Die Protektion gegen den akuten myokardialen Reperfusionsschaden durch Aktivierung der Na⁺/K⁺-ATPase

INAUGURAL-DISSERTATION zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin des Fachbereichs Medizin der

Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Catharina Braun, geb. Heinz aus Trier

Gießen 2013

Aus dem Physiologischen Institut des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Rainer Schulz

> Gutachter: PD Dr. Y. Abdallah Gutachter: Prof. Dr. Dr. T. Braun

Tag der Disputation: 28.10.2014

Für meinen Sohn

and

meinen Ehemann.

1.	Einleitung	Seite	1
1.1	Der akute myokardiale Reperfusionsschaden	Seite	1
1.2	Mechanismen des akuten Reperfusionsschadens auf zellulärer Ebene	Seite	2
1.3	Pathophysiologische Ursachen des Ischämie-Reperfusions- schadens auf zellulärer Ebene	Seite	2
1.3.1	Pathophysiologische Veränderungen während der myokardialen Ischämie	Seite	3
1.3.2	Pathophysiologische Veränderungen während der Reperfusion von ischämisch geschädigten Kardio- myozyten	Seite	4
1.4	Protektionsstrategien gegen den myokardialen Reper- fusionsschaden	Seite	6
1.5	Die Rolle der Na ⁺ /K ⁺ -ATPase bei der Protektion gegen den myokardialen Reperfusionsschaden	Seite	8
1.6	Ziele der Arbeit	Seite	13
2.	Material	Seite	14
2.1	Chemikalien	Seite	14
2.2	Häufig verwendete Medien, Puffer und Lösungen	Seite	15
2.2.1	Zellkulturmedien	Seite	15
2.2.2	Puffer und Lösungen zur Präparation der Kardio- myozyten	Seite	16
2.2.3	Perfusionsmedien	Seite	16
2.3	Geräte und Laborbedarf	Seite	17
3.	Methoden	Seite	20
3.1	Isolierung der Herzmuskelzellen von adulten "Wistar"- Ratten	Seite	20

3.1.1	Versuchstiere	Seite	20
3.1.2	Präparation der Herzmuskelzellen aus dem Ratten- herz	Seite	20
3.2	Zellkulturen	Seite	21
3.3	Fluoreszenzmikroskopische Messungen zur Ermittlung der intrazellulären Ionenkonzentration (Ca ²⁺ und Na ⁺ -Ionen)	Seite	22
3.3.1	Apparative Voraussetzungen	Seite	22
3.3.2	Beladung der Zellen mit den Fluorochromen und Kalibrierung des Fluoreszenzsignals	Seite	23
3.4	Ischämie-/ Reperfusionsexperimente an isolierten Kardiomyozyten	Seite	26
3.4.1	Apparative Voraussetzungen zur Ermittlung der intrazellulären Ionenkonzentration und der Hyper- kontrakturentwicklung	Seite	26
3.4.2	Experimentelles Protokoll der Messung der intrazellulären Ionenkonzentration und der Hyper- kontrakturentwicklung	Seite	26
3.4.3	Protokoll der Ischämie-/ Reperfusionsexperimente mit Messung der intrazellulären Natriumionen- konzentration [Na ⁺] _i	Seite	27
3.4.4	Protokoll der Ischämie-/ Reperfusionsexperimente mit Messung der intrazellulären Kalziumionen- konzentration [Ca ²⁺] _i	Seite	28
3.5	Messparameter der Experimente an isolierten Kardiomyo- zyten	Seite	29
3.6	Messung der Druckverhältnisse am isolierten Herzen bei Perfusion mit hyperkaliämischem Medium nach globaler Ischämie	Seite	30
3.6.1	Präparation der Herzen	Seite	30
3.6.2	Apparative Voraussetzungen zur Ermittlung der Druckverhältnisse im isolierten Herz	Seite	30
3.6.3	Experimentelles Protokoll der Versuche am isolierten Herz	Seite	30
3.6.4	Messparameter der Versuche am isolierten Herz	Seite	31
3.7	Statistik	Seite	31

Inhaltsverzeichnis

4.	Ergebnisse	Seite	32
4.1	Der Einfluss einer erhöhten extrazellulären Kaliumionen- konzentration auf die Aktivität der Na ⁺ /K ⁺ -ATPase	Seite	32
4.2	Die Veränderung der zytosolischen Natrium-Konzentration [Na ⁺] _i während simulierter Ischämie und Reperfusion	Seite	32
4.2.1	Die Beeinflussung der zytosolischen Natrium- konzentration [Na ⁺] _i in isolierten Kardiomyozyten während simulierter Reperfusion	Seite	34
4.3	Veränderungen der Kalziumhomöostase und der Zelllänge in isolierten Kardiomyozyten unter simulierter Ischämie und Reperfusion	Seite	36
4.4	Der Einfluss von erhöhtem extrazellulärem Kalium [K ⁺] _o auf die Kalziumhomöostase und die reperfusionsinduzierte Hyperkontraktur	Seite	38
4.4.1	Die Beeinflussung von [Ca ²⁺] _i während der Reperfusion	Seite	39
4.4.2	Die Beeinflussung der Oszillationsfrequenz während simulierter Reperfusion	Seite	40
4.4.3	Die Beeinflussung der Hyperkontraktur während der Reperfusion	Seite	41
4.5	Das isolierte Herz unter Ischämie/ -Reperfusions- bedingungen	Seite	42
4.5.1	Der Druckverlauf im linken Ventrikel am isolierten Herzen während globaler Ischämie und Reperfusion	Seite	42
4.5.2	Der linksventrikulär entwickelte Druck im Verlauf von globaler Ischämie und Reperfusion	Seite	43
4.5.3	Beeinflussung der Pumpfunktion während globaler Ischämie und Reperfusion durch Variierung der extrazellulären Kaliumkonzentration	Seite	44
5.	Diskussion	Seite	47
5.1	Zusammenfassung der Ergebnisse	Seite	47
5.2	Der myokardiale Reperfusionsschaden unter simulierten Reperfusionsbedingungen	Seite	47
5.3	Die kaliumabhängige Protektion gegen den akuten myokardialen Reperfusionsschaden	Seite	48

5.4	Die kaliumabhängige Protektion gegen den akuten myokardialen Reperfusionsschaden am ganzen Herzen	Seite	53
5.5	Klinische Relevanz der Protektion vor dem post- ischämischen Reperfusionsschaden durch Erhöhung der extrazellulären Kaliumionenkonzentration [K ⁺] _o	Seite	54
6.	Zusammenfassung	Seite	57
7.	Summary	Seite	58
8.	Abkürzungsverzeichnis	Seite	59
9.	Literaturverzeichnis	Seite	62
10.	Erklärung	Seite	73
11.	Danksagung	Seite	74

1. Einleitung

1.1 Der akute myokardiale Reperfusionsschaden

Die koronare Herzkrankheit (KHK) zählt in den Industrienationen zu den häufigsten Todesursachen im Erwachsenenalter. Der akute Myokardinfarkt spielt als Komplikation einer KHK eine vorrangige Rolle. Besonders die ersten Minuten und Stunden nach dem plötzlichen Gefäßverschluss sind mit dem höchsten Sterberisiko verbunden. 20-30 % der Betroffenen sterben schon vor Eintreffen in eine Klinik, etwa 10 % versterben im Verlauf der stationären Therapie [Larsen 2007]. Im Akutgeschehen kommt es zu einem mehr oder weniger großen Verlust der Pumpfunktion. Ursachen hierfür sind entweder der großflächige Untergang von kontraktilem Gewebe oder die bereits innerhalb weniger Sekunden bis Stunden nach dem akuten Verschluss entstehenden gefährlichen ventrikulären Arrhythmien.

In den letzten Jahren konnte in der Kardiologie und präklinischen Notfallmedizin durch eine intensivierte Akuttherapie eine Abnahme der Herzinfarktmorbidität und –mortalität erreicht werden. Die Reperfusion der verschlossenen Herzkranzarterien erfolgt heute medikamentös oder mechanisch durch Einbringung eines Ballonkatheters im Rahmen der perkutanen koronaren Intervention (PCI). In beiden Fällen ist die Therapie darauf ausgerichtet, den akuten Verschluss der Koronararterien, der bei ungefähr 80% aller Infarkte vorliegt [Larsen 2007], so schnell wie möglich zu beheben. Dieses Konzept wurde erstmalig in den 1970'er Jahren durch John Ross's laboratory vorgeschlagen und rasch – zunächst in Europa, dann in den USA – in den klinischen Alltag integriert [Ovize et al. 2010]. Besteht der Sauerstoffmangel im betroffenen Areal bereits 90 Minuten, sind schon 80% des Gewebes nekrotisch. Sechs Stunden nach Infarktbeginn liegt eine komplette Nekrose vor, deren Folgen therapeutisch kaum mehr beeinflussbar ist [Larsen 2007]. Trotz aller bisher möglichen Maßnahmen der interventionellen Kardiologie ist ein Gewebeverlust im Zentrum des ischämisch-reperfundierten Areals noch immer unvermeidlich.

In Tierversuchen wurde bereits seit längerem belegt, dass die Infarktentwicklung in der frühen Reperfusionsphase günstig beeinflusst werden kann [Piper et al. 2004, Garcia-Dorado et al. 2006, Yellon et al. 2007, Hausenloy et al. 2007]. Dies ist in mehreren Studien auch für das menschliche Herz gezeigt worden:

Während der PCI von Patienten mit akutem Myokardinfarkt wurden kurz andauernde Ischämie-Reperfusions-Manöver (60 sec Flow-No flow) durchgeführt, die zu einer signifikanten Reduktion der Infarktgröße um 36 % führten [Staat et al. 2005]. Analog hierzu wurde von Thibault et al. im Jahr 2008 eine Langzeitstudie veröffentlicht. Patienten, die mit diesem sogenannten "Postconditioning" (PC) behandelt wurden, zeigten im Vergleich zur Kontrollgruppe auch mehrere Monate nach der Intervention weiterhin eine reduzierte Infarktgröße und gute Pumpfunktion. Eine Verbesserung der Pumpfunktion und die Reduktion der Infarktgröße konnte ebenfalls durch Applikation von pharmakologisch wirksamen Substanzen gezeigt werden. Die Akute-Phase-Behandlung von Patienten nach PCI mit einer dreitägigen Infusion mit ANP (atriales natriuretisches Peptid) führte unter anderem zu einer Reduktion der Infarktgröße um 14,7 % [Kitakaze et al. 2007]. Piot et al. konnten 2008 bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt zeigen, dass die Bolusgabe von Cyclosporin unmittelbar vor der PCI eine signifikante Reduktion der gemessenen Kreatinkinasewerte und des Infarktareals nach sich. Im klinischen Routineablauf konnte bisher jedoch noch keiner der genannten Ansätze etabliert werden.

1.2 Mechanismen des akuten Reperfusionsschadens auf zellulärer Ebene

Die Folgen von Sauerstoff- und Substratmangel während der Ischämie zeigen sich im histologischen Korrelat als sogenannte "Kontranktionsbandnekrose" [Ganote 1983]. Es kommt zu Nekrosen der Muskelzelle mit Rupturen der Zellmembran und zu sowohl hyperkontrahierten, als auch zerrissenen Myofibrillen. Während den ersten Minuten der Reperfusion entwickelt sich die Hyperkontraktur von isolierten Kardiomyozyten sehr schnell und ist mikroskopisch direkt beobachtbar [Jennings et al. 1960, Siegmund et al. 1991, Piper et al. 2004, Abdallah et al. 2005]. Auch in vivo kann diese sehr frühe Entstehung der Kontraktur während der Reperfusion nachgewiesen werden [Garcia-Dorado et al.1992, 1997]. Eine Reihe von Versuchen deutet darauf hin, dass die oben erwähnte Hyperkontraktur die wesentliche Ursache für die durch die Reperfusion ausgelösten Zellnekrosen der Kardiomyozyten ist. Vorangegangene Experimente mit selektiver pharmakologischer Blockade des kontraktilen Apparates der Zellen zeigten eine signifikante Verbesserung der Pumpfunktion [Garcia-Dorado et al. 1991].

1.3 Pathophysiologische Ursachen des Ischämie-Reperfusionsschadens auf zellulärer Ebene

Während Ischämie und Reperfusion kommt es durch den Mangel an Substraten zu einer Reihe von pathophysiologischen Prozessen. Störungen der Ionenhomöostase,

pH-Wert-Veränderungen und Aktivierung von intrazellulären Signaltransduktionsketten der Kardiomyozyten spielen hier eine große Rolle.

1.3.1 Pathophysiologische Veränderungen während der myokardialen Ischämie

Mit Beginn der Ischämie wird der vorwiegend oxidativ laufende Stoffwechsel der Kardiomyozyten unterbrochen. Die nun einsetzende anaerobe Energiegewinnung kann den Bedarf der Zelle nicht decken und es kommt zusätzlich zu einer Übersäuerung durch Bildung von Milchsäure [Dennis et al. 1991, Owens et al. 1996]. Die intrazelluläre Akkumulation von Protonen hemmt nun zusätzlich die ohnehin schon geringe ATP-Bildung über die Inhibition der Phospho-Fructokinase, dem Schlüsselenzym der Glykolyse [Fidelman et al. 1982]. Bei einem Absinken der zytosolischen ATP-Konzentration auf Werte < 100 µmol/l kommt es durch Ausbildung von passageren Querbrücken als "Rigorbrücken" zu einer Kontraktion der Kardiomyozyten auf ca. 70 % der Ausgangslänge, der sogenannten Rigor-Kontraktur [Nichols et al. 1990, Altschuld et al. 1991]. Diese Kontraktion verursacht zunächst keine ausgeprägten strukturellen Schäden, führt aber zu Defekten des Zytoskeletts, die die Zelle letztendlich anfälliger für mechanische Belastungen machen [Schlüter et al. 1996].

Die Verminderung des zytosolischen ATP-Gehaltes führt während der Ischämie neben der Kontraktion der Myofibrillen zeitgleich zur funktionellen Einschränkung aller primär aktiven Transportmechanismen. Durch die bzw. sekundär Hemmuna der sarkolemmalen Na⁺/K⁺-ATPase (NKA) kommt es zu einem Zusammenbruch des Na⁺-Gradienten, was zu einer Natrium-Akkumulation im Zytosol führt. Die Aktivierung des Na⁺/Ca²⁺-Austauschers (NCX) im "Reverse-Mode" ist die Folge und so stellt sich im Verlauf der Ischämie eine Überladung des Zytosols mit Kalzium um ein bis zwei Zehnerpotenzen ein [Siegmund et al. 1994, Schäfer et al. 2001]. Dies wiederum kann in der Reperfusion zu einer Überaktivierung verschiedener kalziumabhängiger Prozesse führen, z.B. des kontraktilen Apparates oder verschiedener Proteasen wie z. B. Calpain [Siegmund et al. 1994, Schäfer et al. 2001, Ladilov et al. 1995, Inserte et al. 2002, 2005]. Während der Ischämie jedoch wirkt die Azidose als endogener Schutz zu starker Aktivierung solcher schädigender Prozesse entgegen [Ladilov et al. 1995, Rupprecht et al. 2000, Inserte et al. 2009]. Diese Mechanismen sind in Abbildung 1 zusammengefasst.



Abb.1 zeigt die Mechanismen der zytosolischen Ca^{2+} -Überladung in Kardiomyozyten. (NHE, Na⁺/H⁺-Austauscher: NCX (RM). Reverse mode Na⁺/Ca²⁺-Austauscher).

1.3.2 Pathophysiologische Veränderungen während der Reperfusion von ischämisch geschädigten Kardiomyozyten

In der Herzchirurgie wurde schon lange beobachtet, dass intraoperativ reperfundierte Herzen in der ersten Minuten nach einer längeren Zeit der Ischämie oder einer unzureichenden intraoperativen kardioplegischen Behandlung das sogenannte "stoneheart"-Phänomen zeigten. Dies wurde durch eine massive Muskelkontraktur des gesamten Myokards verursacht. Histologisch betrachtet zeigten sich hier hyperkontrahierte Myofibrillen und rupturierte Zellmembranen. Dieser Muster aus Kontrakturen und nekrotischen Zellschäden weisen Kardiomyozyten nach regionaler Ischämie und Reperfusion im Myokard auf – bezeichnet als "Kontraktionsband-Nekrose". Wird das ischämisch geschädigte Myokard reperfundiert, erfolgt eine Reenergetisierung der Kardiomyozyten, die zahlreiche physiologische aber auch pathophysiologische Prozesse nach sich zieht. Durch die Bereitstellung von ATP werden die Kationenpumpen, z.B. Na⁺/K⁺-ATPase, sarkolemmale Ca²⁺-ATPase und Ca²⁺-ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums (SERCA) sowie sekundär aktive Transportmechanismen wieder aktiviert. Der transsarkolemmale Na⁺-Gradient wird wieder aufgebaut, angereicherte Ionen und Metaboliten werden mit Beginn der Reperfusion ausgewaschen.

Bei der Entstehung des myokardialen Reperfusionsschadens ist die Störung der zytosolischen Kalziumhomöostase [Siegmund et al. 1992, Piper et al. 2004] zusammen mit der Öffnung der mitochondrialen Permeabilitäts-Transitions-Poren (mPTP) von besonderer Bedeutung. Dies führt zu Hyperkontraktur und Zellnekrose [Abdallah et al. 2011]. In der frühen Phase der Reperfusion spielt die Ca²⁺-ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums (SERCA) im Hinblick auf die Dysfunktion der Ca2+regulierenden Mechanismen eine große Rolle. Zu Beginn der Reperfusion und der damit verbundenen Wiederaufnahme des oxidativen Stoffwechsels der Mitochondrien werden die während der Ischämie akkumulierten Ca²⁺-Ionen durch Reaktivierung der SERCA schnell ins sarkoplasmatische Reticulum (SR) gepumpt. Aufgrund der begrenzten Speicherkapazität des SR kommt es bei Überladung zu einer erneuten schlagartigen Freisetzung von Ca²⁺-Ionen ins Zytosol. Dieser sich wiederholende Vorgang ist experimentell im reperfundierten Kardiomyozyten in Form von sogenannten Ca²⁺-Oszillationen messbar. Hinzu kommen die während Ischämie und Reperfusion entstehenden reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). Sie beeinträchtigen durch ihre Interaktionen mit zahlreichen Molekülen und Verbindungen Zellmembran, Rezeptoren und Stoffwechselvorgänge [Schmidt/ Lang/ Heckmann 2010].

In Anwesenheit von ATP und Erholung des pH-Wertes führen die hohen Spikes der Ca²⁺-Oszillationen zu einer Aktivierung des kontraktilen Apparates – es kommt zur Auslösung der Hyperkontraktur [Siegmund et al. 1992, 1997, Ladilov et al. 1995, Schäfer et al. 2001, Abdallah et al. 2005, 2006, Piper et al. 2006, 2008]. Folgen der Hyperkontraktur sind eine mechanische Schädigung z.B. Rupturen des Sarkolemm, Beschädigungen des Zytoskeletts und eine irreversible Zellverkürzung. In vivo bleiben die Schäden nicht auf eine einzelne Zelle beschränkt, sondern dehnen sich bedingt durch die morphologischen Besonderheiten der Kardiomyozyten im Zellverband aus. So kann die Hyperkontraktur einer Zelle zu sarkolemmaler Zerreißung von intakten

Nachbarzellen führen wodurch letztendlich das eigentliche bei einem Myokardinfarkt betroffene Areal deutlich vergrößert wird.

