

Wechselwirkung von normoxischen und anoxischen Kardiomyozyten mit polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten

Inaugural-Dissertation

**zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Humanmedizin
der Justus-Liebig-Universität Giessen**

**vorgelegt von Zoltán Szalay
aus Giessen**

Giessen 1997

**Aus dem Max-Planck-Institut für Physiologische und Klinische Forschung
Kerckhoff-Institut
Abteilung Experimentelle Kardiologie
Leiter: Prof. Dr. Dr. h. c. Schaper
in Bad Nauheim**

Gutachter: Prof. Dr. Dr. h. c. Schaper

Gutachter: Prof. Dr. Teschemacher

Tag der Disputation: 04.05.1999

Inhalt

Seite

Abkürzungsverzeichnis	1
1. Einleitung.....	2
1.1. Schädigung des Myokards und mögliche Folgen.....	2
1.2. Physiologische Funktion der Neutrophilen und der „respiratory burst“	4
1.3. In-vitro-Wechselwirkungen von PMN und Myozyten.....	5
2. Fragestellung und Ziel der Arbeit	6 7
3. Methoden.....	
3.1. Isolierung adulter Rattenkardiomyozyten mit einer modifizierten Langendorff-Perfusionsapparatur.....	7 7
3.1.1. Vorbereiten der Langendorff-Perfusionsapparatur.....	8
3.1.2. Präparation und Perfusion des Herzens.....	8
3.1.3. Isolierung und Kultivierung der Myozyten.....	9
3.1.4. Anoxie der Myozyten unter in-vitro-Bedingungen.....	9
3.1.5. Separieren von Membranbestandteilen.....	9 9
3.2. Isolation polymorphkerniger Neutrophiler.....	9
3.2.1. Isolierung der Neutrophilen aus Rattenblut.....	
3.2.2. Charakterisierung und Färbung von Leukozyten- bzw. Neutrophilenfraktion.....	11 12
3.3. Meßanordnung des In-vitro-Modells und Detektion freier Radikale.....	14
3.3.1. Meßprogramm „Kinetics“.....	15
3.3.2. Meßprogramm „Cellular Luminescence“.....	16
3.4. Lichtmikroskopie	16
3.5. Statistische Auswertung	

4. Ergebnisse.....	17
4.1. Lichtmikroskopische Charakterisierung isolierter Leukozyten und polymorphkerniger Neutrophiler.....	17
4.2. Meßbedingungen und deren Einfluß auf das Ergebnis der Biolumineszenzmessung.....	19
4.3. Unterschiede in der Kinetik des „oxidative burst“	22
4.4. Veränderung des „burst“ in Anwesenheit von Myozyten.....	25
4.5. Untersuchung des anoxischen Inkubates, des reoxygenierten Inkubates und der anoxischen Zellen.....	30
4.6. Lichtmikroskopische Unterschiede von anoxischen und normoxischen Kardiomyozyten.....	35
4.7. Lichtmikroskopie von Myozyten unter Meßbedingungen.....	38
4.8. Charakteristische Veränderungen während der Co-Kultur von aktivierten PMN mit Myozyten.....	40
4.8.1. Normoxische Myozyten und aktivierte PMN im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne PMN-Inkubation.....	40
4.8.2. 12h anoxische Myozyten und aktivierte PMN im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne PMN-Inkubation.....	44
4.9.1. Einfluß von Oberflächenstrukturen auf die Interaktion von Myozyten und PMN.....	47
4.9.2. Der Einfluß von Neuraminidase in der Co-Kultur.....	51
4.10.1. Membranfraktion der Myozyten als Zusatz im Biolumineszenzassay.....	52
4.11.1. Untersuchungen am SOD-System der Myozyten.....	56
4.11.2. Der Einfluß von SOD-Inhibitor in der Co- Kultur.....	57
5. Diskussion.....	59
5.1. Auswahl der Methoden.....	
5.2. Interpretation und Kritik der Ergebnisse.....	

5.2.2. Abschließende Anmerkungen über die für die Interaktion wesentlichen Aspekte.....	61
5.3. Ausblick.....	63
6. Zusammenfassung.....	63
7. Anhang	65
7.1. Material.....	65
7.1.1. Chemikalien und Material.....	65
7.1.2. Lösungen und Puffer.....	67
7.1.2.1. Lösungen und Puffer zur Myozyten-Isolation.....	67
7.1.2.2. Lösungen und Puffer für die Isolation von Ratten-PMN.....	71
7.1.2.3. Lösungen zur Biolumineszenzmessung.....	71
7.1.2.4. Lösungen und Substanzen zur Aktivierung von PMN.....	72
7. Literatur.....	73
8. Abbildungsverzeichnis.....	78

Abkürzungsverzeichnis

AD	Adenosin-Deaminase
AMy	anoxische Myozyten
BSA	Bovine Serum Albumine (Rinderserumalbumin)
DMSO	Dimethylsulfoxid
fMLP	N-formyl-Met-Leu-Phe
HES	Hepes Earlsalz-Lösung
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethansulfonsäure
HPO	Horseradish Peroxidase
iFKS	inaktiviertes fötales Kälberserum
K	Kontrolle
KHM	Krebs-Henseleit-Medium
NADPH	Nikotinamid-adenin-dinukleotid-phosphat (reduzierte Form)
NMy	normoxische Myozyten
PBS	Phosphatpuffer
PLC	Phospholipase C
PLD	Phospholipase D
PKC	Proteinkinase C
PMA	Phorbol-12Myristat-13-Azetat
PMN	polymorphkernige Neutrophile
SOD	Superoxid-Dismutase
Zym	Zymosan

1. Einleitung

1.1. Schädigung des Myokards und mögliche Folgen

Der Myokardinfarkt oder die ischämische Myokardnekrose ist in der Regel Folge einer abrupten Abnahme der Koronardurchblutung eines Herzmuskelabschnittes. Die Ischämie (unzureichende oder fehlende Blutzufuhr) führt zum Sauerstoffmangel des Myokardbezirkes distal vom Koronarverschluß. Dies hat die Umstellung des Zellstoffwechsels auf die weniger effektive anaerobe Glykolyse zur Folge. Besteht der Koronarverschluß längere Zeit, so ist die Schädigung der Kardiomyozyten irreversibel, und es entwickelt sich ein Nekrosebezirk. Vom Rand her wird das Infarktgebiet mit einer aus Granulationsgewebe bestehenden Zone umgeben. Die irreversibel geschädigten Myozyten werden durch in das Gewebe eingewanderte Granulozyten abgeräumt, und durch Vermehrung der Fibrozyten und kollagenen Fasern entwickelt sich so innerhalb von mehreren Wochen aus dem Nekrosebezirk Narbengewebe.

Ist die Ischämie von kürzerer Dauer, so überstehen die Myozyten reversibel geschädigt die Unterbrechung der Blutzufuhr. Zelluläre Veränderungen als Folge der stattgefundenen ischämischen und anaeroben Stoffwechsellage der Myozyten bleiben aber nicht aus. Im azidotischen Milieu häufen sich Stoffwechselprodukte an, chemotaktische Stoffe können gebildet werden und andere Stoffwechselwege werden beschritten, so daß während der Ischämie beispielsweise zelluläre Oberflächenstrukturen, wie der Rezeptorstatus der ischämischen Zellen, sich ändern können (*Danilenko et al 1992* und *McEver 1991*). Endothelzellen sind z.B. in der Lage auf einen Stimulus hin (z.B. IL-1 (Interleukin 1), LPS (Lipopolysacharide) oder TNF (Tumornekrosefaktor)) IL-8 zu bilden (*Baggiolini et al. 1989,1993* und *Springer 1990*), einen für Neutrophile chemotaktischer Faktor, und an der Zelloberfläche der Endothelzellen erscheinen Leukozytenrezeptoren z.B. GMP 140 (*Berton et al. 1992, Granger et al. 1993* und *Patel et al. 1991*), ein Rezeptor für polymorphkernige Neutrophile (PMN).

Wie sehr die Zellen durch die Ischämie geschädigt werden, hängt einerseits vom Zelltyp ab, denn die Toleranz der verschiedenen Zelltypen im Organismus gegenüber ischämischen Bedingungen ist sehr unterschiedlich. Die Neurone im zentralen Nervensystem beispielsweise können nur einige Minuten ohne Sauerstoff überleben. Dagegen sind die Kardiomyozyten etwas resistenter und tolerieren längere Ischämiezeiten, weisen aber häufig starke morphologische Schäden, als Folge der ungenügenden Sauerstoff- und Substratzufuhr, auf (*Schaper et al. 1984, Quaipe et al. 1991, Vander Heide et al. 1986* und *Siegmund et al. 1990*).

