodrin) by calpain.
Circ Res 1995; 77(3): 603-10.

114. Zimmerman UJ, Boring L, Pak JH, Mukerjee N, Wang KK
The calpain small subunit gene is essential: its inactivation results in embryonic lethality.
IUBMB Life 2000; 50(1): 63-8.
115. Zimmermann KC, Bonzon C, Green DR
The machinery of programmed cell death.
Pharmacol Ther 2001; 92(1): 57-70.

Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN

Name	Oliver Kurt Götte
Anschrift	Leipziger Straße 103, 10117 Berlin
Geburtsdatum und -ort	14. August 1976 in Bad Hersfeld, Hessen
Familienstand	ledig
Eltern	Dr. med. Michael Götte Renate Götte, geb. Stelzig

SCHULBILDUNG

1982 – 1986	Wilhelm-Neuhaus-Grundschule, Bad Hersfeld
1986 – 1995	Gymnasialer Zweig der Modellschule Obersberg, Bad Hersfeld
1995	Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

HOCHSCHULBILDUNG

Oktober 1995	Aufnahme des Medizinstudiums an der Justus-Liebig- Universität, Gießen
September 1997	Ärztliche Vorprüfung (Physikum)
August 1998	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
April 2001	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
April 2001 – April 2002	Praktisches Jahr
<i>Innere Medizin</i>	Universitätsklinikum Gießen, Internistische Notauf- nahme der Medizinischen Klinik II
<i>Anästhesie</i>	Universitätsklinikum Gießen, Abteilung für Allgemein- chirurgie
<i>Chirurgie</i>	Universitätsklinikum Gießen, Zentrum für Unfallchi- rurgie Brigham and Women's Hospital, Boston, USA Abteilung für Thoraxchirurgie Massachusetts General Hospital, Boston, USA Abteilung für Herzchirurgie
27. Mai 2002	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Oktober 2002 – April 2004	AiP in der Abteilung für Allgemein-, Viszeral-, Gefäß- und Thoraxchirurgie der Charité Campus Mitte, Berlin
seit August 2004	Assistenzarzt am Herz- und Diabeteszentrum Karlsburg (Mecklenburg-Vorpommern), Abteilung für Kardiologie

Synopsis

In this study the effects of the novel calpain inhibitor A-705239 on myocardial reperfusion injury were investigated in isolated rabbit hearts subjected to 45 min of global ischemia and 60 min of reperfusion according to the model of Langendorff.

A-705239 was administered prior to ischemia in three concentrations (10^{-6} M to 10^{-8} M) to the perfusate-compound and myocardial function and cellular integrity in these three treated groups during the time of reperfusion were compared with a non-treated control group. Myocardial function was measured by left ventricular pressure amplitude, coronary flow and heart rate, cell integrity by the activities of creatine kinase and lactate dehydrogenase in the coronary effluence.

We showed that A-705239 given prior to a global ischemia in the concentration of 10^{-8} M leads to significantly higher left ventricular pressures and coronary flow values, lower levels of the release of lactate dehydrogenase and creatine kinase and to an increased survival rates after global ischemia compared to the control the other groups (10^{-6} and 10^{-7} M).

Thus we conclude that the administration of A-705239 prior to ischemia in a 10^{-8} M concentration plays a protective role in the functional and cellular damage caused by ischemia and reperfusion. Due to obvious worse values in the 10^{-6} M group, we compared this group with a 10^{-8} M and a control group without the induction of ischemia and have not found any differences between these groups. To elucidate the possibly protective effect of A-705239 further, mitochondrial function was measured before and after the ischemia

and after reperfusion. According to the prior results mitochondrial dysfunction following ischemia and reperfusion was also markedly attenuated by the inhibitor in a concentration of 10^{-8} M. Thus state-3-respiration only decreased to 4.2 in contrast to 2.6 nmol O₂/(min x mg s.w.) in untreated hearts, reflecting a reduced damage of oxidative phosphorylation. Furthermore, in the presence of the inhibitor the inner mitochondrial membrane became less permeable as indicated by a smaller leak respiration.

Summarized we can say that the excellent properties of A-705239 should make this compound a valuable tool for further pharmacological studies in coherence with cell damage due to ischemia and reperfusion.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. med. Ch. Neuhof und Herrn Prof. Dr. med. H. Neuhof für die Überlassung des Promotionsthemas und der wertvollen kontinuierlichen Betreuung und Unterstützung während der sich mancherorts als kompliziert herausstellenden experimentellen Arbeit und Auswertung, sowie für die mittlerweile leider zu vermissenden Exkursionen in südamerikanische Gefilde .

Weiterhin möchte ich mich bei den Mitarbeitern Herrn H. Michnacs, Frau T. Wieth und Frau A. Weber der Abteilung für Klinische Pathophysiologie und Experimentelle Kardiologie bedanken, die durch ihre engagierte logistische und wertvolle technische Hilfe die Durchführung der vorliegenden Arbeit erst ermöglichten.

Ebenfalls möchte ich Frau Dr. rer. nat. S. Trumbeckaite und Herrn Prof. Dr. F. N. Gellerich aus dem Medizinischen Zentrum für Neurologie der Universität Halle-Wittenberg für die Analyse der mitochondrialen Oxymetrie meinen Dank aussprechen.

Erklärung

„Ich erkläre: Ich habe die vorliegende Dissertation selbstständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich 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.“