Mitochondriale Permeabilität-Transitions-Poren (mPTP) sind Kanäle, die eine direkte Verbindung des Zytosols mit der mitochondrialen Matrix herstellen. Sie sind für große Moleküle bis 1,5 kDa durchgängig. Der durch die Ca²⁺-Oszillationen ausgelöste Einstrom von Kalzium in die Mitochondrien kann zur Öffnung der mitochondrialen Permeabilität-Transition-Poren (mPTP) führen [Halestrap et al. 2004, Davidson et al. 2011, 2012, Abdallah et al. 2011]. Dies geschieht schon in den ersten Minuten der Reperfusion, jedoch nicht in jeder Zelle und nicht an allen Mitochondrien einer Zelle gleichzeitig [Di Lisa et al. 2001, Griffiths et al. 2009]. Die Öffnung der mPTP verhindert nicht nur eine Restitution des aeroben Zellstoffwechsels und der Ionenhomöostase, sondern fördert sogar die Ca²⁺-Oszillationen [Abdallah et al. 2011]. Dies endet im Zelltod im absoluten Energiemangel [Piper et al. 2008]. Wird das Öffnen der mPTP pharmakologisch verhindert, zum Beispiel durch Cyclosporin A, führt dies zu einer Reduktion der Infarktgröße [Piot et al. 2008].

1.4 Protektionsstrategien gegen den myokardialen Reperfusionsschaden

Zahlreiche experimentelle Studien haben in den vergangenen beiden Jahrzehnten gezeigt, dass eine Protektion gegen den myokardialen Reperfusionsschaden während der Reperfusion möglich ist:

Hemmung des kontraktilen Apparates:

Die Hyperkontraktur kann durch die Gabe von BDM (2,3-Butanedione monoxime), einer chemischen Phosphatase, die direkt die myofibrilläre Aktivierung hemmt, weitgehend verhindert werden [Siegmund et al. 1991, Garcia-Dorado et al. 1992, Tani et al. 1996]. Die Hemmung der p38 MAP-Kinase durch SB-203580 führt ebenfalls zu einer Dysregulation des kontraktilen Systems und damit zu einem kardioprotektiven Effekt [Sumida et al. 2005].

Verzögerung der zellulären pH-Wert-Erholung:

Eine gleichzeitige Inhibition des Na⁺/H⁺-Austauschers (NHE) sowie des Na⁺/HCO³⁻ Cotransporters und eine damit verbundene verzögerte pH-Erholung vermindert Ca²⁺-Oszillationen und Hyperkontraktur [Ladilov et al. 1995, Siegmund et al. 1997, Schäfer et al. 2000]. Aktuellere Studien zeigen, dass die protektive Wirkung einer verzögerten pH-Wert-Erholung während der Reperfusion in einer verzögerten Öffnung der mPTP liegt [Fujitah et al. 2007, Shahzad et al. 2013].

Reduktion der zytosolischen Ca²⁺-Verfügbarkeit:

Die Aktivierung des zellulären cGMP (zyklisches Guanosin-Monophosphat) -Signalweges durch Aktivierung der PKG (Proteinkinase G) bewirkt eine Reduktion der Ca²⁺-Oszillationen durch verstärkte bzw. gesteigerte Aufnahme von Ca²⁺-Ionen in das sarkoplasmatische Retikulum und hat somit einen protektiven Effekt auf die Hyperkontrakturentwicklung [Hempel et al. 1997, Inserte et al. 2000, Padilla et al. 2001].

Aktivierung protektiver Signalwege in der Reperfusion:

Zahlreiche Rezeptor-Agonisten haben sowohl in vivo als auch in vitro einen positiven Einfluss auf den myokardialen Reperfusionsschaden, indem sie letztendlich bestimmte zelluläre Proteinkinasen aktivieren oder hemmen. Zu diesen Proteinkinasen gehören die Proteinkinase G (PKG), die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) und die Glykogen-Synthase-Kinase-3ß (GSK-3ß). Eine Stimulation der Proteinkinase G (PKG) durch zum Beispiel NO-Donatoren [Schlüter et al. 1994, Agulló et al. 1999] und einige natriuretische Peptide [Hempel et al. 1997, Padilla et al. 2001] reduziert den myokardialen Reperfusionsschaden in vitro und in vivo. Die Proteinkinase PI3K kann durch Insulin, Adenosin und Bradykinin stimuliert werden [Sack/Yellon et al. 2003, Park et al. 2006]. Bei der GSK-3ß wird der kardioprotektive Effekt durch eine Hemmung derselben bewirkt [Zhu et al. 2011]. Als Endpunkt der Signalkaskade scheint das sarkoplasmatische Retikulum (SR) eine bedeutende Rolle zu spielen. Hier führt eine gesteigerte Seguestrierung von Ca2+-Ionen in das SR zu einer Verringerung der Ca2+ Oszillationen, die wiederum Auslöser der Hyperkontraktur sind. Die Wertigkeit der unterschiedlichen protektiven Signalkaskaden wird noch kontrovers diskutiert und ist abhängig von der jeweils untersuchten Spezies, dem experimentellen Modell und Versuchsprotokoll [Ovize et al. 2010].

Hemmung der "mitochondrialen Permeabilitäts-Transitions-Poren" (mTPT):

Ein weiterer Signalweg, der ebenfalls zum SR als Endorganell führt, reguliert die Öffnung von sogenannten "mitochondrialen Permeabilitäts-Transitions-Poren" (mPTP) der Mitochondrien. Die Struktur der mPTP ist bisher noch nicht vollständig bekannt. Eine Öffnung der Ca²⁺-abhängigen mPTP [DiLisa et al. 2009] verursacht durch Verlust der mitochondrialen Ionen- und Stroffwechselkompartimentierung einen Zusammenbruch der Energieproduktion [Abdallah et al. 2006, Piper et al. 2008]. Das Protein Cyclophillin-D ist einer der bisher bekanntesten Regulatoren zur Öffnung der mPTP. Es kann durch Cyclosporin-A (CSA) gehemmt werden. Eine Inhibierung der mPTP-Öffnung durch CSA zeigte einen kardioprotektiven Effekt gegen den Reperfusionsschaden [Griffith et al. 1995, DiLisa et al. 2006, Baines et al. 2009, Halestrap et al. 2009, Hausenloy et al. 2012]. Dieses Konzept wurde bereits erfolgreich klinisch getestet [Piot et al. 2008]. Weitere Arbeiten haben gezeigt, dass auch Rotenone, ein Hemmstoff des Komplex I der mitochondrialen Atmungskette, in Kombination mit CSA einen synergistischen protektiven Effekt hat [Teixeira et al. 2013]. Dies wird ebenfalls durch die Gabe von Ru 360 erreicht. Ru 360 blockiert die mitochondriale Aufnahme von Kalzium und verhindert so ein Öffnen von mPTP [Garcia-Rivas et al. 2006, Abdallah et al. 2011].

Postconditioning (PC):

Zu den kardioprotektiven Strategien gehört ebenfalls das sogenannte "Postconditioning" (PC), dass zuerst von Na et al. 1996 beschrieben wurde. Hierbei wird die Reperfusion zu Beginn durch eine Folge kurzer Ischämieperioden unterbrochen. Der protektive Effekt zeigt sich hierbei in erster Linie in einer Verringerung der Apoptose und der Kontraktur sowie einer Senkung der koronaren Endotheldysfunktion und einer Reduktion von Gewebsödemen [Zhao et al. 2003, Halkos et al. 2004]. Dies wiederum wird der Aktivierung von verschiedenen Protein- und Phosphatasen-Signalkaskaden zugeschrieben [Ovize et al 2010]. So konnte beispielsweise durch Inserte et al. 2005 und 2009 gezeigt werden, dass PC die Ca²⁺-abhängige Protease Calpain beeinflusst. Eine Aktivierung von Calpain während der Reperfusion führt zu Zellrupturen, sarkolemmaler Fragilität und zu einer Hemmung der NKA. Bereits in kleinen klinischen Studien angewandt wurde PC unter anderem von Staat et al. 2005, Thibault et al. 2008, Zhao et al. 2010 und Lønborg et al. 2010. Ein weiterer Effekt des PC wird in der Verlängerung der Azidose gesehen. Protonen verhindern bereits während der Ischämie die Öffnung der mPTP, desensibilisieren die Myofibrillen des kontraktilen Apparates und verringern die Aufnahme von Kalzium ins SR [Shahzad et al. 2013].

1.5 Die Rolle der Na⁺/K⁺-ATPase bei der Protektion gegen den myokardialen Reperfusionsschaden

Neben umfangreichen Studien zu zellulären Signalkaskaden wurden in den letzten Jahrzehnten ebenfalls verschiedene Protektionsstrategien auf Ebene der aktiven und sekundär aktiven Transportproteine der Zellmembran untersucht.

Die Stabilität der natürlichen Ionengradienten zwischen Intra- und Extrazellularraum wird durch aktive Transportprozesse erreicht. Die Na⁺/K⁺-ATPase (NKA) stellt an praktisch allen Plasmamembranen verschiedener Zelltypen, so auch bei Kardiomyozyten, eine intrazellulär niedrige Na⁺-Konzentration und eine hohe K⁺-Konzentration sicher (Tab. 1).

Kation	Intrazellularraum	Extrazellularraum
Ca ²⁺	10 ⁻⁸ – 10 ⁻⁷ mol/l	2 mmol/l
Na⁺	12 mmol/l	145 mmol/l
K⁺	155 mmol/l	4 mmol/l

Tab. 1: Intra- und extrazelluläre Konzentration der wichtigsten Kationen einer Warmblütermuskelzelle [Schmidt/Lang/Heckmann, 2010].

Der so ausschließlich durch die NKA erzeugte Na⁺-Gradient zwischen dem Zytosol und dem Extrazellularraum dient unter anderem zum Antrieb sekundär aktiver Transportprozesse der Zelle. Die Besonderheit der an der Zellinnenseite gelegene Na⁺/K⁺- ATPase (NKA) besteht wie bereits beschrieben in der Aufrechterhaltung des transsarkolemmalen Natriumgradienten. Sie transportiert unter Spaltung von ATP in ADP und Phosphat pro Zyklus 3 Na⁺ aus der Zelle und 2 K⁺ in die Zelle.

Morphologie:

Das Enzym besteht aus drei Untereinheiten, die wiederum in mehreren Isoformen vorliegen. Es wird derzeit angenommen, dass die Isoenzyme in einer Zelle nicht nur räumlich, sondern funktionell getrennt sind. So finden sich Isoenzyme mit α 1-Untereinheit vermehrt im Sarkolemm, während Isoenzyme mit α 2-Untereinheit in den T-Tubuli von Kardiomyozyten vorkommen. [Fuller et al. 2012]. Kardiomyozyten der Ratte weisen hauptsächlich α 1- und α 2-Isoformen auf [Glitsch 2001].

Die α -Untereinheit mit bisher 4 beschriebenen Isoenzymen bindet ATP, Na⁺, K⁺, Herzglykoside und spezifische Inhibitoren und ist für die Phosphorylierung und den Kationentransport zuständig. Sie bestimmt die pharmakologischen Charakteristika. Die β -Untereinheit mit bisher 3 bekannten Isoformen spielt eine wichtige Rolle bei der Insertion der α -Untereinheit in der Zellmembran. Es gibt inzwischen Hinweise, dass die β -Untereinheit ebenfalls den aktiven Transportprozess moduliert [Suhail et al. 2010]. Die hydrophile γ -Untereinheit scheint nicht in allen Gewebetypen Bestandteil der NKA zu sein. Eine Gruppe von kleinen bisher 7 verschiedenen Membranproteinen, die sogenannten FXYD-Proteine, sind aktuell Gegenstand zahlreicher Studien, da sie vermutlich maßgeblich an der Regulation der Pumpe beteiligt sind. Es ist bisher noch nicht hinreichend geklärt, ob diese FXYD-Proteine ein fester Baustein der NKA sind oder nicht [Fuller et al. 2012]. Phospholemman (PLM, FXYD1) wurde als eines dieser FXYD-Proteine entdeckt und modifiziert die Transporteigenschaften der NKA.



Abb. 2: Schematischer Darstellung der Natrium-Kalium-ATPase (NKA) bestehend aus 2 α -, 2 β - und 2 γ -Untereinheiten. Modifiziert nach Suhail 2010.

Modulation der Na⁺/K⁺-ATPase:

Aufgrund der zentralen Rolle der NKA sind vielfältige physikalische, biochemische und pharmakologische Einflussfaktoren auf das Enzym beschrieben worden. So ist der ATP-generierte Transportprozess der NKA ist stark temperaturabhängig [Yamamoto et al. 2009]. Charakteristisch ist ebenfalls die Beeinflussung durch unterschiedliche Ionenkonzentrationen im Intra- und Extrazellularraum und elektrische Erregung insbesondere bei neuromuskulären Zellen [Fuller et al. 2012].

Pharmakologisch wird das Enzym neben Katecholaminen [Bundgaard et al 2010] stimuliert durch Insulin, NO-Donoren, ACE-Hemmern, Aldosteron-Antagonisten, Angiotensin-Rezptorblockern und Insulin [Schmidt et al. 1998, Rasmussen et al. 2007]. Herzglykoside wie zum Beispiel Ouabain inhibieren die NKA über spezifische Bindungsstellen an der α-Untereinheit und haben über die sekundäre Aktivierung des Na⁺/Ca²⁺-Austauschers eine positiv inotrope Wirkung. Dieser Effekt wurde therapeutisch bei der Behandlung der chronischen Herzinsuffizienz genutzt. In Kardiomyozyten der Ratten hat die NKA jedoch eine niedrige Affinität zur Bindung von Herzglykosiden [Schmidt et al. 1998]. Diese spezifischen Bindungsstellen für Herzglykoside legen den Schluss nahe, dass es bisher noch nicht bekannte, zelleigene Liganden für diesen Rezeptor gibt [Löffler/ Petrides/ Heinrich 2007].

In aktuelleren Studien zeigt sich, dass die NKA auch eine nicht unerhebliche Rolle in zellulären Signaltransduktionsketten spielt [Zhang et al. 2008, Zheng et al. 2011, Reinhard et al. 2012]. Durch die Proteinkinase A (PKA), einem Enzym das in seiner aktiven Form eine Reihe von Proteinen phosphoryliert, wird die adrenerge Wirkung auf die NKA übertragen. Je nach extrazellulärer Kaliumkonzentration wurde durch verschiedene Studien eine hemmende oder aktivierende Wirkung der PKA auf die NKA beschrieben [Fuller et al. 2012]. Die Proteinkinase C (PKC), ein weiteres Enzym das Bestandteil von zellulären Signaltransduktionsketten ist, beeinflusst die NKA wie die PKA durch Phosphorylierung der α -Untereinheit. Am Herzen wurde sowohl eine hemmende als auch eine aktivierende Wirkung auf die NKA beschrieben. Die Reaktion der PKC ist Ca²⁺-abhängig [Fuller et al. 2012].

Weiterhin ist eine Beeinflussung der NKA durch NO (Aktivierung) [William et al. 2005], oxidativen Stress (ROS, Hemmung) [Fuller et al. 2003] und Lipide (Aktivierung) [Fuller et al. 2012] beschrieben.

Einen Forschungsschwerpunkt bilden seit einigen Jahren Studien zu Phospholemman (PLM). PLM oder auch FXYD1 wurde wie bereits oben beschrieben als eine der sieben verschiedenen γ-Untereinheiten der NKA identifiziert. PLM ist ein Substrat für die beiden Enzyme PKA und PKC. Unphosphoryliertes PLM inhibiert die kardiale NKA, phosphoryliertes PLM aktiviert die NKA [Despa et al. 2005, Bossuyt et al. 2009].

Zusätzlich zu der komplexen Modulation der NKA durch verschiedene Proteine oder Enzyme spielt die extra- und intrazelluläre Ionenhomöostase insbesondere der Kationen Na⁺, K⁺ und Ca²⁺ eine wesentliche Rolle.

Verschiedene Arbeitsgruppen haben gezeigt, dass eine Erhöhung der intrazellulären Na⁺-Konzentration zu einer Aktivierung der NKA führt [Gadsby et al. 1984, Glitsch et al. 1986]. Ebenso konnte in mehreren Studien gezeigt werden, dass eine Erhöhung der extrazellulären K⁺-Konzentration zu einer Aktivierung der NKA führt [Nakao et al. 1989, Han et al. 2009].

Neben der NKA ist vor allem die Ca²⁺-ATPase am sarkoplasmatischen Retikulum (SERCA) zu erwähnen, die für die Regulation der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration von großer Bedeutung ist. Ein Dissoziation der Ca²⁺-Ionen von den Myofibrillen in das SR sowie den extrazellulären Raum ist für die Relaxation der Muskelfasern zwingend erforderlich. Neben der SERCA sind noch drei weitere Wege zur Extrusion von zytosolischem Kalzium bekannt, nämlich die Ca²⁺-ATPase des Sarkolemm und der mitochondriale Ca²⁺-Uniporter. Sie spielen beim Transport von Kalzium aus dem Zytosol jedoch eine eher untergeordnete Rolle [Siegmund et al. 1994, Blaustein et al. 1999, Bers et al. 2006, Han et al. 2009]. Der Hauptteil des Kalziums wird über den Na⁺/Ca²⁺-Austauscher (NCX) aus der Zelle geschleust. In Kardiomyozyten von Ratten werden 92% der zytosolischen Kalziumionen durch die SERCA eliminiert und 7% durch den NCX. Diese prozentuale Verteilung ist abhängig von der Spezies [Bers et al. 2006].

Beim sogenannten "Forward-Mode" des NCX (auch Ca²⁺–Exit-Mode genannt) wird 1 Ca²⁺-Ion gegen 3 Na⁺-Ionen aus der Zelle geschleust. Der NCX arbeitet bei hohen intrazellulären Ca²⁺-Konzentrationen im "Forward-Mode". Bei hohen intrazellulären Na⁺-Konzentrationen und einem positivem Membranpotential wird hingegen der "Reverse-Mode" (auch "Ca²⁺-Entry-Mode" genannt) aktiviert [Bers et al. 2006]. Der "Reverse-Mode" transportiert 1 Ca²⁺-Ion gegen 3 Na⁺-Ionen in die Zelle [Blaustein 1999, Kang et al. 2004].