Wie erwähnt kommt es durch eine Ischämie zur Nekrose des Herzmuskelgewebes (Infarkt). Um eine Nekrose des Myokards zu verhindern muß für eine rechtzeitige Wiederdurchblutung gesorgt werden. Durch die zeitige lokale fibrinolytische Therapie ist es möglich, den Thrombus, der den Gefäßverschluß verursacht hat, aufzulösen. Das nach der Rekanalisation mit Blut reperfundierte Herzmuskelgewebe kann sich

bei kurzzeitiger Ischämie regenerieren. Durch die Reperfusion werden die Zellprodukte, die während der Ischämie gebildet wurden, z.B. Zellstoffwechselendprodukte (Laktat, Adenosin etc.), ausgewaschen. Mit dem Blut gelangen neue Substrate des Zellstoffwechsels, wie Glukose und Sauerstoff als wichtige Grundsubstanzen zu den der Ischämie ausgesetzten Zellen. Daneben werden durch den „Reflow“ Leukozyten in den betreffenden Herzmuskelbezirk eingeschwemmt (*Fulton et al. 1965*). Granulozyten können aus dem Blutstrom in das Herzmuskelgewebe einwandern und so extravasal eine ihrer physiologischen Funktionen, nämlich die Beseitigung von abgestorbenen Zellen (hier im Sinne von Einzelzellnekrosen im ischämischen Myokardium) durch Phagozytose, erfüllen (*Gottwing et al. 1982*).

Einige Autoren (*Mullane 1991, Engler 1989, Osborn 1990 und Semb et al. 1990*) vermuten eine Beteiligung der Granulozyten am Phänomen des sogenannten Reperfusionsschadens. Diese Hypothese geht davon aus, daß bei der Reperfusion des vorübergehend ischämischen Gebietes mit dem Blut „Faktoren“ eingeschwemmt werden, welche die kurzzeitig ischämischen Myozyten schädigen. Als Reaktion auf die Vorgänge im und um das postischämische Areal könnten neutrophile Granulozyten alarmiert und angelockt werden und daraufhin in den betreffenden Myokardbezirk bei Reperfusion einwandern. Einige Studien haben gezeigt, daß freie Sauerstoffradikale, gebildet von aktivierten neutrophilen Granulozyten, eine große Rolle in der Pathogenese des postischämischen Reperfusionsschadens spielen können (*Sawa et al. 1990, Ward 1991 und Henry et al. 1990*). Freie Radikale können grundsätzlich folgenden unterschiedlichen Reaktionen des Zellstoffwechsels entstammen (*Flaherty et al. 1991*):

1. Der Xanthin-Oxidase-Reaktion (dieser Reaktion entstammen z.B. während der Ischämie von Endothelzellen der Ratte gebildete Radikale),
2. als ein physiologisches Nebenprodukt der Atmungskette in den Mitochondrien,
3. dem Prostaglandin- und
4. dem Katecholaminstoffwechsel, sowie
5. aus aktivierten neutrophilen Granulozyten.

Bestimmte Stoffe (dazu zählen bakterielle Zellwandbestandteile, aber auch Moleküle wie das C5a des Komplementsystems, der Tumornekrosefaktor (TNF) oder Interleukine u.a.) sind in der Lage polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN) zur Produktion von reaktiven Sauerstoffprodukten zu aktivieren. Letzterem Ursprungsort von Sauerstoffradikalen, nämlich den aktivierten polymorphkernigen Neutrophilen (PMN), soll besondere Aufmerksamkeit gewidmet werden in der Annahme, daß die neutrophilen Granulozyten eine entscheidende Rolle in der Interaktion mit ischämischen Myozyten spielen, so daß deren massive Erzeugung von Sauerstoffradikalen während des „respiratory burst“ die der Ischämie ausgesetzten Kardiomyozyten zusätzlich schädigen können (*Ferrari et al. 1993 und 1995, Opie 1989 und 1993*).

1.2. Physiologische Funktion der Neutrophilen und der „respiratory burst“

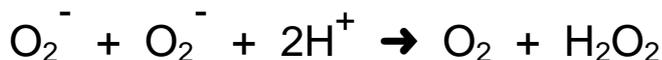
Die polymorphkernigen Neutrophilen sind eine 60 - 70% betragende Subpopulation der Granulozyten und physiologischerweise im Körper für die unspezifische Infektabwehr zuständig. Angelockt durch chemotaktisch wirkende Stoffe (C5a (Komplementfaktor 5a), N-formylmethionyl-Peptide bakteriellen Ursprunges (*Bengis-Garber et al. 1991*), PAF (Plättchen aktivierender Faktor), LTB₄ (Leukotrien B₄), Bakterientoxine etc.) wandern sie durch Diapedese aus den Kapillaren in das Entzündungsgebiet aus. Bei Kontakt mit stimulierendem Material, z.B. Bakterienoberflächen, kommt es zur rapiden Produktion von Sauerstoffradikalen durch die membranständige Nikotinamid-adenin-dinukleotid-phosphat (reduzierte Form) (=NADPH) - Oxidase (*Steinbeck et al. 1992*) der PMN. Diese NADPH : O₂⁻ Oxidoreduktase transferiert ein Elektron vom Donor NADPH zu einem Molekül Sauerstoff, so daß ein Superoxid Anion (O₂⁻) entsteht. O₂⁻ wird in reaktive Sauerstoff-Spezies wie Wasserstoffperoxid (H₂O₂), O₂, Hydroxyl-Radikale (•OH) und Hypochlorsäure (HOCl) umgewandelt, letztere wird in Anwesenheit von Cl⁻ und H₂O₂ durch die Myeloperoxidase der PMN gebildet.

Reaktionsablauf und -formeln der Sauerstoffradikalbildung:

Die NADPH-Oxidase Reaktion führt zunächst zur Produktion von Superoxid Anionen (*Johnston et al. 1975*):



Durch sekundäre Prozesse entstehen andere Sauerstoffradikal-Produkte, welche z.T. noch reaktionsfähiger und aggressiver sind: Hypochlorsäure (HOCl), „Singlet Oxygen“ (¹O₂), Hydrogenperoxid (H₂O₂) und Hydroxylradikale (OH). Die Bildung von H₂O₂ aus Superoxid Anionen entsteht spontan bei niedrigem pH oder vermittelt durch SOD:

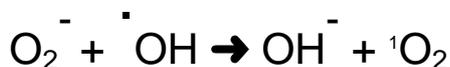


Die **MPO** (Myeloperoxidase) führt zur Bildung von **HOCl** (Hypochlorsäure)

Haber Weiss Reaktion:



Weitere sekundäre Prozesse:



Nach dem „respiratory burst“, einer massiven Produktion freier Radikale, nach der Degranulation der proteolytischen Vesikel und Adhäsion folgt normalerweise die Phagozytose. Einmal aktivierte Granulozyten können Fremdkörper, Bakterien, Pilze oder zerstörtes Gewebe aufnehmen und Keime durch vor allem in den Granula befindliche Enzyme unter Bildung von Wasserstoffsuperoxid abtöten.

Man unterscheidet zwei Typen von Phagozyten (Zellen mit der Fähigkeit unbelebte oder belebte „Fremd“-partikel aufzunehmen und zu verdauen):

- a) Die mobilen Phagozyten, hierzu zählen die Granulozyten und
- b) die überwiegend gewebsangesiedelten Makrophagen, hierzu rechnet man beispielsweise die Monozyten. Ist die Phagozytosefähigkeit des Granulozyten erschöpft, so stirbt die Zelle ab.

2. Fragestellung und Ziel der Arbeit

Ziel der Untersuchung ist es, durch ein geeignetes in-vitro-Modell selektiv die Wechselwirkungen von stimulierten PMN mit anoxischen Myozyten zu untersuchen. Im in-vitro-Modell können die polymorphkernigen Neutrophilen durch fMLP (N-formyl Met-Leu-Phe), PMA (Phorbolmyristatazetat) oder Zymosan zur Produktion von freien Sauerstoffradikalen angeregt werden. Durch eine Luminol-vermittelte Lichtreaktion werden die gebildeten Sauerstoffradikale der polymorphkernigen Neutrophilen, insbesondere als Wasserstoffsuperoxid (H_2O_2), quantitativ erfaßbar. Dem Assay mit aktivierten PMN werden Myozyten zugesetzt (normoxische bzw. der Anoxie ausgesetzte Herzmuskelzellen) um die Interaktion anhand der Veränderung des „respiratory burst“ der Neutrophilen zu beurteilen. Die durch Auswertung der Ergebnisse gewonnenen Erkenntnisse über die Wechselwirkung von aktivierten PMN mit anoxischen bzw. normoxischen Myozyten werden mit lichtmikroskopischen Beobachtungen in der Co-Kultur (aktivierte PMN und Myozyten) untermauert.

Die Fragestellungen der Arbeit lauten:

Wie verändert sich der „oxidative burst“ aktivierter PMN in Anwesenheit von normoxischen und anoxischen Myozyten?