Es konnte schon vor einigen Jahren experimentell von verschiedenen Gruppen [Siegmund et al. 1994] deutlich gezeigt werden, dass eine Dysfunktion von NKA und NCX von großer Bedeutung für die Entstehung des myokardialen Reperfusionsschadens sind. Frühere Arbeiten unserer Arbeitsgruppe [Schäfer et al. 2001] ergaben, dass der sogenannte "Reverse-Mode" des NCX in der Frühphase der Reperfusion eine spielt. Die Reverse-Mode-Aktivierung ist an der Entstehung aroße Rolle hochfrequenter Oszillationen und somit an der Hyperkontrakturentwicklung beteiligt. Sie ist unter anderem abhängig von der zytosolischen Na⁺-Überladung. NKA und NCX sind hierbei in Form eines Tandemmechanismus zur Extrusion von Kalziumionen funktionell miteinander verbunden. Die treibende Kraft für die Funktion des NCX stellt der transsarkolemmale Natriumgradient dar, der durch die NKA aufrechterhalten wird. Im Gegensatz zur normalen Zellfunktion und einem physiologischen Zusammenspiel von NKA und NCX, bzw. dem Vorhandensein eines stabilen Na⁺-Gradienten, bewirken die treibenden Kräfte zur Wiederherstellung der Ionenhomöostase bei energetisch erschöpften Kardiomyozyten in den ersten Minuten der Reperfusion eine Aktivierung des "Reverse Mode" des NCX. Dies führt durch zusätzlichen Einstrom von Kalzium zu einer deutlichen Zunahme des Ionenungleichgewichts, was sich durch Entstehung der hochfrequenten Ca²⁺-Oszillationen und einer starken Hyperkontrakturentwicklung zeigt.

Deshalb stellte sich die Frage, ob eine Aktivierung der Na⁺/K⁺-ATPase die Aktivierung des Reverse Mode verringern und somit die Oszillationsfrequenz und damit die Hyperkontraktur vermindert.

1.6 Ziele der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war, zu untersuchen ob eine Aktivierung der Na⁺/K⁺-ATPase durch Erhöhung der extrazellulären K⁺-Konzentration eine verstärkte Extrusion von zytosolischem Natrium zur Folge hat, ob diese beschleunigte Na⁺-Erholung die zytosolische Ca²⁺-Homöostase beeinflusst und wie sich dies auf den myokardialen Reperfusionsschaden auswirkt.

Am Modell isolierter Kardiomyozyten adulter Wistar-Ratten und in isolierten Herzen im Langendorff-Model der gleichen Tierart wurde analysiert, ob die Erhöhung der extrazellulären K⁺-Konzentration nach dem oben beschriebenen Mechanismus Einfluss hat auf

- 1) die intrazelluläre Na⁺-Konzentration,
- 2) die zytosolische Ca²⁺-Homöostase,
- 3) die Entwicklung der Hyperkontraktur und
- 4) und ob die Ergebnisse auf das isolierte Herz übertragbar sind.

2. Material

2.1 Chemikalien

Die folgenden Chemikalien wurden bei den Versuchen der vorliegenden Arbeit sowie bei der Zellpräparation und –kultur verwendet. Sie wurden nach Herstellerangaben gelöst und aufbewahrt.

Albumin (aus Rinderserum)	Roche Applied Science, Mannheim
CaCl ₂ (Kalziumchlorid)	Carl Roth, Karlsruhe
Cystein	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
EGTA (Ethylene-bis(oxyethylenenitrilo)-	
tetraacetic acid)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
FCS (fetal calf serum)	PAA Laboratories, Cölbe
Fura-2 AM	Invitrogen, Karlsruhe
Glucose	Merck, Darmstadt
Gramicidin D	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
HEPES (Hydroxyethylpiperazin-Ethan-	
sulfonsäure)	Roche Applied Science, Mannheim
KCI (Kaliumchlorid)	Carl Roth, Karlsruhe
KH ₂ PO ₄ (Kaliumdihydrogenphosphat)	Fluka, Schweiz
Karnitin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Kollagenase Typ CLS II, (322U/mg)	Biochrom KG, Berlin
Kreatin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
MgSO₄ (Magnesiumsulfat)	Carl Roth, Karlsruhe
Medium 199	Biochrom KG, Berlin
N ₂ (Stickstoff)	Linde, München
NaCI (Natriumchlorid)	Carl Roth, Karlsruhe
NaHCO ₃ (Natriumhydrogenkarbonat)	Carl Roth, Karlsruhe

L

g/l

+

Ouabain (g-Strophanthin)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Penicillin	Gibco BRL, Eggenstein
Resazurin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
SBFI (Sodium-binding benzofuran	
isophthalate)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Streptomycin	Gibco BRL, Eggenstein
Taurin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

2.2 Häufig verwendete Medien, Puffer und Lösungen

2.2.1 Zellkulturmedien

1.	<u>Medium 199 - Stammlösung:</u>	
	Aqua dest.	1,0
	Medium 199	9,6

2. <u>CCT / HEPES-Stammlösung:</u>

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

Diese Lösung wurde auf pH-Wert 7,4 titriert.

3. Vorplattierungsmedium:

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

4. Ausplattierungsmedium:

CTT / HEPES- Stammlösung

Penicillin	100 IU/ml
Streptomycin	10 µg/ml

Alle Zellkulturmedien wurden sterilisiert und bei 4°C aufbewahrt.

2.2.2 Puffer und Lösungen zur Präparation der Herzmuskelzellen

<u>Ca²⁺-Sta</u>	mmlösung:	
CaCl ₂		100,0 mmol/l
Powell-M	<u>ledium:</u>	
	Glucose	11,0 mmol/l
	KCI	2,6 mmol/l
	KH ₂ PO ₄	1,2 mmol/l
	MgSO ₄	1,2 mmol/l
	NaCl	110,0 mmol/l
	NaHCO ₃	25,0 mmol/l
<u>Kollagen</u>	asepuffer:	
	Powell-Medium	50 ml
	Kollagenase	20 mg

Alle Medien wurden auf pH-Wert 7,4 titriert, sterilisiert und bei 4°C aufbewahrt.

2.2.3 Perfusionsmedien

Für unsere Untersuchungen wurden verschiedene Perfusionsmedien benutzt, deren Zusammensetzung im Folgenden beschrieben wird. Der pH-Wert wurde jeweils bei 37°C auf den gewünschten Wert titriert.

1. Normoxische HEPES-gepufferte Tyrode-Lösung:

Ca²⁺ Stammlösung

CaCl ₂	1,0 mmol/l
Glucose	2,5 mmol/l

12,5 µl

2. Material

HEPES	25,0 mmol/l
KCI	2,6 mmol/l
KH ₂ PO ₄	1,2 mmol/l
MgSO ₄	1,2 mmol/l
NaCl	125,0 mmol/l

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

2. Anoxische HEPES-gepufferte Tyrode-Lösung:

CaCl ₂	1,0 mmol/l
HEPES	25,0 mmol/l
KCI	2,6 mmol/l
KH ₂ PO ₄	1,2 mmol/l
MgSO ₄	1,2 mmol/l
NaCl	125,0 mmol/l

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

Das anoxische Medium wurde nach der von Allshire et al. [1987] beschriebenen Methode autoklaviert. Vor dem Autoklavieren wurde Resazurin (1% vol/vol) und Cystein (5,0 mmol/l) zugesetzt und so lange mit N_2 begast, bis ein Farbumschlag von lila nach rosa sichtbar wurde. Anschließend wurde die Tyrode-Lösung in dampfdrucktauglichen Gefäßen für 40 min bei 2 bar autoklaviert.

2.3 Geräte und Laborbedarf

Zellkultur und Isolierung der Herzmuskelzellen:

Brutschrank	Kendro, Hanau	
Deckgläser	Menzel, Braunschweig	
Gewebehacker	Harvard Apparatus über Hugo	
	Sachs Elektronik, March-Hugstetten	
Langendorff-Apparatur	Eigenbau Werkstatt	
	Physiologisches Institut Gießen	
Mikroskop	TMS-F, Nikon, Japan	

2. Material

Nylonnetz	NeoLab, Heidelberg
Präparationsbesteck	Eickenmeyer, Tuttlingen
Sterilbank	Kendro, Hanau
<u>Fluoreszenzmessung:</u>	
AR-Cation Measurement System	Spex Industries, Grasbrunn
IBM PC / AT -based data Analyse System	Spex Industries, Grasbrunn
Modell DM3000CM	
Inverses Mikroskop	Diaphot TMD, Nikon, Düsseldorf
Photomultiplier	Spex Industries, Grasbrunn
Zell-Längen-Messung:	
Monitor	Sony, Frankfurt
Videokamera	Sony, Frankfurt
Videoprinter	Sony, Frankfurt
Anoxie-Reoxygenationsexperimente:	
Dampfdruckkochtopf	All American, Canada
Druckstabile Glasgefäße mit	Bormiolli Rocco, Italien
verschließbarem Deckel	
Edelstahlkapillaren	Alltech, Unterhaching
Gasdichte Schläuche	Kalensee, Gießen
Gasventile	Kalensee, Gießen
Perfusionskammer	Eigenbau Werkstatt
	Physiologisches Institut Gießen
Peristaltikpumpe	Gilson-Abimed, Langenfeld
Plattenlesegerät MR 7000	Dynatech, Denkendorf
UV/ VIS Spektrometer	Perkin Elmer, Überlingen
Sonstige Geräte:	

Druckwandler 43600 F

Druckkatheter Cordis 5F

Baxter, Niederlande Cordis, Miami, FI, U.S.A. Glasgeräte Heizrührer Inkubator Perfusionsheizung

pH-Meter Pipetten Wasserbad Wasserdemineralisierungsanlage Zentrifugen

Verbrauchsmaterialien:

Kulturschalen, Typ Falcon 3001 Pipettenspitzen Schott, Mainz Jahnke & Kunkel, Staufen Kendro, Hanau Eigenbau Werkstatt PhysiologischesInstitut Gießen WTW, Weinheim Eppendorf-Nethler-Hinz, Hamburg Julabo, Seelbach Millipore, Eschborn Heraeus, Hanau

Becton Dickinson, Heidelberg Eppendorf-Nethler-Hinz, Hamburg

3. Methoden

3.1 Isolierung der Herzmuskelzellen von adulten "Wistar"-Ratten

3.1.1 Versuchstiere

Zur Gewinnung der im Modell verwendeten ventrikulären Herzmuskelzellen wurden männliche, 200-300 g schwere, adulte "Wistar"-Ratten benötigt. Diese Ratten wurden im Tierstall des Physiologischen Institutes der Justus- Liebig Universität gezüchtet und hatten freien Zugang zu Nahrung (Teklad Global 2018 der Firma Harlan Teklad) und Wasser.

3.1.2 Präparation der Herzmuskelzellen aus dem Rattenherz

Die ventrikulären Kardiomyozyten wurden nach der von Schlüter und Schreiber (2005) beschriebenen Methode isoliert:

Vorbereitung:

Vor Beginn der Präparation erfolgte die Spülung der Langendorff-Perfusionsanlage mit Powell-Medium (siehe 2.2.2.). Im Anschluss wurde die Anlage luftblasenfrei mit 80 ml der gleichen Lösung aufgefüllt und auf 37°C erwärmt. Zu allen Zeitpunkten erfolgte eine Begasung des Powell-Mediums mit Carbogen, um einen konstanten pH-Wert von 7,4 zu gewährleisten.

Präparation:

Zur Durchführung der Präparation wurden die einige Minuten mit Ether narkotisierten Tiere bei ausreichender Narkosetiefe durch Genickbruch getötet. Danach wurde der Thorax eröffnet und das Perikard entfernt. Herz und Lunge wurden angehoben, mit einer Schere vom Körper getrennt, und sofort in 4°C kalte physiologische NaCI-Lösung überführt, um das Herz von anhängenden Geweberesten freizupräparieren.

Perfusion in der Langendorff-Apparatur:

Anschließend wurde das so vorbereitete Herz mit der Aorta ascendens in eine Langendorff-Perfusionsanlage eingebunden. Es erfolgte nun eine tropfenweise Perfusion mit ca. 40 ml Powell-Medium, um Blutleere zu erreichen. Danach wurde das Herz retrograd über die Koronararterien für die Dauer von 25 Minuten mit 50 ml Kollagenasepuffer (siehe 2.2.2.) und mit einer Geschwindigkeit von 5 ml/min perfundiert.

Mechanische und enzymatischer Zerkleinerung:

Nach Beendigung der Rezirkulationsphase wurde das Herz unterhalb der Vorhöfe von der Langendorff-Apparatur abgetrennt, von Bindegewebe und größeren Gefäßen getrennt und mechanisch in etwa 5 mm große Stücke zerkleinert. Danach erfolgte eine weitere mechanische Zerkleinerung mit einem Gewebehacker bei einer Schnittbreite von 0,7 mm. Daran schloss sich eine 10-minütige Inkubation des Gewebes in carbogenbegastem Rezirkulations-Kollagenasepuffer bei 37° C. Während dieses enzymatischen Nachverdaus wurde das Homogenat durch behutsames Auf- und Absaugen mit einer 5 ml Pipette durchmischt, um die Vereinzelung der Herzmuskelzellen zu unterstützen.

Separierung der Kardiomyozyten:

Im nächsten Schritt folgte die Filtration der Zellsuspension durch ein Nylonnetz von 0,2 mm Porengröße, um die verbliebenen Zellaggregate abzutrennen. Das Filtrat wurde bei 25 x g für 3 Minuten zentrifugiert, um die Kollagenase-Lösung, Zelltrümmer und kleinere Zellen, wie z.B. Endothelzellen, von den intakten Herzmuskelzellen abzutrennen. Das so gewonnene Pellet wurde mit Powell-Medium, welches 200 µmol/l CaCl₂ enthielt, aufgenommen. Nach erneuter Zentrifugation (25 x g für 2 min) erfolgte die Resuspension der Kardiomyozyten mit Powell-Medium, das 400 µmol/l CaCl₂ enthielt. Diese Suspension wurde nun entsprechend der Anzahl der präparierten Herzen auf Reagenzgläser, die zuvor mit einer ca. 10 ml hohen Flüssigkeitssäule des Powell-Medium mit 1mmol/l CaCl₂ gefüllt worden waren, verteilt. Nach erneuter Zentrifugation (25 x g für 1 min) beinhaltete die Suspension eine Zellpopulation, die zu 70 - 80 % aus stäbchenförmigen Kardiomyozyten bestand.

3.2 Zellkulturen

Um die Anheftung der Kardiomyozyten auf dem Glasdeckgläschen zu gewährleisten, wurden die Kulturschalen samt Glasdeckgläschen über Nacht mit Vorplattierungsmedium beschickt. Dieses Medium wurde unmittelbar vor dem Ausplattieren aus den Kulturschalen abgesaugt. Das nach dem letzten Präparationsschritt des Herzens gewonnene Pellet wurde vorsichtig mit 25 ml Ausplattierungsmedium pro Herz aufgenommen und gleichmäßig auf die vorplattierten Schalen verteilt. Im Anschluss an Inkubationsphase 37°C die Zellen eine zweistündige bei wurden mit Ausplattierungsmedium gewaschen, wobei abgerundete, nicht haftende Zellen entfernt wurden, so dass die verbliebene Zellkultur zu etwa 90 % stäbchenförmige Kardiomyozyten enthielt.

3.3 Fluoreszenzmikroskopische Messungen zur Ermittlung der intrazellulären Ionenkonzentration (Ca²⁺ und Na⁺-Ionen)

3.3.1 Apparative Voraussetzungen

Die Messungen der intrazellulären Ionenkonzentration wurden mit einem inversen Mikroskop durchgeführt, welches in das AR-Cation Measurement System der Firma Spex (Grasbrunn) eingebunden war. Mit Hilfe von Monochromatoren konnte das Anregungslicht, das von einer UV-Lampe entsendet wurde, entsprechend dem Anregungsspektrum des verwendeten Fluoreszenzfarbstoffes eingestellt werden. Die derart selektierten Wellenlängen erreichten dann über Spiegel und Lichtleiter die mittels Perfusionskammer im Strahlengang positionierten Kardiomyozyten und führten dort zur Anregung des Farbstoffes. Das vom Farbstoff emittierte Licht gelangte über einen dichroischen Spiegel und einen Emissionsfilter zu dem Photomultiplier. Das eintreffende Signal wurde mit Hilfe des IBM PC/AT-Daten Analyse Systems digitalisiert (AD-Converter), aufgezeichnet und mit der dazugehörigen Computersoftware (DM3000CM) ausgewertet (vgl. Abb. 2.).



Abb. 3: Vereinfachte schematische Darstellung der Apparatur. Anregungslicht = blaue Linie, Emissionslicht = rote Linie

3.3.2 Beladung der Zellen mit den Fluorochromen und Kalibrierung des Fluoreszenzsignals

Für die vorliegende Studie waren zwei Kationenmessungen erforderlich. Mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoffen (Fluorochrome) wurde die intrazelluläre Konzentration von Natrium- und Kalziumionen bestimmt. Zur grafischen Darstellung wurden die Änderungen der Kationenkonzentrationen jeweils in Ratio-Änderungen angegeben. Die Umrechnung der freien zytosolischen Kationenkonzentration in mol/l erfolgte mit Hilfe der Formel nach Grynkiewicz.

Ermittlung der intrazellulären Na⁺-Konzentration mittels des Fluoreszenzindikators SBFI nach Harootunian et al. 1989:

Zur intrazellulären Na⁺-Messung wurden die Zellen mit dem Acetoxymethylester SBFI (10 µmol/l) für 60 min bei 37°C beladen und 30 min nachinkubiert. Die Änderungen der intrazellulären Na⁺-Konzentration wurden als Ratio-Änderungen (340 nm/ 380 nm) oder als kalibrierte Werte wiedergegeben. Die Kalibrierungslösung setzte sich wie folgt zusammen:

Kalibrierungslösung:

NaCl	0,0 - 140,0 mmol/l
KCI	4,7 mmol/l
MgCl ₂	1,0 mmol/l
HEPES	10,0 mmol/l
EGTA	1,0 mmol/l
N-Methylglucamin	0,0 – 140,0 mmol/l
Gramicidin D	6,0 µmol/l

Um unterschiedliche Na⁺-Konzentrationen im Perfusionsmedium einzustellen, ohne die Osmolarität der Lösung zu verändern, wurde die entsprechende Menge an NaCl durch N-Methylglucamin ersetzt. Der pH-Wert der Lösung wurde mit konzentrierter HCl auf 7,2 bei 37°C eingestellt. Als Na⁺-Ionophor wurde dem Perfusionsmedium Gramicidin D (10 µmol/l) zugesetzt.

Die freie zytosolische Natriumkonzentration [Na⁺]_i kann durch die Formel nach Grynkiewicz et al. (1985) ermittelt werden:

[Na⁺] _i :	zytosolische Natriumionenkonzentration
b:	Quotient (S_{f2}/S_{b2}) aus Emissionsintensität der 380 nm
	Wellenlänge des R _{min} -Wertes und der Emissionsintensität
	der 380 nm Wellenlänge des R _{max} -Wertes
K _d :	Maß für die Affinität von SBFI zu freien zytosolischen
	Na⁺-Ionen. Dieser Wert ist relativ pH-Wert stabil im
	Bereich von 6,8 bis 7,8 und beträgt 11,3 mmol/I [Despa et
	al. 2002]
R:	SBFI-Ratio (340/380 nm)
R _{min} :	Ratio bei 0 Na⁺
R _{max} :	Ratio bei gesättigtem Na⁺

Die maximale Ratio (R_{max}) wurde bestimmt, indem zum Perfusat 110 mmol/l Natriumgluconat zugesetzt wurden. Die minimale Ratio (R_{min}) wurde durch Perfusion mit einer Na⁺-freien Lösung bestimmt.

Ermittlung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration mittels des Fluoreszenzindikators Fura-2 AM nach Ladilov et al. 1995:

Zur Messung der intrazellulären Ca²⁺-Ionenkonzentration wurden die Zellen für 30 Minuten bei 37° C mit Fura-2 AM (2,5 µmol/l) in Ausplattierungsmedium beladen. Fura-2 AM gelangt als Acetoxymethylester in die Zellen, wird dort von zellulären Esterasen gespalten und kann infolgedessen als geladenes Molekül nicht mehr durch die Membran permeieren. Nach Ablauf der Beladungszeit erfolgte, zwecks Auswaschung der extrazellulären Fluorochrome, ein zweimaliger Mediumwechsel mit Ausplattierungsmedium und eine 15-minütige Nachinkubation. Diese war erforderlich, um eine vollständige Esterspaltung zu gewährleisten.

Die Anregung von Fura-2 AM erfolgte mit den Wellenlängen 340 und 380 nm, wobei das Emissionsmaximum bei 510 nm lag. Die Daten der Fura-2 AM- Messung wurden als Verhältniszahl (Ratio/ angegeben in "arbitrary units", a.u.) der Emissionen bei 340

nm und bei 380 nm Anregungswellenlänge wiedergegeben (340 nm/ 380 nm). Die Kalibrierung des Signals wurde modifiziert nach dem von Li et al. (1987) beschriebenen Protokoll durchgeführt. Die Zellen wurden mit Kalibrierungslösung, deren pH-Wert auf 6,5 bzw. 7,15 titriert war, perfundiert. Zur Kalibrierung wurde folgende Lösung benutzt:

Kalibrierungslösung:

NaCl	10,0 mmol/l
KCI	125,0 mmol/l
MgSO ₄	1,0 mmol/l
HEPES	25,0 mmol/l
Ionomycin	5,0 µmol/l
Zusatz von CaCl ₂	3,0 mmol/l
oder EGTA	5,0 mmol/l

Titrierung auf pH = 7,4 bei 37 °C mit 1 N KOH-Lösung.

Die freie zytosolische Kalziumkonzentration $[Ca^{2+}]_i$ kann durch die Formel nach Grynkiewicz et al. (1985) ermittelt werden:

	[Ca ²⁺] _I = K _{d*} b ∗ (R - R _{min}) (R _{max} - R)	
[Ca2+] _i :	zytosolische Kalziumionenkonzentration	
b:	Quotient (S_{f2}/ S_{b2}) aus Emissionsintensität der 380 nm	
	Wellenlänge des R _{min} -Wertes und der Emissionsintensität der 380 nm Wellenlänge des R _{max} -Wertes	
K _d :	Maß für die Affinität von Fura-2 AM zu freien zytosolischenCa ²⁺ -Ionen. Grynkiewicz et al. bestimmten 1985 in vitro einen K _d -Wert für Fura-2 AM von 224 nmol/l.	
R:	Fura-2 AM-Ratio (340/ 380 nm)	
R _{max} :	Ratio bei gesättigtem Ca ²⁺	
R _{min} :	Ratio bei 0 Ca ²⁺	

Die maximale Ratio (R_{max}) wurde bestimmt, indem zum Perfusat 3 mmol/l CaCl₂ zugesetzt wurden. Die minimale Ratio (R_{min}) wurde durch Zugabe von 5 mmol/l EGTA bestimmt.

3.4 Ischämie-/ Reperfusionsexperimente an isolierten Kardiomyozyten

3.4.1 Apparative Voraussetzungen zur Ermittlung der intrazellulären Ionenkonzentration und der Hyperkontrakturentwicklung

Zur Durchführung der Ischämie-/Reperfusionsexperimente war es erforderlich, dass das Perfusionssystem gasdicht verschlossen war. Die autoklavierten Medien wurden mittels Edelstahlkapillaren mit der Perfusionskammer verbunden. In diese wurden die Deckgläschen mit den darauf angehefteten Kardiomyozyten eingebaut und die Kammer anschließend fest verschraubt. Durch Anschluss einer Peristaltikpumpe wurde die Kammer bei einer Flussrate von 0,5 ml/min mit Medium perfundiert. Das anoxische Medium wurde während des Ischämie-Experimentes konsequent mit N₂ (100 %) begast. Die Temperatur in der Perfusionskammer betrug 37°C. Während der Ischämie-/Reperfusionsexperimente wurde die Morphologie der Kardiomyozyten mittels einer im Perfusionssystem installierten Videokamera ermittelt, und es erfolgte die Aufzeichnung und Messung der morphologischen Zelllängenveränderungen. Hierbei wurde der Wert der Hyperkontraktur als prozentuale Längenänderung zur endischämischen Zelllänge innerhalb der 1., 2., 5., 10. und 15. Minute der Reperfusionsphase gemessen. Die Abbildung 2. zeigt die apparativen Voraussetzungen schematisch.

3.4.2 Experimentelles Protokoll der Messung der intrazellulären lonenkonzentration und der Hyperkontrakturentwicklung

Um Ischämie und Reperfusion zu simulieren, wurden die Ischämie bei einem extrazellulären pH-Wert von 6,4 glukosefrei, und die Reperfusion bei einem extra-zellulären pH-Wert von 7,4, durchgeführt.

In verschiedenen Versuchsprotokollen wurden die Herzmuskelzellen unter Kontrollbedingungen zu Beginn eines jeden Experimentes für eine Dauer von 10-15 Minuten normoxisch perfundiert. Die Dauer der Ischämie betrug 60 Minuten. Mit Beginn der Reperfusion wurden verschiedene Aktivatoren sowie Inhibitoren eingesetzt. Die nachfolgende Tabelle gibt einen Überblick über die Eigenschaften der verwendeten Substanzen und die eingesetzten Konzentrationen, die der normoxischen, bzw. anoxischen Tyrode-Stammlösung (vgl. 2.2.3.) zugesetzt wurden:

Substanz	[C]	Puffer	Lösungsmittel	Eigenschaften
Kalium	1 mmol/l			aktiviert die Na ⁺ /K ⁺ -ATPase
	2 mmol/l			
	5 mmol/l			
	9 mmol/l			
Ouabain	200 µmol/l	HEPES	DMSO	hemmt die Na ⁺ /K ⁺ -ATPase

3.4.3 Protokoll der Ischämie-/ Reperfusionsexperimente mit Messung der intrazellulären Natriumkonzentration [Na⁺]_i

Protokoll 1: Kontrolle

15 min Normoxie	60 min Ischämie	15 min Reperfusion
$[K^+]_o = 4 \text{ mmol/l}$	[K ⁺] _o = 4 mmol/l	[K⁺]₀ = 4 mmol/l

Protokoll 2: Erhöhung von $[K^+]_o$ um 2, 5 und 9 mmol

60 min Ischämie	15 min Reperfusion
[K ⁺] _o = 4 mmol/l	1.[K⁺]₀ = 6 mmol/l
	2. [K ⁺] _o = 9 mmol/l
	3. [K⁺]₀ = 13 mmol/l
	60 min Ischämie [K⁺]₀ = 4 mmol/l

Protokoll 3: Zugabe von Ouabain

15 min Normoxie	60 min Ischämie	15 min Reperfusion
[K ⁺] _o = 4 mmol/l	[K ⁺] _o =4 mmol/l	[K⁺]₀ = 4 mmol/
		200 µmol/l Ouabain

3.4.4 Protokoll der Ischämie-/ Reperfusionsexperimente mit Messung der intrazellulären Kalziumkonzentration [Ca²⁺]_i

Protokoll 4: Kontrolle

15 min Normoxie	60 min Ischämie	15 min Reperfusion
[K ⁺] _o = 4 mmol/l	[K ⁺] _o = 4 mmol/l	[K ⁺] _o = 4 mmol/l

Protokoll 5: Erhöhung von $[K^*]_{\circ}$ um 2, 5 und 9 mmol

60 min Ischämie	15 min Reperfusion
[K ⁺] _o =4 mmol/l	1.[K ⁺] _o = 6 mmol/l
	2. [K⁺]₀= 9 mmol/l
	3. [K⁺]₀ = 13 mmol/l
	[K⁺]₀ = 4 mmol/l

Protokoll 6: Zugabe von Ouabain

15 min Normoxie	60 min Ischämie	15 min Reperfusion
[K ⁺] _o = 4 mmol/l	[K ⁺] _o =4 mmol/l	[K⁺]₀ = 4 mmol/l
		200 µmol/l Ouabain

3.5 Messparameter der Experimente an isolierten Kardiomyozyten

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

Parameter	Einheit	Methode
Zytosolischer Ca ²⁺ -Gehalt	in "arbitrary units" (a.u.) der Fura- 2-Ratio oder als Absolutwerte	Fura-2 AM
Diastolischer bzw. systolischer Ca ²⁺ -Wert	Maximum bzw. Minimum einer Oszillation; wiedergegeben in "arbitrary units" (a.u.) der Fura-2- Ratio	Fura-2 AM
Ca ²⁺ -Oszillationen	Frequenz (Anzahl der Oszillationen pro Minute)	Fura-2 AM
Zytosolischer Na ⁺ -Wert	in "arbitrary units" (a.u.) der SBFI-Ratio	SBFI
Endischämische Zelllänge (Rigorlänge)	Zelllänge (in %) am Ende der simulierten Ischämie bezogen auf die Ausgangslänge	Zelllängenmessung
Reperfusionsbedingte Zellängenverkürzung (Hyperkontraktur)	% der Zellänge bezogen auf Ausgangslänge- bzw. end- ischämische Länge	Zelllängenmessung
Zeitpunkt des Rigoreintritts (Rigorzeitpunkt)	Zeitdifferenz (min) zwischen Ischämiebeginn und Rigoreintritt	Zeitdifferenzermittlung
3.6 Messung der Druckverhältnisse am isolierten Herzen bei Perfusion mit hyperkalämischem Medium nach globaler Ischämie

3.6.1 Präparation der Herzen

Die Herzen von 200 - 300 g schweren adulten Wistar Ratten wurden nach der unter 3.1.2. beschriebenen Methode präpariert und in einer 100% Luftfeuchtigkeit enthaltenden, temperaturkontrollierten (37° C) Kammer mittels Langendorff-Perfusionsanlage mit Powell-Medium (2.2.2.) mit einer Flussgeschwindigkeit von 10 ml/min perfundiert. Das Perfusat wurde mit 95% Sauerstoff und 5% Kohlendioxid aufgesättigt. Das mit einer konstanten Flussrate von 10 ml/min eingestellte Perfusat gelangte nun retrograd von der Aorta ascendens in die Koronarien, um eine ausreichende Versorgung des Myokards zu erreichen. Der Abfluss erfolgte über den Sinus coronarius.

3.6.2 Apparative Voraussetzungen zur Ermittlung der Druckverhältnisse im isolierten Herz

Der linksventrikuläre Druck wurde kontinuierlich mittels eines an einen Druckwandler angeschlossenen wassergefüllten Latexballons, welcher durch die Mitralklappe im linken Ventrikel positioniert wurde, registriert. Der linksventrikuläre enddiastolische Druck (LVEDP) wurde durch den mit Wasser befüllten Latexballon mit konstantem Volumen während der Versuche auf 12 mmHg gehalten.

Aufgezeichnet wurden der LVEDP und der linksventrikuläre systolische Druck (LVP_{syst}). Über die Messung des LVEDP konnte die postischämische Kontrakturentwicklung beurteilt werden. Diese spiegelte sich in einem frühen Anstieg des LVEDP wieder. Aus der Differenz von LVP_{sys} und LVEDP ergibt sich der linksventrikulär entwickelte Druck (left ventricular developed pressure (LVDP)). Anhand der Auswertung des LVDP, der die Kontraktilität des Herzens abbildet, konnte eine Aussage über die Erholung der aktiven kontraktilen Funktion getroffen werden.

3.6.3 Experimentelles Protokoll der Versuche am isolierten Herz

Nach Anbringung der Herzen in der Langendorff-Perfusionsanlage und Einbringen des Latexballons folgte ein 20-minütige Stabilisierungsphase. Um die Ischämiephase zu simulieren, wurde das Herz einer 60-minütigen No-Flow-Phase ausgesetzt und im Anschluss mit Perfusat unterschiedlicher Kaliumkonzentration 30 Minuten reperfundiert. Protokoll 7: Kontrolle

20 min Stabilisierung	60 min globale Ischämie	30 min Normoxie
[K ⁺] _o = 4 mmol/l	[K ⁺] _o =4 mmol/l	[K⁺]₀ = 4 mmol/l

Protokoll 8: Erhöhung von $[K^+]_o$ um 2 und 5 mmol

20 min Stabilisierung	60 min globale Ischämie	30 min Normoxie
[K⁺]₀=4 mmol	[K⁺]₀=4 mmol	[K⁺]₀ = 6 mmol
		[K⁺]₀ = 9 mmol

3.6.4 Messparameter der Versuche am isolierten Herz

Parameter	Einheit	Methode
Systolischer Druck im linken	mmHg	Latexballon mit Druckwandler im
Ventrikel (LVPsys)		linken Ventrikel
enddiastolischer Druck im	mmHa	Latexballon mit Druckwandler im
	i i i i g	
linken Ventrikel (LVEDP)		linken Ventrikel
entwickelter Druck im linken	mmHg	Differenz zwischen LVPsys und
Ventrikel (LVDP)		LVEDP

3.7 Statistik

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

4. Ergebnisse

4.1 Der Einfluss einer erhöhten extrazellulären Kaliumkonzentration auf die Aktivität der Na⁺/K⁺-ATPase

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von erhöhtem [K⁺]_o auf die zytosolische Na⁺- und Ca²⁺-Homöostase während der Reperfusion isolierter ischämischer Kardiomyozyten adulter "Wistar"-Ratten und der Effekt auf den myokardialen Reprfusionsschaden untersucht. Um zu prüfen, ob der Effekt am Modell der isolierten Kardiomyozyten auch im Zellverband nachweisbar ist, wurden die Versuchsreihen im Ganzherzversuch durchgeführt.

4.2 Die Veränderung der zytosolischen Natrium-Konzentration [Na⁺]_i während simulierter Ischämie und Reperfusion

Es kam bei unseren Versuchen im Verlauf der Ischämie in den Kardiomyozyten zu einem kontinuierlichen Anstieg der zytosolischen Natriumkonzentration [Na⁺]_i. Die Änderung von [Na⁺]_i wurde dargestellt in a.u. (arbitrary units) der SBFI-Ratio. Unter normoxischen Bedingungen konnte eine SBFI-Ratio von 1 ermittelt werden. Dies entspricht einem [Na⁺]_i –Wert von ca. 5,0 mmol/l. Unmittelbar nach der Rigorkontraktur kam es zu einem kontinuierlichen Anstieg der SBFI-Ratio. Die Ursache hierfür ist der energetisch bedingte Ausfall der NKA und der damit verbundene Zusammenbruch des transsarkolemmalen Na⁺-Gradienten. Die weiter einströmenden Natriumionen führten nun zu einem kontinuierlichen Anstieg der SBFI-Ratio. Am Ende der Ischämie wurde eine Ratio von 1,4 ermittelt. Dies entspricht einem [Na⁺]_i –Wert von ca. 50-60 mmol/l.

Während der Reperfusion stellte sich zusammen mit der Reenergetisierung der Zelle und der Stabilisierung des Na⁺-Gradienten innerhalb der ersten 15 Minuten der normoxische Ausgangswert ein. Die Abbildung 4 zeigt den exemplarischen Verlauf der SBFI-Ratio während Normoxie, Ischämie und Reperfusion wie oben beschrieben.



Abb. 4: Exemplarischer Verlauf der SBFI-Ratio (a.u.) während 20-minütiger Normoxie, 80minütiger Ischämie und 20-minütiger Reperfusion als Einzelzellmessung.

4.2.1 Die Beeinflussung der zytosolischen Natriumkonzentration $[Na^+]_i$ in isolierten Kardiomyozyten während simulierter Reperfusion

Die nachfolgenden Versuche wurden entsprechend den Protokollen unter 3.4.3 durchgeführt. Wurde die extrazelluläre Kaliumkonzentration [K⁺]_o auf 6 und 9 mmol/l erhöht, zeigte sich im Verlauf der Reperfusion eine signifikante Beschleunigung der Natriumerholung. Bei Zugabe von Ouabain blieb die Erholung der zytosolischen Natriumkonzentration aus (Abbildung 5.1).



Abb. 5.1: Exemplarischer Verlauf der zytosolischen Natriumerholung mittels SBFI-Messung in % des endischämischen Wertes während 15-minütiger Reperfusion unter Kontrollbedingungen, bei Erhöhung von $[K^*]_o$ auf 6 und 9 mmol/l, sowie unter Zugabe von 200 µmol/ Ouabain.

Dieser Effekt der beschleunigten Natriumerholung war in der 5. Minute der Reperfusion am deutlichsten ausgeprägt. Eine Erhöhung der extrazelluläre Kaliumkonzentration [K+]_o auf 13 mmol/l zeigte eine langsamere Natriumerholung, was möglicherweise auf die Depolarisation der Zelle zurückzuführen ist. Unter dem inhibitorischen Einfluss von 200 µmol/l Ouabain auf die Na⁺/K⁺-ATPase (NKA) zeigte sich keine Erholung von [Na+]_i. Dies zeigt die Abbildung 5.2.



Abb. 5.2: SBFI-Ratio in % des endischämischen Wertes in der 5. Minute der Reperfusion in Anwesenheit von 6 mmol/l, 9 mmol/l, 13 mmol/l extrazellulärem Kalium, 200 μ mol/l Ouabain und unter Kontrollbedingungen. Die Daten sind dargestellt als Mittelwerte ± SEM, * = p < 0,05 (n= 34 Zellen).

Die SBFI-Ratio, hier dargestellt in % des endischämischen Wertes, fiel in Minute 5. der Reperfusion bei erhöhtem [K⁺]_o rasch auf Werte von 86,32 % ± 4,0 (6 mmol/l), 81,37 % ± 4,5 (9 mmol/l) und 88,56 % ± 10 (13 mmol/l) ab, während Kontrolle und Ouabain noch bei Werten von 91,67 % ± 3,5 (Kontrolle) und 96,81 % ± 3 (Ouabain) lagen. In der Abbildung 5. und den folgenden Grafiken wurde auf die Darstellung der Erhöhung der extrazelluläre Kaliumkonzentration [K⁺]_o auf 13 mmol/l verzichtet, da hier keine Verbesserung der Natriumerholung gezeigt werden konnte.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine Erhöhung von [K⁺]_o auf 6 mmol/l und 9 mmol/l eine beschleunigte Natriumerholung in der Reperfusion bewirkt.