Was ist verantwortlich für die Modulation des „oxidative burst“ aktivierter PMN mit normoxischen und anoxischen Myozyten im Biolumineszenzassay ?

Beeinflussen aktivierte PMN das Überleben der normoxischen bzw. anoxischen Kardiomyozyten in der Zellkultur?

Können Sauerstoffradikale aktivierter neutrophiler Granulozyten für den sog. „Reperfusionsschaden“ verantwortlich sein ?

3. Methoden

3.1. Isolierung adulter Rattenkardiomyozyten mit einer modifizierten Langendorff - Perfusionsapparatur

Bei der Isolierung der Rattenkardiomyozyten wird auf etablierte Methoden, beschrieben von *H. M. Piper* als sog. „Rapid-Attachment-Modell“ zurückgegriffen, und diese gegebenenfalls modifiziert (*Piper 1990*).

3.1.1. Vorbereitung der Langendorff - Perfusionsapparatur

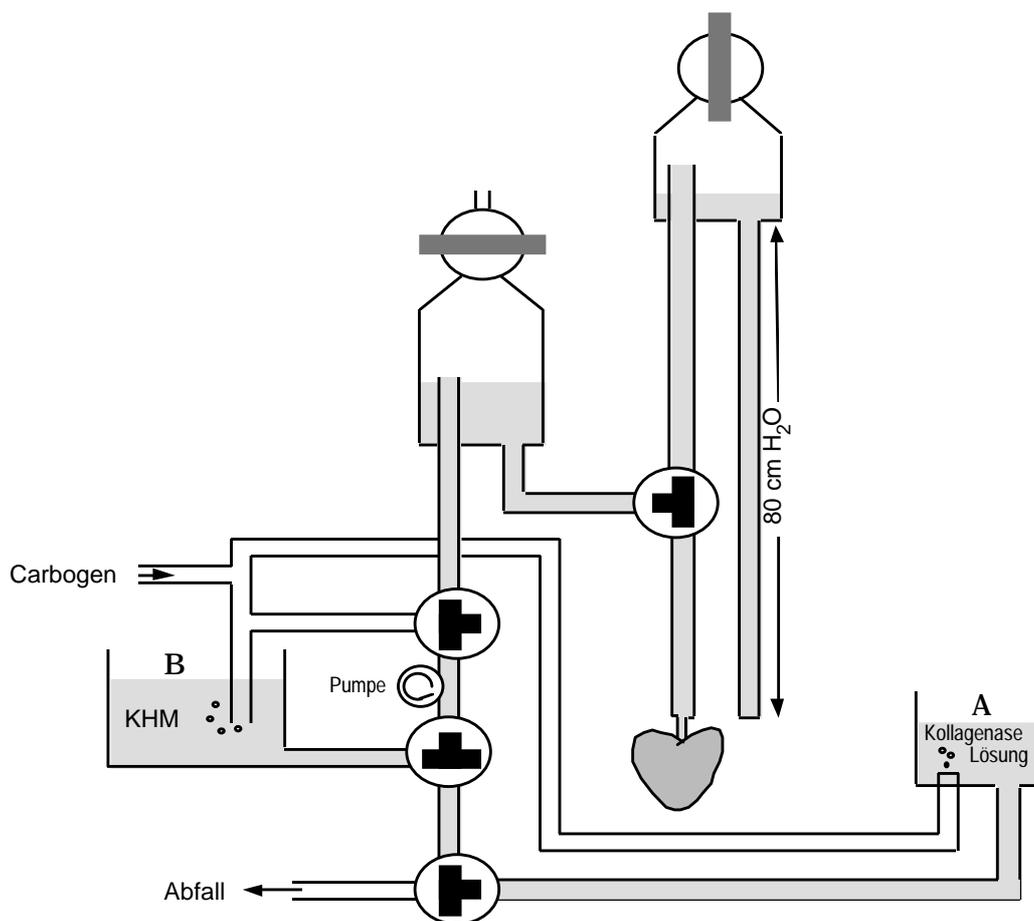


Abb. 1: Langendorff-Perfusionsapparatur

Das Langendorff-System wird von dem großen Behälter B an bis zur Perfusionsnadel, an der nach der Präparation das Rattenherz befestigt wird, blasenfrei mit KHM (Krebs-Henseleit-Medium) gefüllt. Die Kollagenaselösung filtert man mit einem sterilen Filter ($0.22 \mu\text{m}$) in das kleinere Gefäß A. Beide Lösungen werden mit steril gefiltertem Carbogen begast und durch den Durchlauferwärmer auf 37 Grad Celsius temperiert.

3.1.2. Präparation und Perfusion des Herzens

Einer 150 g schweren Ratte wird intraperitoneal 60 mg/kg Körpergewicht Pentobarbital in 0.9 % NaCl und 5 000 IE/ml Heparin verabreicht. Das Fell wird oberflächlich mit 70% Ethanol gereinigt, danach die Haut vom Processus Xyphoideus bis zum Hals mit einer Schere eingeschnitten, abpräpariert und daraufhin durch mediale Sternotomie der Thorax eröffnet. Das entnommene Herz wird an der freipräparierten Aorta an der Kanüle am Langendorffsystem angebracht. Um eine vollständige Perfusion beider Koronararterien zu gewährleisten darf die Kanüle die Koronarostien nicht verlegen, etwa durch zu tiefe Kanülierung. Das Herz wird zunächst 5 Minuten mit KHM durchströmt, der Fluß so reguliert, daß ein konstanter Perfusionsdruck von 80 cm H₂O (= 58.8 mmHg) entsteht, so daß beide Koronarien durch die Perfusion blutleer werden. Danach perfundiert man das Herz durch Veränderung der Schalterposition mit der Kollagenaselösung für 20 bis 25 Minuten, dabei wird die Position vom Behälter A so verändert, daß ein rezirkulierender Kreislauf entsteht. Während der Kollagenasezirkulation verändert sich das Gewebe, und die Interzellularverbindungen beginnen sich zu lockern, was sich am Abfall des Perfusionsdruckes bemerkbar macht. Um den Perfusionsdruck konstant bei 80 cm H₂O zu halten, wird die Fließgeschwindigkeit entsprechend erhöht. Nach 20 bis 25minütiger Perfusionszeit wird das Herz von der Apparatur genommen, die Vorhöfe und großen Gefäße entfernt und das Herz in 10 ml Kollagenaselösung mit einer sterilen Schere in kleine Stücke geschnitten. Diese Suspension wird im Behälter B für 5-7 Minuten mit Carbogen begast und durchmischt, um eine vollständige Gewebedissoziation zu erreichen. Anschließendes Filtern der Zellsuspension durch ein Nylonnetz mit 200 µm Maschenweite hält größere Gewebestücke zurück.

3.1.3. Isolierung und Kultivierung der Herzmuskelzellen

Der gewonnenen Zellsuspension werden 10 ml KHM zugesetzt und bei 480 Umdrehungen pro Minute (rpm) für 4 Minuten zentrifugiert. Im Überstand erhält man Fibroblasten und Endothelzellen, das Sediment enthält die Kardiomyozyten. Zur Trennung von intakten Myozyten („rod shaped“) von den durch die Isolation beschädigten und abgerundeten Zellen und Zelltrümmern resuspendiert man das Sediment in einem Volumen Percoll 18, das 50% des Sedimentvolumens betragen sollte. Das Percoll-18 - Zellsuspensionsgemisch wird auf 10 ml Percoll M geschichtet und bei 480 rpm 15 Minuten lang zentrifugiert. In diesem Zentrifugierungsschritt trennen sich „rod shaped“-Myozyten im Sediment von den beschädigten Myozyten, die als Bande weiter oben im Percolldichtegradienten sichtbar werden. Für jeweils 5 Minuten wäscht man die isolierten Myozyten mit HES (Hepes Earlsalz-Lösung) und anschließend mit Medium 199 (ohne inaktiviertes fötales Kälberserum, bzw. FKS) durch Zentrifugation bei 480 rpm. Die Myozyten werden kultiviert, indem man sie zunächst in Medium 199 mit 4% FKS in einer Neubauer-Zählkammer zählt und sie dann auf die mit Laminin beschichteten Kulturschalen aussät. Die Zelldichte einer

78 cm² großen Kulturschale beträgt 0.5×10^6 Zellen in 10 ml Medium. Unter dem Einfluß von FKS erfolgt eine rasche Anheftung der intakten Zellen an das Substrat Laminin, so daß nahezu alle geschädigten oder abgestorbenen Myozyten durch Wechseln des Mediums abgetrennt werden können. Nach 2h haben sich die Myozyten angeheftet, und man ersetzt das Medium durch serumfreies Medium 199.