4.3 Veränderungen der Kalziumhomöostase und der Zelllänge in isolierten Kardiomyozyten unter simulierter Ischämie und Reperfusion

Während Ischämie und Reperfusion kam es in isolierten Kardiomyozyten zu einem typischen Verlauf der intrazellulären Kalziumkonzentration, dargestellt mit Hilfe des Fluoreszenzindikators Fura-2-AM. Die ermittelte prä-ischämische zytosolische Ca²⁺-Konzentration $[Ca^{2+}]_i$ [Grynkiewicz et al. 1985, Ladilov et al. 1997] in isolierten Kardiomyozyten betrug 0,07 ± 0,01 µmol/l (n = 30 Zellen). In der Ischämiephase kam es nach 20 ± 2 min zu einer Reduktion der initialen Zelllänge auf 68 ± 4 % (n = 30 Zellen). Diese innerhalb von Sekunden eintretende "Rigor"-Kontraktur fiel mit dem Beginn des Anstiegs des Fura-2-Signals zusammen und ist ein Indikator für die beginnende bzw. nicht mehr kompensierbare zytosolische Ca²⁺-Überladung der Zelle. Nach Entstehung der Rigorkontraktur stieg das Fura-2-Signal weiter an. $[Ca^{2+}]_i$ betrug nach 60-minütiger Ischämie durchschnittlich 1,42 ± 0,06 µmol/l (n = 30 Zellen). Im Verlauf der Reperfusion fiel die zytosolische Kalziumkonzentration $[Ca^{2+}]_i$ wieder auf die Werte vor Beginn der Ischämie ab.

Die Abbildung 6.1 zeigt den exemplarischen Verlauf der Kalziumkonzentration als Fura-2-Ratio (a.u.) und die Zellverkürzung (in % der Ausgangszelllänge) während der Normoxie, simulierter Ischämie und Reperfusion unter Kontrollbedingungen. Ebenfalls dargestellt ist ein Kardiomyozyt im normalen Zustand, mit Rigorkontraktur und im Zustand der Hyperkontraktur. In der Abbildung 6.2 ist der exemplarische Verlauf der Kalziumkonzentration als Fura-2-Ratio (a.u.) und die Zellverkürzung (in % der Ausgangszelllänge während der Reperfusion unter Kontrollbedingungen dargestellt.



Abb. 6.1: Die Abbildung zeigt den exemplarischen Verlauf der Fura-2-Ratio (a.u.) und der Zelllänge (•-•) in % der Ausgangslänge während der 60-minütigen Ischämie und der folgenden 15-minütigen Reperfusion.



Abb. 6.2: Die Abbildung zeigt den exemplarischen Verlauf der Fura-2-Ratio (in a.u.) und der Zelllänge (\bullet - \bullet) in % der Ausgangslänge während der Reperfusionsphase.

4.4 Der Einfluss von erhöhtem extrazellulärem Kalium [K⁺]₀ auf die Kalziumhomöostase und die reperfusionsinduzierte Hyperkontraktur

Ob die beschleunigte Natriumerholung durch Erhöhung von [K⁺]_o im Zusammenhang mit der zytosolischen Kalziumkonzentration [Ca²⁺]_i steht, wurde nun unter simulierten Ischämie-/Reperfusionsbedingungen mit Hilfe des Fluoreszenzindikators Fura-2 ermittelt.

In unseren Experimenten war die Hypothese, dass eine Erhöhung der extrazellulären Kaliumkonzentration [K⁺]_o auf 6 mmol/l und 9 mmol/l gegen die reperfusionsinduzierte Hyperkontraktur schützt durch eine Beeinflussung der zellulären Ca²⁺-Homoöstase. Hierzu wurden im Folgenden nach den Versuchsprotokollen unter 3.4.4 die intrazelluläre Kalziumkonzentration [Ca²⁺]_i, die Oszillationsfrequenz sowie die Hyperkontraktur gemessen. Zusätzlich wurden die gesamten Parameter in Anwesenheit von 200 µmol/l Ouabain, einem selektiven Inhibitor der Na⁺/K⁺-ATPase (NKA), bestimmt.

4.4.1 Die Beeinflussung von [Ca²⁺]_i während der Reperfusion

Mit Beginn der Reperfusion kam es zur Reenergetisierung der Zelle und einem damit verbundenen Abfall des intrazellulär akkumulierten $[Ca^{2+}]_i$. Im Gegensatz zur Kontrolle (1,48 a.u. ± 0,15) zeigte sich bei den Versuchen mit Erhöhung von $[K^+]_o$ auf 6 mmol/l (0,9 a.u. ± 0,13) und 9 mmol/l (0,94 a.u. ± 0,10) ein deutlich schnelleres Absinken von $[Ca^{2+}]_i$. Dieser Effekt ist, wie Abbildung 7 zeigt, besonders deutlich in der 2. Minute der Reperfusion zu erkennen. Unter Zugabe von Ouabain (1,55 a.u. ± 0,10) wurde keine Erholung von $[Ca^{2+}]_i$ beobachtet.



Abb. 7: Die Abbildung zeigt die Kalziumkonzentration (Fura-2-ratio in a.u.) in Kardiomyozyten in der zweiten Minute der Reperfusion bei Erhöhung der extrazellulären Kaliumkonzentration $[K^{+}]_{o}$ auf 6 mmol/l und 9 mmol/l im Vergleich zur Kontrolle und Ouabain. Die Daten sind dargestellt als Mittelwerte ± SEM, * = p < 0,05 (n= 36 Zellen).

4.4.2 Die Beeinflussung der Oszillationsfrequenz während simulierter Reperfusion

Die Kalziumoszillationen während der Reperfusion waren bei einer Erhöhung von $[K^+]_o$ auf 6 mmol und 9 mmol im Gegensatz zur Kontrolle signifikant verringert. Der protektive Effekt ließ sich auch hier in der zweiten Minute der Reperfusion anhand der Abbildung 8 am deutlichsten erkennen. Die Oszillationsfrequenz war mit 11 ± 5 (6 mmol) und 13 ± 6 (9 mmol) Oszillationen/min. (n = 36 Zellen) im Vergleich zu 23 ± 4 (Kontrolle) und 22 ± 3 (Ouabain) Oszillationen/min. (n = 36 Zellen) um etwa 50 % reduziert.



Abb. 8: Ca^{2+} -Oszillationsfrequenz (min ⁻¹) in der zweiten Minute der Reperfusion unter Kontrollbedingungen, unter Zugabe von Ouabain (200µmol) und bei Erhöhung der extrazellulären Kaliumkonzentration [K⁺]_o auf 6 mmol und 9 mmol. Die Daten sind dargestellt als Mittelwerte ± SEM, * = p < 0,05 (n= 36 Zellen).

4.4.3 Die Beeinflussung der Hyperkontraktur während der Reperfusion

Neben der Verringerung von zytosolischer Kalziumkonzentration und Oszillationsfrequenz konnte in unseren Experimenten eine deutliche Reduktion der Hyperkontraktur gezeigt werden. So fand sich bei den Kardiomyozyten mit Erhöhung von [K⁺]_o auf 6 mmol/l und 9 mmol/l eine Zelllänge in % der endischämische Länge von 83,0 % ± 4 (6 mmol/l) und 81,0 ± 4,5 (9 mmol/l) (n = 36) im Vergleich zu 65,0 ± 3,5 (Kontrolle) und 62,0 ± 3,6 (Ouabain) (n = 36). Die Abbildung 9 zeigt die Zelllänge in % der endischämischen Länge am Ende der Reperfusionsphase.



Abb. 9: Zelllänge der Kardiomyozyten (in % der endischämischen Länge) am Ende der Reperfusion (15. Minute) unter Kontrollbedingungen, unter Zugabe von Ouabain (200 μ mol/l) und bei Erhöhung der extrazellulären Kaliumkonzentration [K⁺]_o auf 6 mmol/l und 9 mmol/l. Die Daten sind dargestellt als Mittelwerte ± SEM, * = p < 0,05 (n= 36 Zellen).

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der Versuche, dass eine Erhöhung der extrazellulären Kaliumkonzentration [K⁺]_o auf 6 mmol/l und 9 mmol/l parallel zu einer schnelleren Natriumerholung auch zu einer beschleunigten Kalziumerholung führt. Als direkte Folge der beschleunigten Kalziumrestitution konnten wir in unseren Versuchen eine Reduktion der Oszillationsfrequenz und der Hyperkontrakturentwicklung feststellen.

4.5 Das isolierte Herz unter Ischämie/ Reperfusionsbedingungen

4.5.1 Der Druckverlauf im linken Ventrikel am isolierten Herzen während globaler Ischämie und Reperfusion

Es wurde nun am isolierten, perfundierten Herzen adulter Ratten getestet, ob die Ergebnisse der Versuche an isolierten Kardiomyozyten auf das gesamte Herz übertragbar sind. Zu diesem Zweck wurden Herzen adulter "Wistar"-Ratten zunächst unter Kontrollbedingungen mit einer 10-minütigen normoxischen Perfusion stabilisiert. Danach folgten eine 60-minütige "no-flow" Ischämie, und anschließend eine 30-minütigen Reperfusion. Anhand der unter 3.5 genannten Methode wurden zunächst der linksventrikuläre systolische (LVESP) und der linksventrikuläre enddiastolische Druck (LVEDP) als Parameter gemessen.

Bereits zu Beginn der globalen Ischämie im isolierten Herzen kam es zu einem starken Abfall des LVESP und einem damit verbundenen Ausfall der Pumpfunktion. Nach etwa 20 Minuten globaler Ischämie kam es zu einem kontinuierlichen Anstieg des LVEDP als Ausdruck der ischämischen Rigorkontraktur des Myokards. Während der 30minütigen Reperfusion zeigte sich in den ersten Minuten zunächst ein sprunghafter Anstieg "Peak" von LVESP und LVEDP. Dieser "Peak" spiegelt die durch den Ca²⁺-Overload verursachte Schädigung des Herzmuskelgewebes analog zur Hyperkontraktur der Einzelzelle wieder. Dieser Peak verschwindet unter Ca²⁺-freier Perfusion und Hemmung des NCX [Yamamoto et al. 2009]. Beide Werte fielen nach dem ersten starken Anstieg wieder deutlich ab, um sich dann an ihre Ausgangswerte in der Stabilisierungsphase anzugleichen.

Dies ist in Abbildung 10 exemplarisch dargestellt: Es ist festzustellen, dass sich der LVESP beginnend mit einem Druck von 131 mmHg während der Stabilisierungsphase trotz der langen Ischämiephase von 60 Minuten wieder nahezu dem prä-ischämischen

Wert angleicht. Der LVEDP jedoch bleibt am Reperfusionsende signifikant erhöht (43 mmHg in Minute 96.) im Vergleich zur Stabilisierungsphase (11 mmHg).



Abb. 10: Exemplarischer Verlauf des linksventrikulären diastolischen (LVEDP) und systolischen Drucks (LVESP) im Verlauf von 10-minütiger Stabilisierungsphase, 60-minütiger Ischämie und 30-minütiger Reperfusion.

4.5.2 Der linksventrikulär entwickelte Druck im Verlauf von globaler Ischämie und Reperfusion

Zur Verdeutlichung der Ergebnisse wurde der linksventrikulär entwickelte Druck (left ventricular developed pressure, LVDP) bestimmt. Er ist definiert als Differenz zwischen LVESP und LVEDP und repräsentiert die Pumpfunktion des Herzens. Abbildung 11 zeigt den Verlauf des LVDP während der Stabilisationsphase, unter globaler Ischämie und während der Reperfusion.

Nach Minute 10. der globalen Ischämie kam es zu einem rapiden Abfall des LVDP von 121 mmHg auf Werte von 6 mmHg in der Minute 20. Nach einem nahezu druckkonstanten Plateau während der restlichen Ischämiephase folgte 6 Minuten nach Beginn der Reperfusion in Minute 60 ein plötzlicher steiler Anstieg des LVDP bis auf 66 mmHg.

Die Wiederherstellung der Kalziumhomöostase zeigte sich zunächst in einem rapiden Abfall des LVDP auf 17 mmHg in Minute 71. und einem anschließenden langsamen Anstieg bis auf 75 mmHg am Ende der Reperfusion.



Abb. 11: Die Abbildung zeigt den aus LVESP und LVEDP ermittelten LVDP in mmHg während der Stabilisierungsphase, unter globaler Ischämie und während der Reperfusion.

4.5.3 Beeinflussung der Pumpfunktion während globaler Ischämie und Reperfusion durch Variierung der extrazellulären Kaliumkonzentration

Im Vergleich zu den Kontrollen wurden die isolierten Herzen nun während der Reperfusion mit verschiedenen Kaliumkonzentrationen perfundiert. Es kam bei der Reperfusion wie in den Kontrollversuchen zunächst zu dem bereits beschriebenen Peak mit anschließender inkompletter Erholung des LVDP. Es ist in Abbildung 12 deutlich zu erkennen, dass die Pumpfunktion des Herzens bei Erhöhung der extrazellulären Kaliumkonzentration auf 6 und 9 mmol besser ist als unter Kontrollbedingungen. Der Anstieg des LVDP erfolgt umso rascher, je niedriger der Peak zu Beginn der Reperfusion ausgeprägt ist. Dieser Effekt ist besonders in den ersten 20 Minuten der Reperfusion zu erkennen.



Abb. 12: Zeitlicher Verlauf des LVDP in der Phase der 30-minütigen Reperfusion unter Kontrollbedingungen und nach Erhöhung der extrazellulären Kaliumkonzentration $[K^*]_o$ auf 6 mmol/l und 9 mmol/l. Die Daten sind dargestellt als Mittelwerte ± SEM, *= p < 0,05 (n=6).

In der ersten Minute nach Reperfusion wurden für den LVDP (mmHg) unter Kontrollbedingung (4 mmol/l [K⁺]_o) Werte von 66,20 mmHg ± 5,80 (n=6 Herzen) gemessen, für 6 mmol/l [K⁺]_o Werte von 34,60 mmHg ± 6,75 (n=6 Herzen) und für 9 mmol/l [K⁺]_o 46,03 mmHg ± 7,80 (n=6 Herzen). Passend dazu stieg der LVDP in den letzten 20 Minuten der Reperfusion in Anwesenheit von 6 und 9 mmol/l [K⁺]_o deutlich weiter an als unter Kontrollbedingungen. Hier wurden in der Minute 30 nach Beginn der Reperfusion ein LVDP (mmHg) unter Kontrollbedingungen (4 mmol/l [K⁺]_o) von 75,00mmHg ± 1,15 (n=6 Herzen), bei [K⁺]_{o=} 6 mmol/l 92,00 mmHg ± 6,00 (n=6 Herzen)

und bei $[K^+]_o = 9 \text{ mmol/l } 100,00 \text{ mmHg } \pm 0,50 \text{ (n=6 Herzen) gemessen. Im Vergleich dazu lag der prä-ischämische Wert des LVDP bei 120,75mmHg.$

Die Abbildung 13 verdeutlicht die Verringerung des Peaks bei Erhöhung von $[K^+]_o$ auf 6 mmol/l und 9 mmol/l.



Abb. 13: Verlauf des LVDP in der ersten Minute der Reperfusion unter Kontrollbedingungen und nach Erhöhung der extrazellulären Kaliumkonzentration $[K^*]_o$ auf 6 mmol/l und 9 mmol/l. Die Daten sind dargestellt als Mittelwerte ± SEM, * = p < 0,05 (n=6).

5. Diskussion

5.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen,

- dass eine Erhöhung der extrazellulären Kaliumkonzentration die Kardiomyozyten konzentrationsabhängig gegen die reperfusionsinduzierte Hyperkontraktur schützt,
- 2. dass dieser Schutz auf eine beschleunigte Restitution des zytosolischen Kalziums während der Reperfusion zurückzuführen ist und
- dass dieser beschleunigten Restitution der zytosolischen Natriumhomöostase eine Aktivierung der Na⁺/K⁺-ATPase durch die erhöhte extrazelluläre Kaliumkonzentration zugrunde liegt.
- 4. dass die Ergebnisse vom Modell des isolierten Kardiomyozyten auf das ganze Herz übertragbar sind.

5.2 Der myokardiale Reperfusionsschaden unter simulierten Reperfusionsbedingungen

Als wesentliche Ursache für den durch die Reperfusion ausgelösten akuten Zelltod ist die Hyperkontraktur nachgewiesen worden [Siegmund et al., 1992, 1994; Schäfer et al. 2001; Inserte et al., 2002; Abdallah et al. 2005]. Dies ist auch in vivo nachweisbar [Garcia-Dorado et al. 1992; Garcia-Dorado et al. 1997]. Die Hyperkontraktur der Kardiomyozyten wird auf eine Fehlfunktion des sarkoplasmatischen Retikulums zurückgeführt, durch die in der Reperfusionsphase zytosolische Ca²⁺-Oszillationen entstehen.

Bei der Entstehung der zellulären Ca²⁺-Überladung in der Ischämie ist der Reverse-Mode des Na⁺/Ca²⁺-Austauschers (NCX) maßgeblich beteiligt. Eine selektive Inhibition dieses Austauschers durch KB-R7943 und SEA0400 hat im Tierexperiment einen protektiven Effekt auf den Reperfusionsschaden und die Hyperkontrakturentwicklung [Schäfer et al. 2001; Inserte et al. 2002; Iwamoto et al. 2004; Toth et al. 2009]. Die Aktivierung des Reverse-Mode des NCX ist wiederum die Folge einer zytosolischen Natriumüberladung der Kardiomyozyten im Verlauf der Ischämie (Siegmund et al. 1994). Während der Ischämie kommt es aufgrund des anaeroben Stoffwechsels zu einer intrazellulären Anreicherung von Protonen wodurch der zytosolische pH-Wert sinkt. Hierdurch kommt es zu einer Aktivierung des Na⁺/H⁺-Austauschers, der die intrazelluläre Natriumkonzentration zusätzlich erhöht [Perelli et al. 2011, Wakabayashi et al. 2013]. Die treibende Kraft zur Aufrechterhaltung des auswärts gerichteten Natriumgradienten ist die energieabhängige Na⁺/K⁺-ATPase, die mit dem Erliegen der mitochondrialen Atmung ebenfalls stillsteht.

Die Aktivität der Na⁺/K⁺-ATPase (NKA) kann durch Erhöhung der extrazellulären Kaliumkonzentration [K⁺]_o beeinflusst werden. Von Nakao et al. (1989) wurde durch Messungen an isolierten Kardiomyozyten von Meerschweinchen beschrieben, dass unter physiologischem extrazellulärem Natrium [Na⁺]_o eine Aktivierung der NKA um 100% bei einem $[K^+]_o$ –Wert von 5,4 mmol/l eintritt. Bei einem $[K^+]_o$ –Wert von 10 mmol/l kann eine Aktivierung von 130% erreicht werden, jedoch scheint sich hier bereits ein Sättigungseffekt einzustellen. Da die beiden monovalenten Kationen Na⁺ und K⁺ um die Bindungsstellen der NKA konkurrieren [Glitsch et al. 2001], sind die [K⁺]_o -Werte zur Aktivierung in natriumfreiem Medium entsprechend niedriger. Yamamoto et al. (2009) konnten diese Effekte an isolierten Kardiomyozyten von Meerschweinchen und am ganzen Herzen adulter "Wistar-Ratten" ebenfalls nachweisen. Die Gabe des Herzglykosids Ouabain (Strophantin) führte zu einer deutlichen Hemmung der NKA. Da die NKA in Kardiomyozyten von Ratten relativ insensibel auf Ouabain ist [Glitsch et al. 2001], musste in unseren Versuchen eine Konzentration im höheren mikromolaren Bereich (200 µmol/l) gewählt werden. Neu war in dieser Arbeit, den Ansatz der Aktivierung der NKA durch extrazelluläres Kalium weiterzuverfolgen und die Auswirkungen auf das intrazelluläre Natrium, das intrazelluläre Kalzium und die Hyperkontrakturentwicklung zu untersuchen.

5.3 Die kaliumabhängige Protektion gegen den akuten myokardialen Reperfusionsschaden am Modell isolierter Kardiomyozyten

Bei einer Blockade der NKA, durch die die Natriumextrusion der Zelle zum Erliegen kommt [Bers et al. 2003], ist unseren Experimenten unter Zugabe von Ouabain, einem selektiven Hemmstoff der Na⁺/K⁺-ATPase (NKA), im Verlauf der Reperfusion keine Erholung des zytosolischen Natriumüberladung zu beobachten (Abb.4.1). Wie bereits erwähnt konnte gezeigt werden, dass die Aktivität der NKA von der extrazellulären K⁺-

Konzentration abhängt und dass eine geringfügige Erhöhung des extrazellulären Kaliums eine Aktivierung der Na⁺/K⁺-ATPase zur Folge hat [Nakao et al. 1989, Yamamoto et al. 2009]. Dies wiederum führt zu einer verstärkten Extrusion von intrazellulärem Natrium via Na⁺/Ca²⁺-Austauscher (NCX) im Forward-Mode (FM).

In den Versuchen der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss einer erhöhten extrazellulären Kaliumkonzentration auf die zytosolische Natrium- und Kalziumhomöostase und die Entwicklung der Hyperkontraktur zunächst am Modell von isolierten Kardiomyozyten untersucht. Bei der Reperfusion wurden die Zellen mit Gesamtkaliumkonzentrationen [K⁺]_o von 4, 6, 9 und 13 mmol/l reperfundiert, wobei 4 mmol/l den Kontrollbedingungen entsprach. Es zeigte sich bei extrazellulären Kaliumkonzentrationen von 6 mmol/l und 9 mmol/l eine beschleunigte Natriumerholung. Dieser Effekt war besonders deutlich ausgeprägt in der 5. Minute der Reperfusion.

Eine weitere Erhöhung von $[K^+]_o$ auf 13 mmol/l zeigte in unseren Versuchen keinerlei protektiven Effekt mehr, sondern bewirkte eine langsamerere Erholung von $[Ca^{2+}]_i$ vergleichbar der Erholung unter Zugabe von Ouabain. Dieses Ergebnis bestätigt die Studien von Nakao et al. (1989) und Glitsch et al. (1986), bei denen ein Sättigungseffekt der NKA beschrieben wurde. Eine Erklärung hierfür liefert eine mögliche Depolarisation der Zelle. Das Ruhepotential der Zelle ergibt sich in erster Linie aus dem Gleichgewicht der Kaliumionenkonzentration des Intra- und Extrazellularraumes. Dieses Gleichgewichtspotential (E_{K}^+) wird durch die NERNST-Gleichung berechnet. Für die Kaliumionenkonzentration ergibt sich hieraus [Schmidt/Lang/Heckmann 2010]:

$$\mathsf{E}_{\mathsf{K}^{+}} = -61 \text{ mV} \cdot \log \frac{[\mathsf{K}+]i}{[\mathsf{K}+]o}$$

Unter physiologischen Bedingungen im ruhenden Arbeitsmyokard mit $[K^+]_i = 140$ mmol/l und $[K^+]_o = 4$ mmol/l ergibt sich ein Gleichgewichtspotential von etwa -90 mV. Bei einer erhöhten Kaliumkonzentration $[K^+]_i$ von 13 mmol/l ergibt sich ein Gleichgewichtspotential von etwa - 63 mV.

Abbildung 13 dient der Veranschaulichung der Veränderungen im Gleichgewichtspotential von Kalium bei den in unseren Versuchen verwendeten Konzentrationen. Während das Gleichgewichtspotential von Kalium bei einer Erhöhung von [K⁺]_o auf 9 mmol/l noch unterhalb der Schwelle zur Öffnung der spannungsgesteuerten schnellen Natriumkanäle liegt, kann es bei einer Erhöhung von [K⁺]_o auf 13 mmol/l schon zu einem raschen Natriumeinstrom kommen, der wiederum eine zusätzlich Depolarisation begünstigt. Dies könnte bereits eine Öffnung von spannungsgesteuerten langsamen L-Typ-Ca²⁺-Kanälen mit Einstrom von Ca²⁺-Ionen in die Zelle bewirken. Zudem besitzt die depolarisierte Zelle eine höhere Neigung zum Reverse-Mode des NCX ähnlich den Vorgängen während einem Aktionspotential. Die Depolarisation kann zu einer Aktivierung des NCX im "Reverse-Mode" führen [Blaustein et al. 1999, Bers et al. 2003 Schmidt/Lang/Heckmann 2010]. Diese beiden genannten Mechanismen hätten einen zusätzlichen Kalzium-Influx zur Folge, der die Kalziumerholung der Zelle in der Reperfusion deutlich verschlechtert.



Abb.14: Grafische Darstellung der Berechnung des Gleichgewichtspotentials von Kalium bei Erhöhung der extrazellulären Kaliumkonzentration auf 6 mmol/l, 9 mmol/l und 13 mmol/l. Zur Orientierung sind ebenfalls die Öffnungs-/Schließungsschwellenwerte einiger wichtiger spannungsgesteuerter Ionenkanäle dargestellt [Schmidt/Lang/ Heckmann 2010]. Zur Verdeutlichung und Übersicht über die genannten Transport- und Regulationsmechanismen des zytosolischen Kalziums dient die Abbildung 15. Zusätzlich sind die Ionenkanäle (L-Typ-Ca²⁺-Kanal, schneller Na⁺-Kanal) sowie die Transportproteine bzw. Ionenpumpen (NKA, NHE) dargestellt, die für die Aufrechterhaltung der Kalziumhomöostase eine große Rolle spielen.



Abb.15: Schematische Darstellung der wesentlichen Transportprozesse der intrazellulären Kalziumhomoöstase in Kardiomyozyten.

(NKA; Na⁺/K⁺-ATPase, NCX (FM); Na⁺/Ca²⁺-Austauscher im Forward-Mode, SERCA; SR-Ca²⁺-ATPase, SR; Sarkoplasmatisches Retikulum, ATP; Adenosintriphosphat, NHE; Na⁺/H⁺-Austauscher, PLM; Phospholemman; ->: Extrusion von Ca²⁺ aus dem Intrazel-Iulärraum; =>: Influx von Ca²⁺ in den Intrazellulärraum)

Die Kalziumhomöostase wird demnach maßgeblich durch den NCX beeinflusst, der als sekundär aktives Transportprotein im direkten funktionellen Zusammenhang mit der NKA steht. Wie bereits erwähnt kommt es durch Blockade der NKA zu einem Anstieg von [Na+]_i. Dies jedoch führt zu einer Hemmung des NCX im Forward-Mode und zu einer Umkehr zum Reverse-Mode. Die Folge ist ein Anstieg des [Ca²⁺]_i und damit eine Verstärkung der elektromechanischen Kopplung. Die positiv inotrope Wirkung durch die Gabe von Herzglykosiden wie Digitalis, die lange Zeit als Therapie der chronischen Herzinsuffizienz waren, wird durch diesen geschilderten Mechanismus erreicht [Karow/Lang 2013]. Im ischämischen Myokard kommt es nun wie bereits erwähnt zu einer Kalziumüberladung. Eine selektive Hemmung des Reverse-Mode des NCX durch KB-R7943 oder SEA0400 schützt Kardiomyozyten vor dem akuten Reperfusionsschaden [Schäfer et al. 2001, Iwamoto et al. 2004, Cheung et al. 2013].

In den Kontrollversuchen mit einer extrazellulären Kaliumkonzentration von 4 mmol/l während Ischämie und Reperfusion akkumuliert Kalzium intrazellulär durch die bereits beschriebenen Mechanismen. Begleitet von hochfrequenten Kalziumoszillationen erholt sich das zytosolische Kalzium im Laufe der Reperfusion. Hierfür ist neben der Aufnahme von Kalzium ins sarkoplasmatische Retikulum eine vermehrte Extrusion durch den nun auch im Forward-Mode arbeitenden NCX verantwortlich.

Eine Erhöhung der extrazellulären Kaliumkonzentration auf 6 mmol/l und 9 mmol/l zeigte eine deutlich schnellere Kalziumerholung und eine Verringerung der Oszillationsfrequenz. Dieser Effekt zeigte sich besonders ausgeprägt in der frühen Reperfusion. Die Auswertung der endischämischen Zelllänge ergab nach 15 Minuten Reperfusion bei 6 mmol/l und 9 mmol/ extrazellulärem Kalium, dass die Kardiomyozyten deutlich geschützt waren gegen die Hyperkontraktur. Das Ergebnis kann auf die schnellere Aktivierung des NCX im Forward-Mode zurückgeführt werden, wodurch vermehrt Kalzium aus der Zelle transportiert wird.

Die durchgeführten Experimente legen folgenden Mechanismus der Protektion von Kardiomyozyten durch Erhöhung der extrazellulären Kaliumkonzentration nahe:

Eine geringfügige Erhöhung von $[K^+]_{o}$ (1) führt zu einer beschleunigten Aktivierung der NKA in der Frühphase der Reperfusion. Die vermehrte Extrusion von intrazellulärem Natrium (2) und somit frühzeitige Wiederherstellung des Na⁺-Gradienten bewirkt, dass der sekundär aktive NCX nun im Forward-Mode verstärkt intrazellulär akkumuliertes Kalzium aus der Zelle schleust (3). Die verminderte zytosolische Verfügbarkeit von Kalzium bewirkt eine Reduktion der Ca²⁺-Oszillationen sowohl in der Amplitude als Frequenz (4). wiederum führt zur auch in der Dies Reduktion der Hyperkontrakturentwicklung, da das Kalzium die treibende Kraft für die Aktin-Myosin-Interaktion darstellt.

Abbildung 16 zeigt schematisch diesen Mechanismus der Protektion gegen die Hyperkontrakturentwicklung durch Erhöhung der extrazellulären Kaliumkonzentration.



Abb. 16: Schematische Darstellung des Mechanismus der Protektion von Kardiomyozyten durch Erhöhung der extrazellulären Kaliumkonzentration.

(NKA; Na⁺/K⁺-ATPase, NCX (FM); Na⁺/Ca²⁺-Austauscher im Forward-Mode, SERCA; SR-Ca²⁺-ATPase, SR; Sarkoplasmatisches Retikulum, ATP; Adenosintriphosphat)

5.4 Die kaliumabhängige Protektion gegen den akuten myokardialen Reperfusionsschaden am ganzen Herzen

Mit Beginn der globalen Ischämie kommt es zum Stillstand der Pumpfunktion mit Abfall des linksventrikulären systolischen Drucks (LVESP). Dies wird gefolgt von einer Erhöhung des linksventrikulären enddiastolischen Drucks (LVEDP) als Ausdruck der ischämischen Rigorkontraktur. Kurz nach der Reperfusion des Herzens zeigt sich ein sprunghafter Anstieg von LVESP und LVEDP, der durch die reperfusionsbedingte Hyperkontraktur des Arbeitsmyokards bedingt ist. Nach diesem Peak, der die durch den Ca²⁺-Overload verursachte Schädigung des Herzmuskelgewebes wiederspiegelt [Yamamoto et al. 2009], fallen beide Drücke wieder ab. Zur Verdeutlichung der

Auswurfleistung des Herzens wurde der linksventrikulär entwickelter Druck "left ventricular developed pressure", LVDP bestimmt.

Es kommt bei der Reperfusion mit steigenden extrazelluären Kaliumkonzentrationen wie in den Kontrollversuchen zunächst zu dem bereits beschriebenen Peak. Analog zu den Versuchen von Yamamoto et al. (2009) zeigt sich bei der Perfusion unter höheren Kaliumkonzentrationen eine Abflachung des Peaks als Ausdruck einer schnelleren Ca²⁺-Erholung (Abb 12 und 13). In der ersten Minute nach Reperfusion wurden für den LVDP (mmHg) unter Kontrollbedingung (4 mmol/l [K⁺]_o) ein deutlicher höherer "Peak"-Wert gemessen als für 6mmol/I [K⁺]_o und für 9 mmol/I [K⁺]_o. Im Verlauf der Reperfusion steigt der LVDP jedoch in den letzten 20 Minuten der Reperfusion in Anwesenheit von 6 und 9 mmol/l $[K^+]_0$ deutlich weiter an als unter Kontrollbedingungen. Wie zuvor am Modell der isolierten Kardiomyozyten zeigte sich auch hier konzentrationsabhängig eine deutliche Protektion des zuvor ischämisch geschädigten Herzens in Form einer verbesserten Auswurfleistung. Eine Erklärung hierfür ist wahrscheinlich die Aktivierung der Na⁺/K⁺-ATPase und die damit verbundene schnellere Extrusion von intrazellulärem Kalzium via Na⁺/Ca²⁺-Austauscher im Forward Mode. Dies verringert die Ausprägung des zytosolischen Ca²⁺-Overload und die damit verbundenen pathophysiologischen Prozesse.

Bei der beschriebenen Protektion könnte eine zusätzliche Rolle spielen, dass eine erhöhte Kaliumkonzentration eine metabolische Dilatation der Koronararterien verursacht. Bei einem [K⁺]_o von bis zu 12 mmol/l kommt es an den glatten Muskelzellen der Gefäße zu einer Aktivierung einwärts gleichrichtender K⁺-Kanäle, der Aktivierung der NKA und der damit verbundenen Hyperpolarisation der Membran mit nachfolgender Gefäßdilatation [Schmidt/ Lang/ Heckmann et al. 2010]. Dies könnte durch eine verbesserte post-ischämischen Perfusion ebenfalls zur Protektion des Myokards beitragen.

Dass der protektive Effekt einer erhöhten extrazellulären Kaliumkonzentration bei Versuchen am ganzen Herzen durch eine metabolische Dilatation der Koronarien zurückzuführen ist eher unwahrscheinlich. Dagegen spricht, dass die Experimente an isolierten Kardiomyozyten, die repräsentativ für das Arbeitsmyokard sind, ebenfalls eine deutliche Protektion unter erhöhter extrazellulärer Kaliumkonzentration zeigen. In welchem Ausmaß die metabolische Dilatation eine Rolle spielt wurde bisher noch nicht hinreichend untersucht.

5.5 Klinische Relevanz der Protektion vor dem post-ischämischen Reperfusionsschaden durch Erhöhung der extrazellulären Kaliumkonzentration

Die Regulation des Kaliumhaushaltes des menschlichen Körpers ist von besonderer Bedeutung für eine Vielzahl an metabolischen Prozessen, der Zellpyhsiologie, der Neurophysiologie und für Skelett- und Herzmuskelzellen. Eine Hyper- oder Hypokaliämie kann daher schwerwiegende Folgen für die Funktion der betreffenden Organe haben. Unter physiologischen Bedingungen wird eine Erhöhung der extrazellulären Kaliumkonzentration, die z.B. durch die Nahrungsaufnahme entsteht, zunächst durch die schnelle Aufnahme des Kations in die Zelle kompensiert. Erst dann erfolgt eine rasche Ausscheidung von ca. 90% über die Niere und von ca. 10% über das Darmepithel. Fördernd für die Aufnahme von Kalium in die Zelle wirken Insulin und ß2-adrenerge Stimulation über direkte oder indirekte Aktivierung der NKA [Schmidt/Lang/Heckmann et al. 2010, Wolff/Weihrauch et al. 2010]. Der Serumkaliumgehalt beim Menschen beträgt zwischen 4,1±0,5 mmol/l [Wolff/Weihrauch et al. 2010]. Bereits ab einem Serumkaliumgehalt von > 5,5 mmol/l besteht eine Hyperkaliämie, von einer schweren Hyperkaliämie wird ab Serumkaliumwerten von > 7 mmol/l gesprochen. Neuromuskuläre und kardiovaskuläre Symptome mit Muskellähmungen und Kammerflimmern sind die Folge. Die Ergebnisse der durchgeführten Experimente mit alleiniger Erhöhung der extrazellulären Kaliumkonzentration auf 6 und 9 mmol/l zeigten zwar einerseits einen deutlichen protektiven Effekt auf den akuten Reperfusionsschaden, andererseits scheint eine Umsetzung im Sinne einer systemischen Erhöhung der Kaliumkonzentration in vivo zunächst aufgrund der oben beschriebenen Folgen einer Hyperkaliämie unmöglich.

Aufgrund der Bedeutsamkeit der Thematik wurden seit 2004 insbesondere im Rahmen des "Postconditionings" verschiedene pharmakologische Therapieansätze in klinischen Studien untersucht. Einen Überblick über die wichtigsten Studien hierzu gibt die Arbeit von Ovize et al. aus dem Jahr 2010. In den angeführten Studien wurde eine signifikante Reduktion der Infarktgröße erreicht durch repetitive Unterbrechung der Reperfusion während der PTCA sowie pharmakologische Interventionen.

In der Herzchirurgie und in kleinen Studien, hielt die Glucose-Insulin-Kalium-Lösung (GIK) schon vor über vier Jahrzehnten ihren Einzug [Sodi-Pallares et al. 1962]. Bis heute wurde in diesem Fachgebiet eine Vielzahl von tierexperimentellen und einige klinische Studien durchgeführt, in denen bei der Verwendung der GIK ein deutlicher

Benefit in der frühen postoperativen Phase belegt wurde [Howell et al. 2011, Vlasselaers et al. 2011].

Insulin stimuliert die NKA unter anderem durch eine höhere Expression diser Pumpe an der Zellmembran und eine Erhöhung der Affinität zu Natrium [Suhail et al. 2010]. Über den Na⁺/ Glucose-Cotransporter [Zhou et al. 2003, Wright et al. 2011] könnte durch eine erhöhte extrazelluläre Glucosekonzentration dann vermehrt Na⁺ für die NKA zur Verfügung gestellt werden [Wright et al. 2011]. Die erhöhte extrazelluläre Kaliumkonzentration führt ebenfalls zu einer Aktivierung der NKA. Die Kombination von Glucose, Insulin und Kalium könnte über die beschriebenen Prozesse einen synergistischen aktivierenden Effekt auf die NKA haben.

In der Studie von Metha et al. 2005 wurde PC an etwa 10.000 Patienten (und einer gleichgroßen Kontrollgruppe) untersucht. Die Gabe einer Glucose-Insulin-Kalium-Lösung erfolgte intravenös über 24 Stunden zusätzlich zur regulären Therapie bei Myokardinfarkt. Es konnte in dieser Studie kein Benefit der Behandlung nachgewiesen werden. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte z. B der verzögerte Beginn der GIK nach der Reperfusionstherapie und die rasche Umverteilung des Kaliums sein.