3.1.4 Anoxie der Myozyten unter in-vitro-Bedingungen

Die Myozyten werden für definierte Zeiten der Anoxie ausgesetzt. Eine vollständige Anoxie erreicht man im in-vitro-Modell durch Verwendung des Gas-Pack-Plus-Systems (Becton-Dickinson). In dem luftdicht abgeschlossenen System wird mittels spezifischer Gas-Pack-Plus TM Katalysatorumschläge, die ins Gefäß eingesetzt und durch Zugabe von 10 ml Wasser aktiviert werden, Sauerstoff entfernt und 5% CO₂ entwickelt. Diese Umschläge enthalten einen CO₂ und einen H₂-Entwickler sowie einen Palladium-Katalysator, welcher die ablaufende Reaktion zur Entfernung des Sauerstoffs steuert. Ist das System luftdicht verschlossen, schlägt die Farbe des ins Gefäß eingelegten Methylenblau-Indikatorstreifens bei Anoxie nach Weiß um. Während der Anoxie wird ebenfalls das Medium 199 als Kulturmedium verwendet. Eine gleichzeitig unter normoxischen Bedingungen im Brutschrank aufbewahrte Myozytenkultur dient als Kontrolle.

3.1.5. Separieren von Membranbestandteilen (*Kidwai et al. 1971*)

Herzmuskelzellen werden mechanisch homogenisiert und in 0.25 M Sucrose resuspendiert. Ein Stufengradient von 1.040 bis 1.269 Dichte entsteht dadurch, daß Sucrose in den Konzentrationen 0.25 bis 2.00 M verwendet wird. Auf den Stufengradienten aus Sucrose bringt man dann das Suspensat auf. Durch Zentrifugieren bei 112 g für 90 Minuten bleibt die Fraktion der Plasmamembranen auf dem Gradienten liegen. Anschließendes Waschen der Plasmamembranfraktion durch Zentrifugation in 10 ml Hanks-Puffer wäscht den Zuckergradienten aus.

3.2. Isolation polymorphkerniger Neutrophiler

3.2.1. Isolierung der Neutrophilen aus Rattenblut

Die Anästhesie wird bei der Ratte (250 g) durch intraperitoneale Injektion von 60 mg/ml/kg Körpergewicht Pentobarbital in 0.9 N NaCl , versetzt mit Heparin (5 000 IE/ml), erreicht. Nach Desinfektion eröffnet man durch mediale Sternotomie den Brustraum, inzidiert das Perikard und punktiert bei schlagendem Herzen den linken Ventrikel in der Apexgegend, um langsam das Blut zu aspirieren. In die verwendete Spritze (steril, 20 ml) werden vorher 3 ml Heparin (5 000 IE/ml in

1.5 M NaCl) aufgezogen, und auch die Punktionsnadel mit einem großlumigen Durchmesser von ca. 1.4 mm wird damit benetzt. Es wird nur aus den Herzhöhlen aspiriertes Blut benutzt, und damit vermieden, das Blut, welches sich im Cavum thoracis angesammelt hat zu aspirieren, da die dort enthaltenen Neutrophilen eventuell bereits durch Luftkontakt o.ä. aktiviert sein könnten. Durch direkte Herzpunktion einer mindestens 250 g schweren Ratte enthält man ca. 15 - 20 ml Blut, dieses zentrifugiert man 15 Minuten bei 1 400 rpm, um das Plasma von den zelligen Bestandteilen zu trennen. Die Blutzellen resuspendiert man in dem 2fachen Volumen 2%iger Gelatine enthaltendem Hanks-Puffer. Zur Verhinderung einer Koagulation setzt man etwa 0.5 ml Heparin hinzu. Während einer Stunde Sedimentation bei 37 Grad Celsius setzen sich die Erythrozyten ab, während die Leukozyten im Überstand verbleiben. Den Überstand zentrifugiert man 10 Minuten bei 1 600 rpm und erhält die Leukozytenfraktion im Sediment. Der Leukozytenfraktion gibt man 2 ml Hanks-Puffer hinzu und legt diese Suspension auf den vorbereiteten Percoll Dichtegradienten. Die fünf unterschiedlichen Percoll-Lösungen (je 2 ml) werden so in einem Zentrifugenröhrchen (15 ml) übereinandergeschichtet, daß von oben nach unten die Dichte zunimmt (diskontinuierlicher Percoll-Dichtegradient). Durch 20minütige Zentrifugation bei 3 000 rpm enthält man von oben nach unten folgende vier Banden:

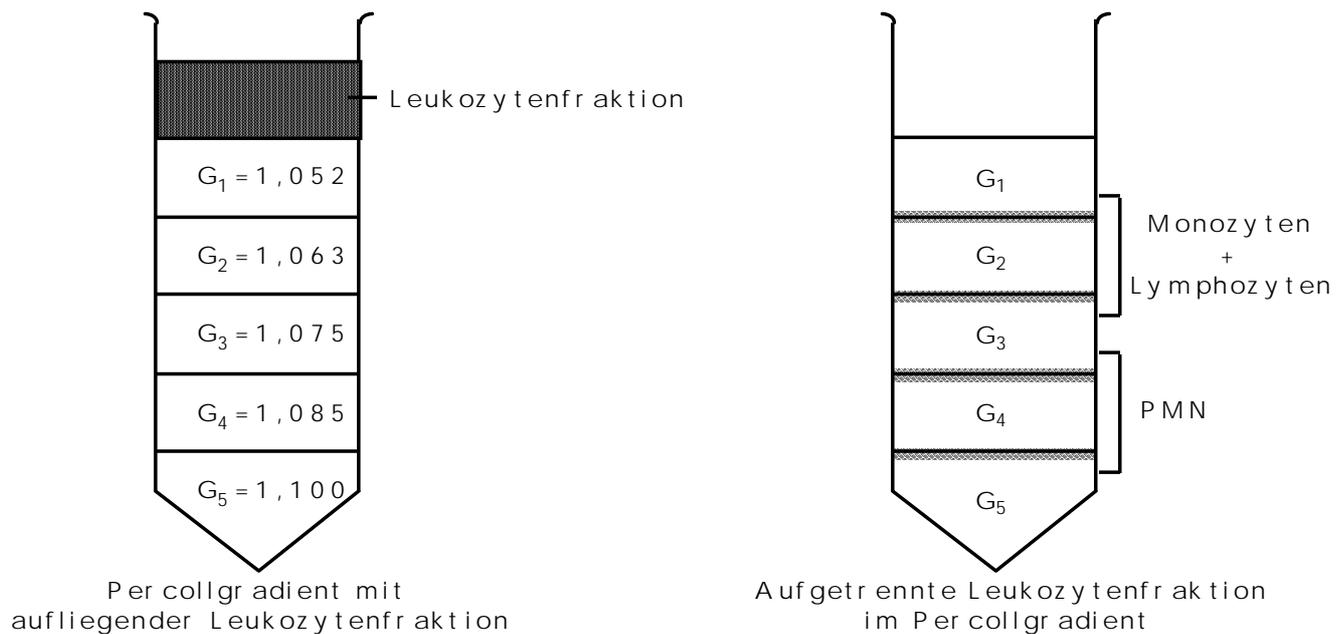


Abb. 2: Separierung der Leukozyten im Percoll-Dichtegradienten

Banden I und II enthalten hauptsächlich Lymphozyten und Monozyten, in den unteren zwei Banden (III und IV) befindet sich die 90% reine PMN-Fraktion. Ein weiterer Zentrifugierungsschritt wäscht die Percoll-Reste aus: Die betreffenden Banden werden in 10 ml Hanks-Puffer 5 Minuten lang bei 1 500 rpm zentrifugiert.

Die Anzahl der isolierten PMN ermittelt man durch Zählen in der Neubauer-Zählkammer und verdünnt das Zellsediment mit Hanks-Puffer, so daß man eine Konzentration von 500 000 PMN pro 100 µl erhält.