Eine klinischen Anwendung könnte trotzdem im Rahmen des erwähnten Postconditionings erfolgen. Bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom und der Indikation zur Sofort-PTCA könnte unmittelbar während der Herzkatheteruntersuchung intrakoronar eine Insulin-Glucose-Kalium-Lösung verabreicht werden, um die systemischen Nebenwirkungen einer Hyperkaliämie zu vermeiden. Eine weitere Verbesserung des Outcome der Patienten nach einem stattgefundenen Myokardinfarkt oder z.B. nach einer ACVB-Operation und die damit verbundene Suche nach neuen Therapieoptionen und -möglichkeiten sollten schon alleine aufgrund der Häufigkeit und klinischen Relevanz weiterhin einen hohen Stellenwert haben.

6. Zusammenfassung

Es konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden, dass eine Erhöhung der extrazellulären Kaliumkonzentration zur Aktivierung der Na⁺/K⁺-ATPase führte. Ziel dieser Studie war es zu untersuchen, ob über diesen Mechanismus ein Schutz gegen den myokardialen Reperfusionsschaden erzielt werden kann. Isolierte Kardiomyozyten von adulten "Wistar"-Ratten wurden anoxisch perfundiert und anschließend in Anwesenheit unterschiedlicher extrazellulärer K⁺-Konzentrationen (4 mM, 6 mmol/l, 9 mmol/l, 13 mmol/l) oder Ouabain (200 µmol/l) reperfundiert. Es wurde der Verlauf der zytosolischen Ca²⁺- und Na⁺-Konzentration und der Zelllänge ermittelt. Während der Ischämie entwickelten die Zellen eine zytosolische Ca²⁺- und Na⁺-Überladung. Im Verlauf der Reperfusionsinduzierten Hyperkontraktur sind. Die Erhöhung des extrazellulären K⁺-Gehaltes führte konzentrationsabhängig zur Beschleunigung der zytosolischen Ca²⁺- und zu einer Verminderung der Ca²⁺-Oszillationen. Es kam zu einer Reduktion der Hyperkontrakturentwicklung.

Um diesen Effekt auch im Zellverbund zu demonstrieren, wurden isolierte ganze Herzen adulter "Wistar"-Ratten einer no-flow Ischämie unterzogen und anschließend mit Perfusionsmedien unterschiedlicher K⁺-Konzentrationen (4 mmol/l, 6 mmol/l, 9 mmol/l) reperfundiert. Während der globalen Ischämie sank der LVDP als Ausdruck für die Auswurfleistung des Herzens stark ab. Mit Beginn der Reperfusion zeigte sich im Verlauf des LVDP zunächst ein Peak mit steilem An– und Abstieg. Dieser stellt vergleichbar der Hyperkontraktur der Einzelzelle den myokardialen Ca²⁺-Overload dar. Im Anschluss kam es zu einer langsamen inkompletten Erholung des LVDP während der 30-minütigen Reperfusion. Die Erhöhung der extrazellulären K⁺-Konzentration führte am isolierten Herzen zu Beginn der Reperfusion zu einer geringeren Ausprägung des Peaks und zu einer Verbessrung des LVDP.

In Zusammenschau der eigenen Ergebnisse und der Versuche anderer Arbeitsgruppen ist die Protektion gegen den akuten Reperfusionsschaden bei isolierten Kardiomyozyten und beim isolierten Herzen am ehesten auf eine Aktivitätssteigerung der Na⁺/K⁺-ATPase in der Frühphase der Reperfusion zurückzuführen.

7. Summary

It was shown in previous studies that an increase in extracellular K⁺-concentration activates the sodium-potassium pump (NKA). The present study aimed at testing the hypothesis that an increase in extracellular K⁺-concentration protects cardiomyocytes against reperfusion injury. Isolated cardiomyocytes from adult rats were perfused anoxically with subsequent reperfusion in the presence of different extracellular K⁺-concentrations (4 mmol/l, 6 mmol/l, 9 mmol/l, 13 mmol/l) and ouabain (200 µmol/l). The temporal course of cytosolic Ca²⁺- and Na⁺-concentrations and cell-length was measured. During ischemia cardiomyocytes developed cytosolic Ca²⁺- and Na⁺-overloads. Throughout reperfusion spontaneous Ca²⁺-oscillations occurred. These oscillations are the main cause for the reperfusion-induced hypercontracture. The increase in extracellular K⁺-concentration dose-dependently increased the recovery of cytosolic Ca²⁺ and reduced the frequency of Ca²⁺-oscillations. Additionally, a reduction of the hypercontracture was found.

Isolated hearts from adult Wistar rats were subjected to no-flow ischemia and reperfusion in the presence of different extracellular K⁺-concentrations (4 mmol/l, 6 mmol/l, 9 mmol/l). The global ischemia lead to a strong decrease of the left ventricular developed pressure (LVDP). Reperfusion leads to an incomplete recovery of LVDP indicating the reperfusion injury. The increase of extracellular K⁺-concentration leads to a smaller peak at the onset of reperfusion and improved the recovery of LVDP.

In summary, our results imply that protection against acute reperfusion injury of isolated cardiomyocytes and isolated hearts through an increased K⁺-concentration is presumably due to an increase of sodium-potassium pump activity in the early phase of reperfusion.

8. Abkürzungsverzeichnis

Chemikalien

BDM	2,3-Butanedione monoxime
CaCl ₂	Kalziumchlorid
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraazetat
EGTA	Ethylenglykol-bis-(-aminoethyl-) tetraazetat
FCS	fetales Kälberserum
Fura-2 AM	1-(2-(5-Carboxyoxazol-2-yl)-6-aminobenzofuran-5-
	oxy)-2-(-2'-amino-5'methylphenoxy)-ethan-
	N,N,N´,N´-tetraacetat
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-2-ethansulfonsäure
KB-R7943	2-[2-[4-(4-Nitrobenzyloxy)phenyl]ethyl]isothiourea
	mesylate
KCI	Kaliumclorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
КОН	Kaliumhydroxid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
N ₂	Stickstoff
NaCl	Natriumchlorid
NO	Stickstoffmonoxid
O ₂	Sauerstoff
Ru 360	(μ)[(HCO ₂)(NH ₃) ₄ Ru] ₂ OCl ₃
SB-203580	[4-(4-(4-fluorophenyl)-2-(4-(methylsulfinyl)phenyl)-
	1H-imidazol-5-yl)pyridine]
SBFI	sodium-binding benzofuran isophthalate
SEA0400	[2-[4-[(2,5-Difluorophenyl)methoxy]phenoxy]-5-
	ethoxyaniline]

Einheiten

°C	Grad Celsius
a.u.	arbitrary units (relative Einheiten)
bar	Bar

cm	Zentimeter
Eκ ⁺	Gleichgewichtspotential der K ⁺ -Konzentration
g	Gramm
kDa	Kilo-Dalton
kg	Kilogramm
mg	Milligramm
min	Minute
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mol/l, µmol/l	Stoffmengenkonzentration
mV	Milivolt
Ν	Teilchenzahl
nm	Nanometer
R	Ratio der Fluorochrome
S	Sekunde
μ q	Mikrogramm
10	Mikiogramm

Ionen, Enzyme, Zellbestandteile und Transmitter

[Ca ²⁺] _i	zytosolische Kalziumionenkonzentration
[K ⁺] _o	extrazelluläre Kaliumionenkonzentration
[Na⁺] _i	intrazelluläre Natriumionenkonzentration
[Na⁺]₀	extrazelluläre Natriumionenkonzentration
ACE	angiotensin converting enzym
ADP	Adenosindiphosphat
ANP	atriales natriuretisches Peptid
ATP	Adenosintriphosphat
Ca ²⁺	Kalziumionen
cGMP	zyklisches 3',5'-Guanosinmonophosphat
CSA	Cyclosporin A
GSK-3ß	Glykogen-Synthase-Kinase-3ß
H⁺	Wasserstoffionen
HCO ₃₋	Hydrogencarbonationen
K⁺	Kaliumionen
mPTP	mitichondriale Permeabilität-Transitions-Poren
Na ⁺	Natriumionen

NCX (FM)	Na ⁺ /Ca ²⁺ -Austauscher/ -exchanger Forward Mode
NCX (RM)	Na ⁺ /Ca ²⁺ -Austauscher/ -exchanger Reverse Mode
NHE	Na ⁺ /H ⁺ -Austauscher, Na ⁺ /H ⁺ -exchanger
NKA	Na ⁺ /K ⁺ -ATPase, sodium-potassium pump
p38 MAP-Kinase	p38-mitogenaktivierte Proteinkinase
РІЗК	Phosphatidylinositol-3-Kinase
РКА	Proteinkinase A
РКС	Proteinkinase C
PKG	Proteinkinase G
PLM	Phospholemman
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
SERCA	SR-Ca ²⁺ -ATPase
SR	sarkoplasmatisches Retikulum

Statistik

n	Anzahl
р	Signifikanzniveau
SEM	Standardabweichung des Mittelwerts

Verschiedenes

С	Konzentration
E	Gleichgewichtspotential
КНК	koronare Herzkrankheit
log	Logarithmus
LVDP	left ventricular developed pressure
LVEDP	left ventricular enddiastolic pressure
LVESP	left ventricular systolic pressure
LVP	left ventricular pressure
PC	postconditioning
PCI	perkutane koronare Intervention
PTCA	perkutane transluminale koronare Angioplastie

9. Literaturverzeichnis

- [1] Abdallah Y, Gkatzoflia A, Pieper H, Zoga E, Walther S, Kasseckert S, Schäfer M, Schlüter KD, Piper HM, Schäfer C (2005). Mechanism of cGMP-mediated protection in a cellular model of myocardial reperfusion injury. Cardiovasc Res.; 66:123-131
- [2] Abdallah Y, Gkatzoflia A, Gligorievski D, Kasseckert S, Euler G, Schlüter KD, Schäfer M, Piper HM, Schäfer C (2006). Insulin protects cardiomyocytes against reoxygenation-induced hypercontracture by a survival pathway targeting SR Ca²⁺ storage. Cardiovasc Res; 70(2):346-353
- [3] Abdallah Y, Kasseckert SA, Iraqi W, Said M, Shahzad T, Erdogan A, Neuhof C, Gündüz D, Schlüter KD, Tillmanns H, Piper HM, Reusch HP, Ladilov Y (2011). Interplay between Ca²⁺ cycling and mitochondrial permeability transition pores promotes reperfusion-induced injury of cardiac myocytes. J Cell Mol Med. 2011 Nov;15(11):2478-85.
- [4] Agulló L, Garcia-Dorado D, Inserte J et al. (1999).
 L-Arginine limits myocardial cell death secondary to hypoxia-reoxygenation by vGMP-dependent mechanism.
 Am J Physiol; 276:H1574-1580
- [5] Allshire A, Piper HM, Cuthbertson KS, Cobbold PH (1987). Cytosolic free Ca2+ in single rat heart cells during anoxia and reoxygenation. Biochem J. 1;244(2):381-5.
- [6] Altschuld RA, Ganote CE, Nayler WG, Piper HM (1991). What constitutes the calcium paradox? J Mol Cell Cardiol.; 23(6):765-7.
- Baines CP, Pritchard TJ (2009).
 Basic Cardiovascular Sciences Conference 2009: molecular mechanisms of cardiovascular disease.
 Circ Res. 2009 Dec 4;105(12):1162-3.
- [8] Bers DM, Barry WH, Despa S (2003).
 Intracellular Na⁺ regulation in cardiac myocytes.
 Cardiovascular Research 57; 897-912
- [9] Bers DM, Despa S, Bossuyt J (2006). Regulation of Ca2+ and Na+ in normal and failing cardiac myocytes. Ann N Y Acad Sci. 2006 Oct;1080:165-77. Review.
- [10] Blaustein MP, Lederer WJ (1999). Sodium/calcium exchange: its physiological implications. Physiol Rev.; 79(3):763-854.

- Bossuyt J, Despa S, Han F, Hou Z, Robia SL, Lingrel JB, Bers DM (2009). Isoform specificity of the Na/K-ATPase association and regulation by phospholemman. J Biol Chem. 2009 Sep 25;284(39):26749-57. doi: 10.1074/jbc.M109.047357.
- Bundgaard H, Liu CC, Garcia A, Hamilton EJ, Huang Y, Chia KK, Hunyor SN, Figtree GA, Rasmussen HH (2010).
 β(3) adrenergic stimulation of the cardiac na+-k+ pump by reversal of an inhibitory oxidative modification.
 Circulation. 2010 Dec 21;122(25):2699-708.
- [13] Cheung JY, Zhang XQ, Song J, Gao E, Chan TO, Rabinowitz JE, Koch WJ, Feldman AM, Wang J (2013). Coordinated regulation of cardiac Na(+)/Ca (2+) exchanger and Na (+)-K (+)-ATPase by phospholemman (FXYD1). Adv Exp Med Biol. 2013;961:175-90.
- [14] Davidson SM, Yellon DM, Murphy MP, Duchen MR (2011). Slow calcium waves and redox changes precede mitochondrial permeability transition pore opening in the intact heart during hypoxia and reoxygenation. Cardiovasc Res. 2012 Mar 1;93(3):445-53.
- [15] Davidson SM, Yellon DM, Murphy MP, Duchen MR (2012). Slow calcium waves and redox changes precede mPTP opening in the intact heart during hypoxia and reoxygenation. Cardiovasc Res. 2011 Dec 23.
- [16] Dennis SC, Gevers W, Opie LH (1991). Protons in Ischemia: Where do they come from; where do they go to? J Mol Cell Cardiol 23: 1077-1086
- [17] Despa S, Islam MA, Pogwizd SM, Bers DM (2002). Intracellular [Na+] and Na+ pump rate in rat and rabbit ventricular myocytes. J Physiol. 2002 Feb 15;539(Pt 1):133-43.
- [18] Despa S, Bossuyt J, Han F, Ginsburg KS, Jia LG, Kutchai H, Tucker AL, Bers DM (2005). Phospholemman-phosphorylation mediates the beta-adrenergic effects on Na/K pump function in cardiac myocytes. Circ Res. 2005 Aug 5;97(3):252-9.
- [19] Di Lisa F (2001). Mitochondrial contribution in the progression of cardiac ischemic injury. IUBMB Life; 52(3-5):255-61.
- [20] Di Lisa F, Bernardi P (2006). Mitochondria and ischemia-reperfusion injury of the heart: fixing a hole. Cardiovasc Res. 2006 May 1;70(2):191-9.
- [21] Di Lisa F, Bernardi P (2009). A CaPful of mechanisms regulating the mitochondrial permeability transition. J Mol Cell Cardiol. 2009 Jun;46(6):775-80.

- [22] Fidelman ML, Seeholzer SH, Walsh KB, Moore RD (1982). Intracellular pH mediates action of insulin on glykolysis in frog skeletal muscle. Am J Physiol: 242: C87-C93.
- [23] Fujita M, Asanuma H, Hirata A, Wakeno M, Takahama H, Sasaki H, Kim J, Takashima S, Tsukamoto O, Minamino T, Shinozaki Y, Tomoike H, Hori M, Kitakaze M (2007). Prolonged transient acidosis during early reperfusion contributes to the cardioprotective effects of postconditioning. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2007 Apr;292(4):H2004-8.
- [24] Fuller W, Parmar V, Eaton P, Bell JR, Shattock MJ (2003). Cardiac ischemia causes inhibition of the Na/K ATPase by a labile cytosolic compound whose production is linked to oxidant stress. Cardiovasc Res. 2003 Mar 15;57(4):1044-51.
- [25] Fuller W, Tulloch LB, Shattock MJ, Calaghan SC, Howie J, Wypijewski KJ (2012). Regulation of the cardiac sodium pump. Cell Mol Life Sci. 2012 Sep 7.
- [26] Gadsby DC (1984).

Influence of the sodium pump current on electrical activity of cardiac cells. Soc Gen Physiol Ser. 1984;38:215-38.

[27] Ganote CE (1983).

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

- [28] Garcia-Dorado D, Theroux P, Duran JM, Solares J, Alonso J, Sanz E, Munoz R, Elizaga J, Botas J, Fernandez-Aviles F (1992). Selective inhibition of the contractile apparatus: a new approach to modification ofinfarct size, infarct composition, and infarct geometry during coronary artery occlusion and reperfusion. Circulation 85:1160-74
- [29] Garcia-Dorado D, Inserte J, Ruiz-Meana M et al. (1997). Gap junction uncoupler heptanol prevents cell-to-cell progression of hypercontracture and limits necrosis during myocardial reperfusion. Circulation 96:3579-3586
- [30] Garcia-Dorado D, Rodriguez-Sinovas A, Ruiz-Meana M, Inserte J, Agulló L, Cabestrero A (2006). The end-effectors of preconditioning protection against myocardial cell death secondary to ischemia-reperfusion.

Cardiovasc Res; 70(2):274-85.

[31] García-Rivas Gde J, Carvajal K, Correa F, Zazueta C (2006). Ru360, a specific mitochondrial calcium uptake inhibitor, improves cardiac postischaemic functional recovery in rats in vivo. Br J Pharmacol. 2006 Dec;149(7):829-37.

[32]	Glitsch HG, Pusch H, Verdonck F (1986). The contribution of Na and K ions to the pacemaker current in sheep cardiac Purkinje fibres. Pflugers Arch.; 406(5):464-71.
[33]	Glitsch HG (2001). Electrophysiology of the sodium-potassium-ATPase in cardiac cells. Physiol Rev.; 81(4):1791-826.
[34]	Griffiths EJ and Halestrap AP (1995). Mitochondrial non-specific pores remain closed during cardiac ischaemia, but open upon reperfusion. Biochem J.; 1;307 (Pt 1):93-8.
[35]	Griffiths EJ (2009). Mitochondrial calcium transport in the heart: physiological and pathological roles. J Mol Cell Cardiol; 46(6):789-803.
[36]	Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY (1985). A new generation of Ca ²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. J Biol Chem 260:3440-3450
[37]	Halestrap AP, Clarke SJ, Javadov SA (2004). Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusiona target for cardioprotection. Cardiovasc Res; 61:372-85.
[38]	Halestrap AP (2009). What is the mitochondrial permeability transition pore? J Mol Cell Cardiol.; 46(6):821-31
[39]	Halkos ME, Kerendi F, Corvera JS, Wang NP, Kin H, Payne CS, Sun HY, Guyton RA, Vinten-Johansen J, Zhao ZQ (2004). Myocardial protection with postconditioning is not enhanced by ischemic preconditioning. Ann Thorac Surg.; 78(3):961-9; discussion 969.
[40]	Han F, Tucker AL, Lingrel JB, Despa S, Bers DM (2009). Extracellular potassium dependence of the Na+-K+-ATPase in cardiac myocytes: isoform specificity and effect of phospholemman. Am J Physiol Cell Physiol. 2009 Sep;297(3):C699-705.
[41]	Harootunian AT, Kao JP, Eckert BK, Tsien RY (1989). Fluorescence ratio imaging of cytosolic free Na ⁺ in individual fibroblasts and lymphocytes. J Biol Chem.; 264(32):19458-67.
[42]	Hausenloy DJ, Yellon DM (2007). Reperfusion injury salvage kinase signalling: taking a RISK for cardioprotection. Heart Fail Rev; 12:217-34.
- [43] Hausenloy DJ, Boston-Griffiths EA, Yellon DM (2012). Cyclosporin A and cardioprotection: from investigative tool to therapeutic agent. Br J Pharmacol. 2012 Mar;165(5):1235-45.
- [44] Hempel A, Friedrich M, Schlüter KD, Forssmann WG, Kuhn M, Piper HM (1997). ANP protects against reoxygenation-induced hypercontracture in adult cardiomyocytes. Am J Physiol; 273:H244-9.
- [45] Howell NJ, Ashrafian H, Drury NE, Ranasinghe AM, Contractor H, Isackson H, Calvert M, Williams LK, Freemantle N, Quinn DW, Green D, Frenneaux M, Bonser RS, Mascaro JG, Graham TR, Rooney SJ, Wilson IC, Pagano D (2011).