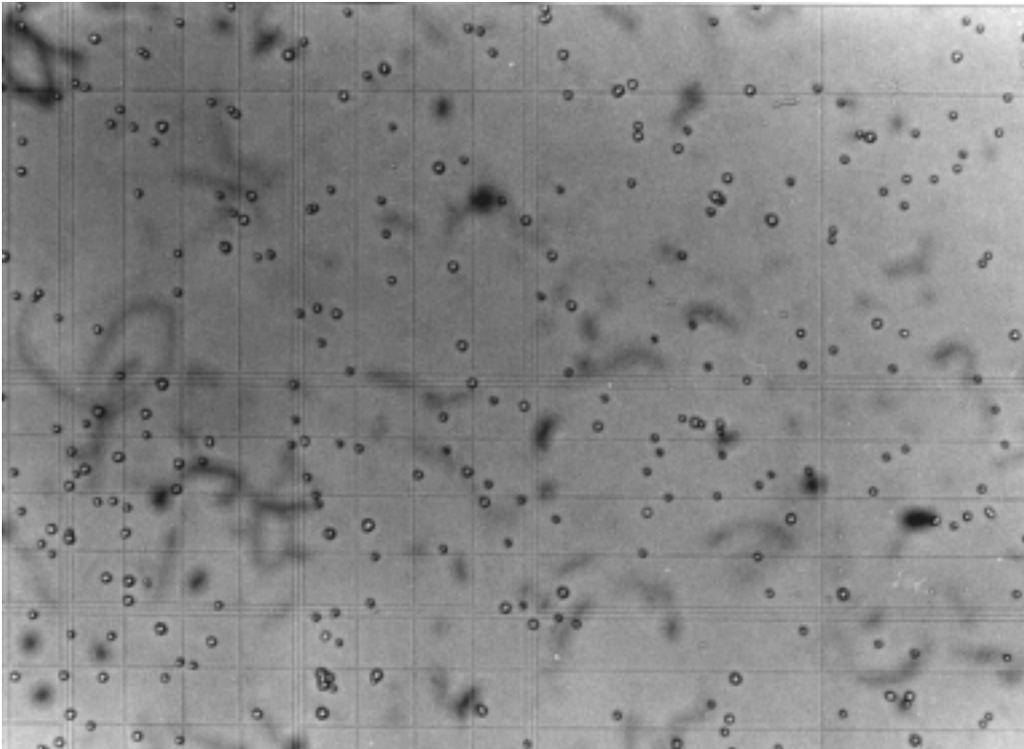


Abb. 3: PMN in der Neubauer-Zählkammer, Nativpräparat, 150fache Vergrößerung

3.2.2. Charakterisierung und Färbung der Leukozyten- bzw. Neutrophilenfraktion

Das konzentrierte Zellsuspensat wird auf einen mit Gelatine beschichteten Objektträger aufgetropft und leicht an zentrifugiert, so daß die Flüssigkeit der Zentrifugalkraft folgt und entweicht, und die Zellen in Gelatine eingebettet werden. Die Herstellung von mit Gelatine beschichteten Objektträgern gelingt durch Eintauchen der entfetteten Objektträger (in 5 ml konzentrierte H_2SO_4 -Lösung auf 100 ml Aqua dest.). Die Gelatinelösung wird mit 5 g Gelatine und 0.5 g Kaliumchrom III - Sulfat in 1 000 ml 45 Grad Celsius warmem Aqua dest. bereitet. Nach Lufttrocknung der Objektträger bewahrt man sie in einem Exsikkator auf. Nach der Einbettung der Zellen auf den mit Gelatine beschichteten Objektträger erfolgt die Färbung anschließend nach May-Grünwald-Giemsa.

3.3. Meßanordnung des in-vitro-Modells zur Detektion freier Radikale

Die Sauerstoffradikale, die während des „oxidative burst“ der PMN erzeugt werden, können mit Hilfe einer Lichtreaktion sichtbar gemacht werden. Die Lichtquanten werden durch einen Photomultiplier verstärkt und im Auto-Lumat LB 953 erfaßt. Die Produktion von freien Radikalen wird so durch Biolumineszenzmessung gemessen und pro Zeiteinheit aufgetragen (kinetische Messung). Das bei der Produktion von Sauerstoffradikalen erzeugte Licht ist häufig zu gering, um direkt meßbar zu sein, daher wird zusätzlich ein Lumineszenzverstärker (Luminol) der Probe zugegeben, der die Lichtausbeute um mehr als das 1 000fache verstärkt. Die am Photomultiplier gemessene Lichtemission (in cpm oder cps = gezählte Photonen pro Minute bzw. pro Sekunde) entspricht der aktuellen Produktion der Sauerstoffradikale und wird in ihrer Kinetik über einen definierten Zeitraum gemessen. Luminol macht durch folgende Hilfsreaktion die H_2O_2 -Radikale als Lichtsignal detektierbar:

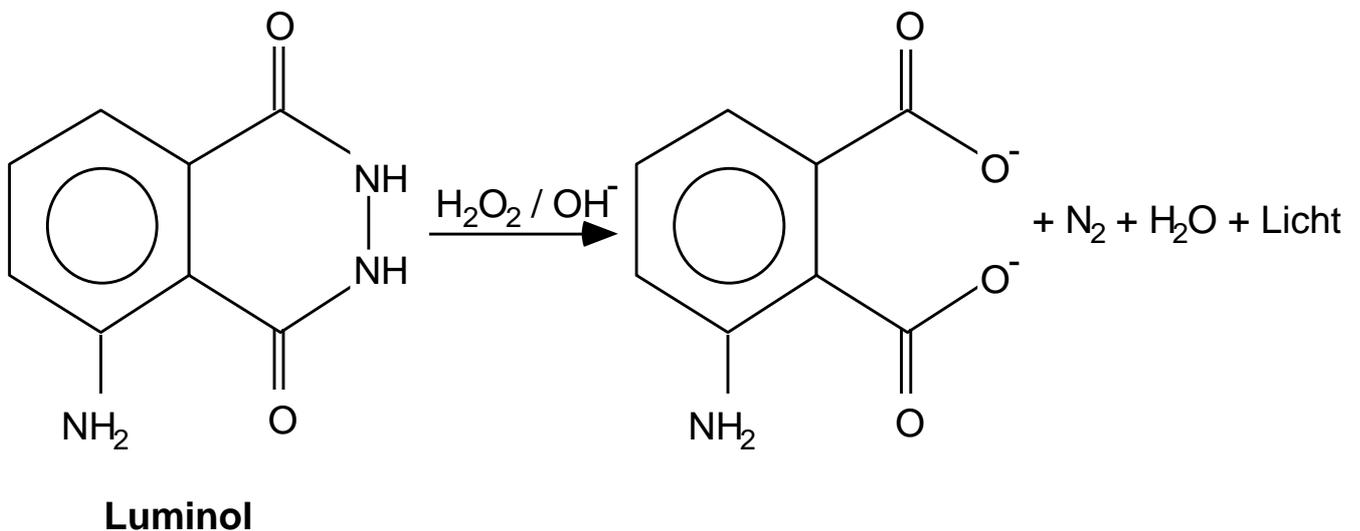


Abb. 4: Luminol- Reaktion (*Dudley 1990*)

Reaktion:



Luminol wird in Gegenwart eines Katalysators von Wasserstoffperoxid zu dem instabilen 5-Aminophthalat, das unter Lichtemission sofort weiterreagiert, oxidiert (*Hantke 1986, Woodhead 1984*). Das verwendete LB 953 AT-System erfährt seine Anwendung als Bio- und Chemilumineszenz- Meßvorrichtung, und besteht aus dem Luminometer (Auto Lumat LB 953), welches über einen PC mit Software gesteuert wird. Das Softwareprogramm enthält u.a. eine Aufteilung der Protokolle in „Cellular Luminescence“ und „Kinetics“. „Cellular Luminescence“ wird zur Langzeitkinetikmessung eingesetzt, während der Protokolltyp „Kinetics“ eine genaue kinetische Analyse eines kürzeren Zeitintervalls erlaubt. Die Meßzeit hängt von der Dauer der biochemischen Reaktion ab, d.h. von der Länge des „oxidative burst“. Das Zeitintervall der Messung wird so gewählt, daß die Messung dann endet, wenn das detektierte Signal der gebildeten Sauerstoffradikale wieder etwa dem Ausgangswert entspricht. Die Meßzeit beträgt bei der Aktivierung der PMN durch N-formyl-Met-Leu-Phe (fMLP) 180 Sekunden, bei Verwendung von Phorbol-12-Myristat-13-Azetat (PMA) und bei Zymosan als Stimulus 120 Minuten, so daß der „Peak“ der Radikalbildung während des „oxidative burst“ der PMN deutlich innerhalb des gewählten Zeitintervalls liegt. Die erhaltenen Meßergebnisse werden graphisch sichtbar gemacht und können anschließend bearbeitet werden. Der Rechner gibt die Integrale der Biolumineszenzsignalkurven an. Die Integrale eignen sich zum direkten Vergleich und zur Erstellung einer Statistik.