Glucose-insulin-potassium reduces the incidence of low cardiac output episodes after aortic valve replacement for aortic stenosis in patients with left ventricular hypertrophy: results from the Hypertrophy, Insulin, Glucose, and Electrolytes (HINGE) trial. Circulation.;123(2):170-7

[46] Inserte J, Garcia-Dorado D, Ruiz-Meana M et al. (2002). Effect of inhibition of Na (+)/Ca(2+) exchanger at the time of myocardial reperfusion on hypercontracture and cell death. Cardiovasc Res; 55:739-748

- [47] Inserte J, Garcia-Dorado D, Hernando V, Soler-Soler J (2005). Calpain-mediated impairment of Na+/K+-ATPase activity during early reperfusion contributes to cell death after myocardial ischemia. Circ Res; 97:465-73
- [48] Inserte J, Barba I, Hernando V, Garcia-Dorado D (2009). Delayed recovery of intracellular acidosis during reperfusion prevents calpain activation and determines protection in postconditioned myocardium. Cardiovasc Res.; 81(1):116-22
- [49] Iwamoto T (2004).
 Forefront of Na⁺/Ca²⁺ exchanger studies: molecular pharmacology of Na⁺/Ca²⁺ exchange inhibitors.
 J Pharmacol Sci.; 96(1):27-32
- [50] Jennings RB, Sommers HM, Smyth GA, Flack HA, Linn H (1960). Myocardial necrosis induced by temporary occlusion of a coronary artery in the dog. Arch Pathol.; 70:68-78.
- [51] Kang S, Cannom DS (2004). Current role of device therapy to reduce sudden cardiac death in heart failure. Curr Heart Fail Rep.; 1(3):104-10.

[52] Karow T, Lang R (2013). Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie 21. Auflage, 2013

- [53] Kitakaze M, Asakura M, Kim J, Shintani Y, Asanuma H, Hamasaki T (2007). Human atrial natriuretic peptide and nicorandil as adjuncts to reperfusion treatment for acute myocardial infarction (J-WIND): two randomised trials. Lancet; 370:1483-93.
- [54] Ladilov YV, Siegmund B, Piper HM (1995).
 Protection of reoxygenated cardiomyocytes against hypercontracture by inhibition of Na+/H+ exchange.
 Am J Physiol 268:H1531-1539
- [55] Ladilov YV, Siegmund B, Piper HM (1997). Simulated ischemia increases the susceptibility of rat cardiomyocytes to hypercontracture. Circ Res; 80:69-75
- [56] Larsen R (2007). Anästhesie und Intensivmedizin Springer-Medizin-Verlag, 7.Auflage, 763-764
- [57] Li Q, Altschuld RA, Stokes BT (1987). Quantitation of intracellular free calcium in single adult cardiomyocytes by fura-2fluorescence microscopy: calibration of fura-2 ratios. Biochem Biophys Res Commun ;147:120-126
- [58] Löffler G, Petrides PE, Heinrich PC (2007). Biochemie und Pathobiochemie 2007 (8. Auflage), Springer-Verlag
- [59] Lønborg J, Kelbaek H, Vejlstrup N, Jørgensen E, Helqvist S, Saunamäki K, Clemmensen P, Holmvang L, Treiman M, Jensen JS, Engstrøm T (2010). Cardioprotective effects of ischemic postconditioning in patients treated with primary percutaneous coronary intervention, evaluated by magnetic resonance. Circ Cardiovasc Interv. 1;3(1):34-41.

[60] Ludbrook J (1994).

Repeated measurements and multiple comparisons in cardiovascular research. Cardiovasc Res.; 28(3):303-11.

- [61] Mehta SR, Yusuf S, Díaz R, Zhu J, Pais P, Xavier D, Paolasso E, Ahmed R, Xie C, Kazmi K, Tai J, Orlandini A, Pogue J, Liu L; CREATE-ECLA Trial Group Investigators (2005). Effect of Glucose-Insulin-Potassium Infusion on Mortality in Patients With Acute ST-Segment Elevation Myocardial Infarction. The CREATE-ECLA Randomized Controlled Trial. JAMA.; 293(4):437-46.
- [62] Na HS, Kim YI, Yoon YW, Han HC, Nahm SH, Hong SK (1996). Ventricular premature beat-driven intermittent restoration of coronary blood flow reduces the incidence of reperfusion-induced ventricular fibrillation in a cat model of regional ischemia. Am Heart J.;132(1 Pt 1):78-83.

[63] Nakao M, Gadsby DC (1989).

[Na] and [K] dependence of the Na/K pump current-voltage relationship in guinea pig ventricular myocytes. J Gen Physiol.; 94(3):539-65.

- [64] Nichols CG, Lederer WJ (1990). The role of ATP in energy-deprivation contractures in unloaded rat ventricular myocytes. Can J Physiol Pharmacol ; 68:183-94.
- [65] Ovize M, Baxter GF, Di Lisa F, Ferdinandy P, Garcia-Dorado D, Hausenloy DJ, Heusch G, Vinten-Johansen J, Yellon DM, Schulz R (2010). Postconditioning and protection from reperfusion injury: where do we stand? Position paper from the Working Group of Cellular Biology of the Heart of the European Society of Cardiology. Cardiovasc Res.; 1;87(3):406-23
- [66] Owens LM, Fralix TA, Murphy E, Cascio WE, Gettes LS (1996). Correlation of ischemia-induced extracellular and intracellular ion changes to cell-tocellelectrical uncoupling in isolated blood-perfused rappid hearts. Experimental Working Group.
- [67] Padilla F, Garcia-Dorado D, Agulló L, Barrabés JA, Inserte J, Escalona N, Meyer M, Mirabet M, Pina P, Soler-Soler J (2001). Intravenous administration of the natriuretic peptide urodilatin at low doses during coronary reperfusion limits infarct size in anesthetized pigs. Cardiovasc Res 15;51:592-600.
- [68] Park SS, Zhao H, Mueller RA, Xu Z (2006). Bradykinin prevents reperfusion injury by targeting mitochondrial permeability transition pore through glycogen synthase kinase 3beta. J Mol Cell Cardiol; 40:708-16.
- [69] Perrelli MG, Pagliaro P, Penna C (2011). Ischemia/reperfusion injury and cardioprotective mechanisms: Role of mitochondria and reactive oxygen species. World J Cardiol. 2011 Jun 26; 3(6):186-200.
- [70] Piot C, Croisille P, Staat P, Thibault H, Rioufol G, Mewton N et al (2008). Effect of cyclosporine on reperfusion injury in acute myocardial infarction. N Engl J Med; 359:473-81.
- [71] Piper HM, Abdallah Y, Schäfer C (2004). The first minutes of reperfusion: a window of opportunity for cardioprotection. Cardiovasc Res 61:365-367
- [72] Piper HM, Kasseckert SA, Abdallah Y (2006). The sarcoplasmic reticulum as the primary target of reperfusion protection. Cardiovasc Res; 70:170-3.
- [73] Piper HM, Kasseckert SA, Schlüter KD, Abdallah Y (2008). Pathophysiologie des myokardialen Reperfusionsschaden. Dtsch Med Wochenschr; 133:586-90

[74] Rasmussen HH, Figtree G (2007).

"Don't flog the heart!" - development of specific drug therapies for heart failure. Crit Care Resusc. 2007 Dec;9(4):364-9.

- [75] Reinhard L, Tidow H, Clausen MJ, Nissen P (2012).
 Na(+),K (+)-ATPase as a docking station: protein-protein complexes of the Na(+),K (+)-ATPase.
 Cell Mol Life Sci. DOI: 10.1007/s00018-012-1039-9
- [76] Rupprecht HJ, vom Dahl J, Terres W, Seyfarth KM, Richardt G, Schultheibeta HP, Buerke M, Sheehan FH, Drexler H (2000). Cardioprotective effects of the Na(+)/H(+) exchange inhibitor cariporide in patients with acute anterior myocardial infarction undergoing direct PTCA. Circulation; 101:2902-8.
- [77] Sack MN, Yellon DM (2003). Insulin therapy as an adjunct to reperfusion after acute coronary ischemia: a proposed direct myocardial cell survival effect independent of metabolic modulation. J Am Coll Cardiol; 41:1404-7.
- [78] Schäfer C, Ladilov YV, Siegmund B, Piper HM (2000). Importance of bicarbonate transport for protection of cardiomyocytes against reoxygenation injury. Am Physiol Heart Circ Physiol; 278: H1457-63
- [79] Schäfer C, Ladilov Y, Inserte J, Schäfer M, Haffner S, Garcia-Dorado D, PiperHM (2001). Role of the reverse mode of the Na+/Ca2+ exchanger in reoxygenation-induced cardiomyocyte injury. Cardiovasc Res; 51:241-50
- [80] Schlüter KD, Weber M, Schraven E, Piper HM (1994). NO donor SIN-1 protects against reoxygenation-induced cardiomyocyte injury by a dual action. Am J Physiol. 1994 Oct;267(4 Pt 2):H1461-6.
- [81] Schlüter KD, Jakob G, Ruiz-Meana M, Garcia-Dorado D, Piper HM (1996) Protection of reoxygenated cardiomyocytes against osmotic fragility by nitric oxide donors. Am J Physiol.; 271(2 Pt 2):H428-34.
- [82] Schlüter KD, Schreiber D (2005). Adult ventricular myocytes:. Isolation and culture. Methods Mol Biol.;290:305-14
- [83] Schmidt RF, Lang F, Heckmann M (2010). Physiologie des Menschen Springer-Medizin-Verlag, 31. Auflage
- [84] Schmidt TA, Kjeldsen K (1998) Human myocardial Na,K-ATPase--quantification, regulation and relation to Ca. Cardiovasc Res.; 37(2):335-45.

- [85] Shahzad T, Kasseckert SA, Iraqi W, Johnson V, Schulz R, Schlüter KD, Dörr O, Parahuleva M, Hamm C, Ladilov Y, Abdallah Y (2013). Mechanisms involved in postconditioning protection of cardiomyocytes against acute reperfusion injury. J Mol Cell Cardiol. 2013 Jan 15.
- [86] Siegmund B, Klietz T, Schwartz P, Piper HM (1991). Temporary contractile blockade prevents hypercontracture in anoxicreoxygenated cardiomyocytes. Am J Physiol; 260:H426-35
- [87] Siegmund B, Zude R, Piper HM (1992). Recovery of anoxic-reoxygenated cardiomyocytes from severe Ca2+ overload. Am J Physiol; 263:H1262-9
- [88] Siegmund B, Ladilov YV, Piper HM (1994). Importance of sodium for recovery of calcium control in reoxygenated cardiomyocytes. Am J Physiol; 267:H506-13
- [89] Siegmund B, Schlack W, Ladilov YV, Balser C, Piper HM (1997). Halothane protects cardiomyocytes against reoxygenation-induced hypercontracture. Circulation; 96:4372-9.
- [90] Sodi-Pallares D, Medrano G, Fishleder B, Bisteni A, Friedland C, Testelli M (1992). Effect of glucose-insulin-potassium solutions on the electrocardiogram in acute

and chronic cornary insufficiency. Mal Cardiovasc.; 1962 Mar; 3:41-79.

- [91] Staat P, Rioufol G, Piot C, Cottin Y, Cung TT, L'Huillier I, Aupetit JF, Bonnefoy E, Finet G, André-Fouët X, Ovize M (2005). Postconditioning the human heart. Circulation; 112:2143-8.
- [92] Suhail M (2010).
 Na, K-ATPase: Ubiquitous Multifunctional Transmembrane Protein and its Relevance to Various Pathophysiological Conditions.
 J Clin Med Res. 2010 Feb;2(1):1-17. doi: 10.4021/jocmr2010.02.263w.
- [93] Sumida T, Otani H, Kyoi S, Okada T, Fujiwara H, Nakao Y, Kido M, Imamura H (2005). Temporary blockade of contractility during reperfusion elicits a cardioprotective effect of the p38 MAP kinase inhibitor SB-203580. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2005 Jun;288(6):H2726-34.
- [94] Tani M, Hasegawa H, Suganuma Y, Shinmura K, Kayashi Y, Nakamura Y (1996). Protection of ischemic myocardium by inhibition of contracture in isolated rat heart.

Am J Physiol. 1996 Dec;271(6 Pt 2):H2515-9.

- [95] Teixeira G, Abrial M, Portier K, Chiari P, Couture-Lepetit E, Tourneur Y, Ovize M, Gharib A (2013). Synergistic protective effect of cyclosporin A and rotenone against hypoxiareoxygenation in cardiomyocytes. J Mol Cell Cardiol. 2013 Mar;56:55-62.
- [96] Thibault H, Piot C, Staat P, Bontemps L, Sportouch C, Rioufol G, Cung TT, Bonnefoy E, Angoulvant D, Aupetit JF, Finet G, André-Fouët X, Macia JC, Raczka F, Rossi R, Itti R, Kirkorian G, Derumeaux G, Ovize M (2008). Long-term benefit of postconditioning. Circulation; 117:1037-4
- [97] Tóth A, Kiss L, Varró A, Nánási PP (2009). Potential therapeutic effects of Na⁺/Ca²⁺ exchanger inhibition in cardiac diseases. Curr Med Chem.;16(25):3294-321
- [98] Vlasselaers D (2011). Glucose-insulin-potassium: much more than enriched myocardial fuel. Circulation.;123(2):129-30
- [99] Wakabayashi S, Hisamitsu T, Nakamura TY (2013). Regulation of the cardiac Na(+)/H(+) exchanger in health and disease. J Mol Cell Cardiol. 2013 Aug; 61:68-76.
- [100] William M, Vien J, Hamilton E, Garcia A, Bundgaard H, Clarke RJ, Rasmussen HH (2005). The nitric oxide donor sodium nitroprusside stimulates the Na+-K+ pump in isolated rabbit cardiac myocytes. J Physiol. 2005 Jun 15;565(Pt 3):815-25.
- [101] Wolff HP, Weihrauch TR (2010). Internistische Therapie 2010, 2011 18. Auflage 2010, Urban&Fischer-Verag, Elsevier GmbH, München
- [102] Wright EM, Loo DD, Hirayama BA (2011). Biology of human sodium glucose transporters. Physiol Rev. 2011 Apr;91(2):733-94.Review.
- [103] Yamamoto H, Magishi K, Goh K, Sasajima T, Yamamoto F (2009). Cardioprotective Effects of normothermic reperfusion with oxygenated potassium cardioplegia: A possible mechanism. Interact cardiovasc thorac surg.; 9(4):598-604
- [104] Yellon DM, Hausenloy DJ (2007). Myocardial reperfusion injury. N Engl J Med. 13;357(11):1121-35.
- [105] Zhang L, Zhang Z, Guo H, Wang Y (2008). Na+/K+-ATPase-mediated signal transduction and Na+/K+-ATPase regulation. Fundam Clin Pharmacol. 2008 Dec;22(6):615-21.

[106] Zhao ZQ, Corvera JS, Halkos ME, Kerendi F, Wang NP, Guyton RA, Vinten-Johansen J (2003). Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning.

Am J Physiol Heart Circ Physiol.; 285(2):H579-88.

- [107] Zhao YT, Weng CL, Chen ML, Li KB, Ge YG, Lin XM, Zhao WS, Chen J, Zhang L, Yin JX, Yang XC (2010). Comparison of glucose-insulin-potassium and insulin-glucose as adjunctive therapy in acute myocardial infarction: a contemporary meta-analysis of randomised controlled trials. Heart. 2010 Oct;96(20):1622-6Z
- [108] Zheng J, Koh X, Hua F, Li G, Larrick JW, Bian JS (2011). Cardioprotection induced by Na(+)/K(+)-ATPase activation involves extracellular signal-regulated kinase 1/2 and phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway. Cardiovasc Res. 2011 Jan 1;89(1):51-9.
- [109] Zhou L, Cryan EV, D'Andrea MR, Belkowski S, Conway BR, Demarest KT (2003).

Human cardiomyocytes express high level of Na+/glucose cotransporter 1 (SGLT1).

J Cell Biochem. 2003 Oct 1;90(2):339-46.

[110] Zhu J, Rebecchi MJ, Glass PS, Brink PR, Liu L (2011).

Cardioprotection of the aged rat heart by GSK-3beta inhibitor is attenuated: age-related changes in mitochondrial permeability transition pore modulation. Am J Physiol Heart Circ Physiol. ; 300(3):H922-30.

10. Erklärung zur Dissertation

"Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten 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 auter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der "Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis" niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden."

Ort, Datum

Unterschrift

11. DANKSAGUNG

Herrn Professor Dr. Dr. H. Michael Piper als ehemaligem Direktor des Physiologischen Instituts und Leiter der Arbeitsgruppe danke ich für die Bereitstellung des Themas und des Arbeitsplatzes innerhalb des Physiologischen Instituts, für die hervorragende Betreuung und die hilfreiche Kritik, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein größter Dank gilt Herrn PD Dr. Yaser Abdallah, der mich im Rahmen dieser Arbeit zunächst als Betreuer und später als Doktorvater angeleitet hat. Vielen Dank für die engagierte und ausdauernde Betreuung, die wertvollen Anregungen zu meiner Arbeit und die unermüdliche Motivation und Geduld!

Ich danke ganz herzlich den technischen Assistenten/innen des Physiologischen Instituts, insbesondere Daniela Schreiber. Ohne die fachkundige Hilfe und Unterstützung wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen!

Für ihre Hilfsbereitschaft und für ihre Freundlichkeit danke ich meinen ehemaligen Mitstreitern im Calciumlabor: Dr. Claudia Schäfer, Dr. Sascha Kasseckert, Dr. Anna Gkatzovlia, Dr. Dragan Gligorievski, Dr. Sabine Walther und Bettina Rother.

Für das freundliche, entspannte Arbeitsklima danke ich allen anderen Mitgliedern des Physiologischen Instituts.

Abschließend gilt mein besonderer Dank meinem Ehemann, der mir zur Seite gestanden und mich immer ermutigt hat. Ohne die nötigen Freiräume wäre diese Arbeit neben meiner Vollzeittätigkeit als Truppenarzt nicht möglich gewesen!