3.3.1. Meßprogramm „Kinetics“

Das Programm „Kinetics“ erlaubt, Messungen unter der Zielsetzung einer genauen Verlaufsanalyse der Lichtemission durchzuführen. In diesem Fall werden die Proben nacheinander vollständig ausgemessen und eine Kinetikkurve mit hundert Datenpunkten erstellt. Der Grad der Auflösung hängt damit von der eingegebenen Meßdauer ab (eine kürzere Meßdauer ergibt eine höhere Auflösung pro Zeitabschnitt). Durch zwei Injektoren kann das in Meßposition befindliche Meßröhrchen mit je 100 µl einer Lösung beschickt werden. Die Messung beginnt direkt nach der Injektion. Dieser Protokolltyp findet seine Anwendung in der Detektion des „respiratory burst“ der neutrophilen Granulozyten, stimuliert durch fMLP. Die Meßdauer beträgt hierbei 180 Sekunden, das Meßintervall 0.5 Sekunden, Injektor 1 fördert z.B. PMN (oder den Stimulus) und Injektor 2 Luminol. Ebenfalls im Meßröhrchen vorgelegt sind Na-Azid, welches die zelluläre Myeloperoxidase hemmt, und 10U Meerrettichperoxidase (formt Purpurogallin aus Pyrogallol). Beide Substanzen sichern die schnelle Detektion der gebildeten H₂O₂-Population von fMLP-stimulierten PMN (*Wymann et al. 1987*). Die Luminol vermittelte Chemilumineszenz ist stark abhängig von der Anwesenheit der zellulären Myeloperoxidase, da diese jedoch durch Natrium-Azid gehemmt wird muß eine Peroxidase in das Meßsystem eingebracht werden. Dies geschieht in Form der Meerrettichperoxidase, welche dann selektiv im Extrazellulärraum eine Luminol vermittelte Chemilumineszenz (LCL) möglich macht. Die von *Wymann* standardisierte Meßanordnung mit Natrium-Azid und HPO weist somit selektiv die extrazellulär gebildeten Sauerstoffradikale und hierbei hauptsächlich H₂O₂ als

Sauerstoffradikalenspezies nach (Wymann *et al.* 1987). Die Einheit der gemessenen Lichtemission wird im Meßprotokoll „Kinetics“ als cps (counts per second) angegeben.

In einem Meßröhrchen zur Biolumineszenzmessung mit dem Protokolltyp „Kinetics“ ist beispielsweise folgendes enthalten:

Substanz	Volumen und Endkonzentration in 1 ml Puffer
Hanks-Puffer	400 µl (bis auf 1ml Probenvolumen auffüllen)
fMLP	100 µl (1 µM), d.h. 0.1µM Endkonzentration
HPO	10 U in 100 µl PBS
Natiumazid	100 µl 1mM Nariumazid, d.h. 0.1 mM Endkonzentration
Myozyten	100 µl mit 50 000 Myozyten
PMN (Injektor 1)	100 µl mit 500 000 PMN
Luminol (Injektor 2)	100 µl 0.1 mM, d.h. 0.01 mM Endkonzentration

3.3.2. Meßprogramm „Cellular Luminescence“

Das Programm „Cellular Luminescence“ eignet sich zur Messung der Radiakalenproduktion von durch PMA bzw. Zymosan stimulierten PMN. Die Meßzeit ist entsprechend länger gewählt, es steht hierbei nur ein Injektor zur Verfügung, dieser injiziert PMN (oder den Stimulus), Luminol muß vorher in die Meßröhrchen pipetiert werden. Die Proben werden jetzt nicht nacheinander, sondern quasi-parallel gemessen, das bedeutet: Jede Probe wird pro Kettenzyklus einmal kurz gemessen (mit Kettenzyklus ist gemeint, daß die Kette eine Runde vollzieht, und somit sich alle Probenröhrchen für eine bestimmte Zeit in Meßposition vor dem Photomultiplier befinden). Jede weitere Runde liefert für jede Probe einen weiteren Meßpunkt. Die Kurve für jede Probe setzt sich somit aus den Meßpunkten der Kettenzyklen zusammen. Die Anzahl der Kettenzyklen ergibt sich aus den Protokollparametern. Durch diese quasi-parallele Messung ist in kurzer Zeit ein hoher Probendurchsatz möglich. Er ist abhängig von der Meßdauer der Einzelproben und der eingegebenen Gesamtmeßzeit. Ein sinnvolles Maximum der Meßzeit ergibt sich aus der Dauer der biochemischen Reaktion, bzw. hierbei aus der Aktivierung der NADPH-Oxidase der stimulierten PMN. Die gewählte Meßdauer beträgt bei der Biolumineszenzmessung von PMA und Zymosan aktivierten PMN 120 Minuten.

Eine Probe zur Messung mit dem Protokolltyp „Cellular Luminescence“ enthält beispielsweise folgendes:

Substanz	Volumen und Endkonzentration in 1 ml Puffer
Hanks-Puffer	600 μ l (auf 1 ml auffüllen)
PMA	100 μ l 0.2 μ M, d.h. 200 nM Endkonzentration
(oder Zymosan)	(100 μ l der Zymosanlösung (Konzentration: 0,5 mg/ml), d.h. 0.05 mg/ml Endkonzentration
Myozyten	100 μ l mit 50 000 Myozyten
Luminol	100 μ l 0.1 mM, d.h. 0.01 mM Endkonzentration
PMN (Injektor)	100 μ l mit 500 000 PMN

3.4. Lichtmikroskopie

Die Zellkultur der Myozyten wird mittels Lichtmikroskopie betrachtet. Die lichtmikroskopischen Abbildungen sind mit einer Vergrößerung von 50- bis 300fach aufgenommen. Es sind bis auf die Abbildung 5, auf welcher May-Grünwald-Giemsagefärbte Leukozyten zu sehen sind, Nativpräparate ohne Färbung. Mit einer Vergrößerung von 100- bis 150fach sind die Myozyten und PMN in der Co-Kultur gut erkennbar. Einige Abbildungen (Abb.19, 20, 23 und 24) entstehen durch Ausschnittsvergrößerungen im Photolabor, die Vergrößerung beträgt hierbei 250fach.

3.5. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wird mittels des Statistikprogramms „Solo“ für Windows vorgenommen. Die Summe der Einzelsignale während einer Messung (das Integral unter der Kinetikkurve) ergibt den Ausgangswert, angegeben in cps (counts per second). Dieser Wert wird in Beziehung gesetzt zur Kontrollmessung und in Prozent angegeben, dabei wird die Referenzprobe gleich 100% gesetzt. Die Referenzprobe ist in den durchgeführten Versuchen jeweils: Aktivierte PMN durch einen der verwendeten Stimuli fMLP, PMA oder Zymosan. „n“ bedeutet die Anzahl der durchgeführten Einzelmessungen, „Mean“ der Durchschnittswert der Messungen angegeben in Prozent zur Referenzmessung (aktivierte PMN). Die Ergebnisse werden mittels T-test analysiert und die Standardabweichung als „Standard Error“ und „Stand. Error of Mean“ angegeben. Um die Signifikanz der Ergebnisse zu prüfen werden noch Equal-Variance-Test und der Aspin Welch-Test als weiterführende Tests durchgeführt, hierbei ist $p < 0,05$ als signifikant, $p < 0,001$ als hochsignifikant anzusehen.

4. Ergebnisse

4.1. Lichtmikroskopische Charakterisierung isolierter Leukozyten und polymorphkerniger Neutrophiler

Wie in Abschnitt 2.2.1. beschrieben, werden PMN durch Dichtegradientenzentrifugation aus Rattenblut isoliert. Anschließend werden die Leukozyten nach der Fixierung auf einem mit Gelatine beschichteten Objektträger nach May-Grünwald-Giemsa gefärbt. Diese Färbung erlaubt eine Zuordnung der einzelnen Zellen zu den Leukozytensubklassen.

So stellen sich die polymorphkernigen Neutrophilen mit ihrem typischen segmentierten Kern und farblosen Granula dar. Die neutrophilen Granulozyten betragen etwa 50-70% aller Leukozyten, sind also auch die überwiegende Anzahl der Granulozyten (nur etwa 2-5% entfallen auf die eosinophilen und die basophilen Granulozyten). Die Neutrophilen sind die wichtigsten Funktionsträger im unspezifischen Abwehrsystem des Blutes. Pro μl Blut finden sich etwa 4 500 neutrophile Granulozyten, sie haben einen Zelldurchmesser von 10-17 μm .

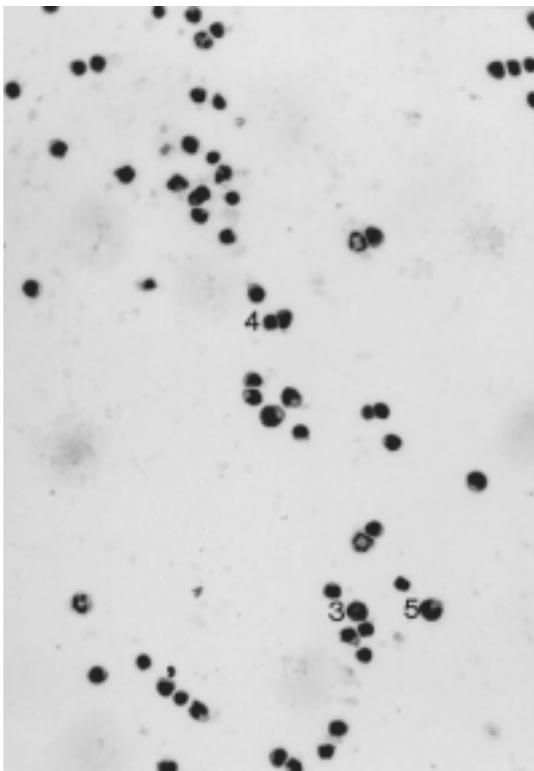
Die eosinophilen Granulozyten sind an ihren rötlichen Granula zu erkennen, und die dritte Gruppe der Granulozyten, die Basophilen, sind durch blaue Granula im Zytoplasma gekennzeichnet.

Lymphozyten dagegen sind insgesamt kleinere Zellen und weisen einen runden Kern auf, der im Vergleich zum Zytoplasma so groß ist, daß ihn nur noch ein schmaler Zytoplasmasaum umgibt.

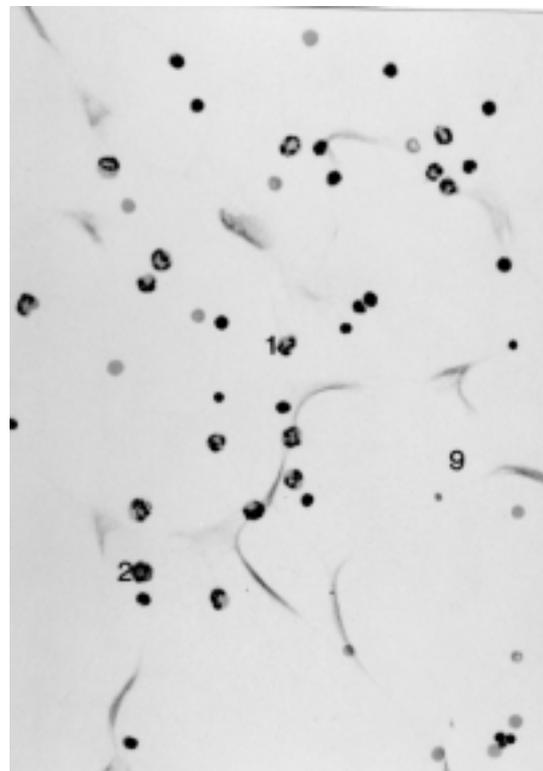
Die Makrophagen als zahlenmäßig kleine Population innerhalb der Leukozyten sind als große (12-20 μm im Zelldurchmesser) Freßzellen mit einem charakteristischen bohnenförmigen Kern zu erkennen.

Auf den lichtmikroskopischen Abbildungen der PMN- und Leukozytenfraktion sind typische Zellen mit Zahlen gekennzeichnet, die folgende Bedeutung haben:

- Granulozyten:
 - neutrophile Granulozyten (1)
 - eosinophile Granulozyten (2)
 - basophile Granulozyten (3)
- Lymphozyten (4)
- Makrophagen (5)



Leukozytenfraktion



Neutrophilenfraktion

Abb. 5: Leukozyten- und PMN-Fraktion nach May-Grünwald-Giemsa gefärbt, 300fache Vergrößerung

Durch die Methode der Percoll-Dichtegradientenzentrifugation kann aus der Leukozytenfraktion eine annähernd 90% reine PMN-Fraktion gewonnen werden.

4.2. Meßbedingungen und deren Einfluß auf das Ergebnis der Biolumineszenzmessung

Die Temperatur ist in der Meßvorrichtung auf 37 Grad Celsius eingestellt. Als wesentlich erweist sich die Wahl eines geeigneten Puffers zur Biolumineszenzmessung. Vergleichende Messungen zwischen Hanks-Puffer und Medium 199 nach Myozytenkultivierung verdeutlichen den Einfluß des verwendeten Puffers auf das Meßergebnis. Abbildung 6 zeigt den Unterschied des detektierten Signals anhand der Kinetik von fMLP aktivierten PMN (jeweils 0,5, 2,5 und 5 nM) in Medium 199 und in Hanks-Puffer. Auf der X-Achse der Graphik ist die Zeit (sec) aufgetragen, auf der Y-Achse die gemessenen Lichtsignale im Lumineszenzassay, es ergibt sich eine Kinetikkurve mit einem Maximum des Signals bei 30 Sekunden, welches einer Maximalen Aktivierung der NADPH-Oxidase entspricht. Verwendet man Medium 199 als Puffersubstanz im Assay ist der detektierte „burst“ der aktivierten PMN deutlich supprimiert.

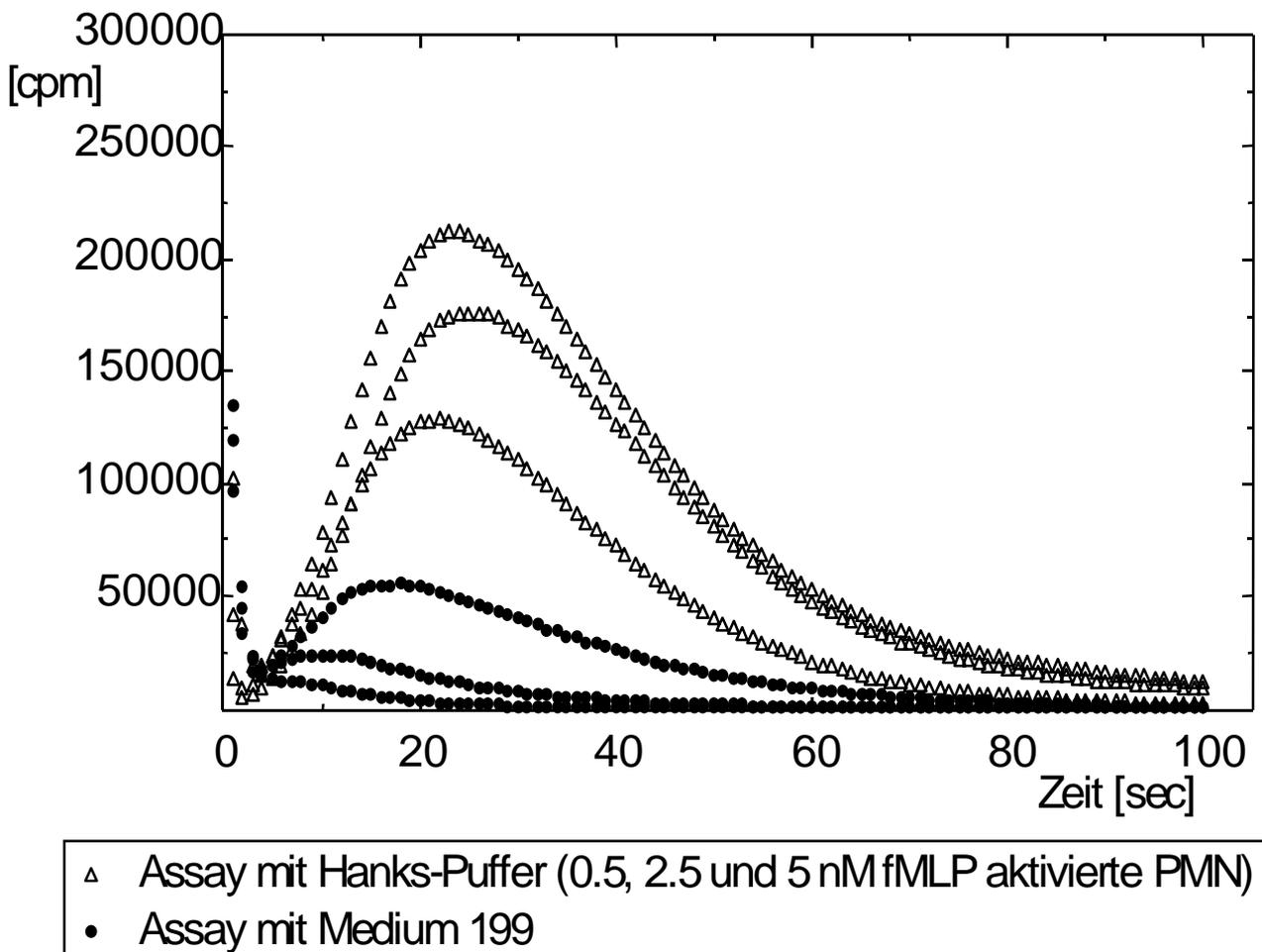


Abb. 6: Die Kinetik fMLP aktivierter PMN in Medium 199 und in Hanks-Puffer, jeweils mit verschiedenen Konzentrationen (0,5 bis 5nM) von fMLP im Assay

Die Abbildung 7 vergleicht den fMLP induzierten „burst“ im Medium 199, im Medium 199 mit Adenosin-Deaminase und in Hanks-Puffer anhand eines Histogrammes. Aus den Kinetischen Messungen ergibt sich durch Summation der Einzelsignale ein Gesamtwert, welcher der Fläche unter der Kinetikkurve, dem Integral entspricht. Diese Gesamtwerte der einzelnen Assays können nun in Beziehung gesetzt werden und graphisch als Histogramm dargestellt werden. Hierbei dient als Bezugswert (K=100%) das Signal von 500 000 durch fMLP (0.1 μ M) aktivierten PMN. Die verwendete Konzentration von Adenosin-Deaminase beträgt 0.25 U/ml Assay. Die dargestellte Graphik zeigt, daß die Verwendung von Hanks Puffer im Assay ein wesentlich höheres Signal ergibt, als die Verwendung von Medium 199.

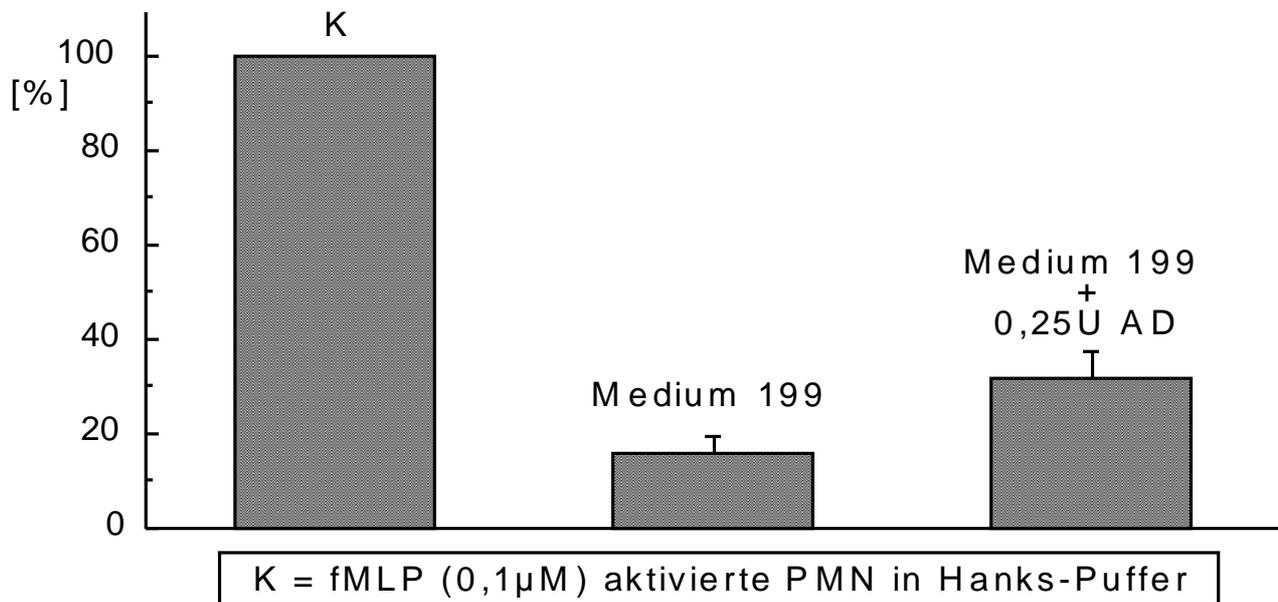


Abb. 7a: Vergleich des fMLP induzierten „burst“ in Medium 199, in Medium 199 mit Adenosin-Deaminase (AD) und in Hanks-Puffer

Nr.	Bezeichnung	Durchschnitt (m Mean)	Standard Fehler (Stand. Error)	Vergleich	Signifikanz (Equal-Variance)	Signifikanz (Aspin Welch)	n	Stand. Error of Mean
1	Hanks-Puffer	87,7	2,6	1-2 < > 0	p < 0,001	p < 0,001	11	0,78
2	M 199	15,2	3,7	2-3 < > 0	p = 0,025	p = 0,027	11	1,11
3	M 199 + 0,25U AD	31,6	5,6	1-3 < > 0	p < 0,001	p < 0,001	11	1,68

Abb. 7b: Statistische Auswertung der Ergebnisse, n=Anzahl der Durchgeführten Messungen, In der Spalte „Vergleich“ ist angegeben welche Ergebnisse miteinander verglichen werden um die statistischen Tests zur Bestimmung der Signifikanz (Equal-Variance und Aspin Welch) durchzuführen, die angegebenen Zahlen beziehen sich auf die Numerierung in der ersten Spalte

Die dargestellte Graphik zeigt, daß das Kulturmedium der Myozyten (Medium 199) nicht zur Biolumineszenzmessung geeignet ist. Bei Zusatz von Adenosin-Deaminase zum Assay verstärkt sich das Signal etwas, da die Adenosin-Deaminase den Adenosin Gehalt des Mediums vermindert. Besonders gut ist der „oxidative burst“ im Hanks-Puffer als Lösung im Biolumineszenzassay detektieren.

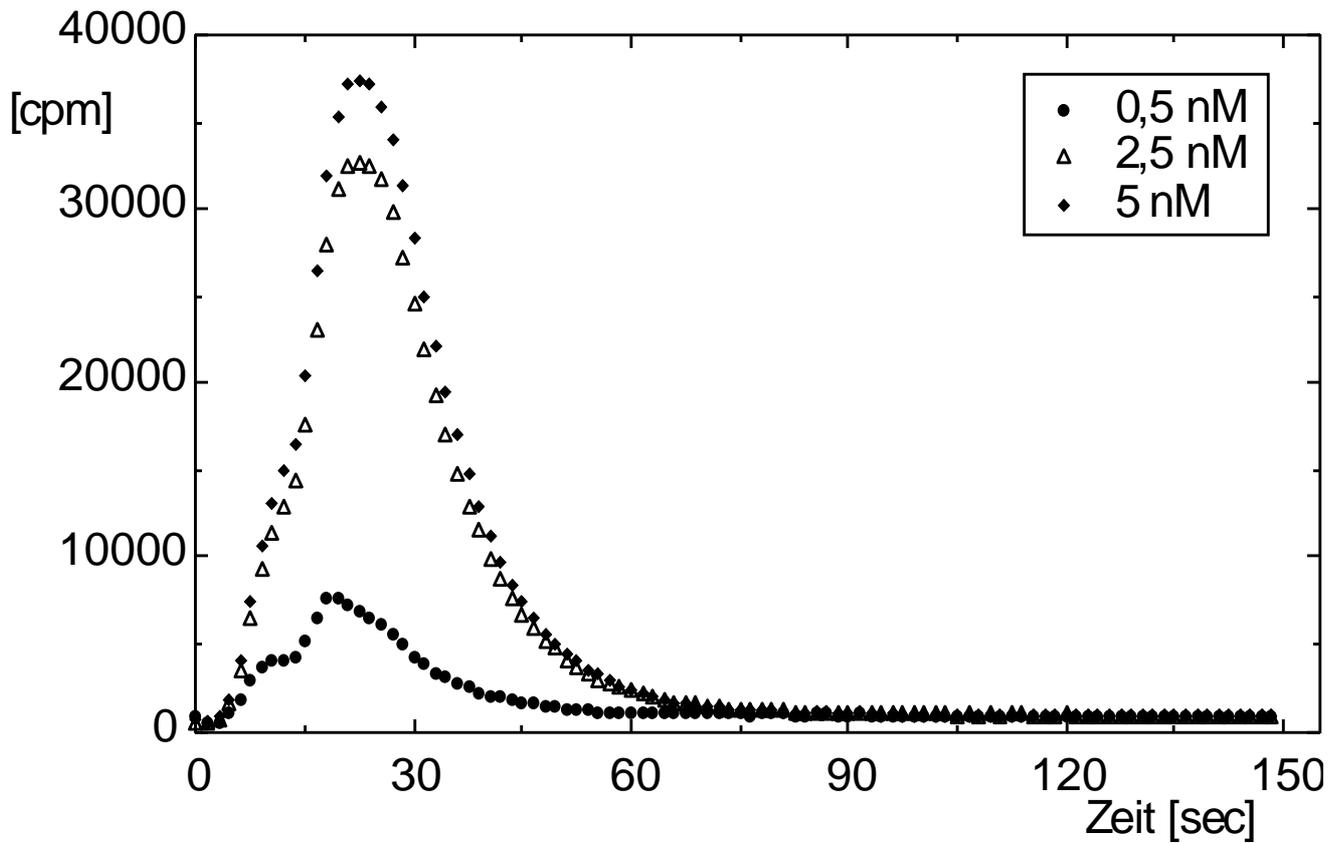
Das Kulturmedium der Myozyten ist u.a. wegen seines Adenosin Gehaltes für die Messung der freien Radikalproduktion nicht geeignet, da Adenosin via A_2 -Rezeptor (Cronstein et al. 1986 und 1992) auf der Zelloberfläche der PMN den „oxidative burst“ sehr bremsen oder verhindern kann (Liu et al. 1990). Adenosin ist primär nicht im Medium 199 enthalten, wohl aber Adeninsulfat, Adenin-5-triphosphat und Adenin-5-phosphat als Ausgangsprodukte, die Adenosin liefern können. Adenosin kann so während der Kultivierung von den Myozyten freigesetzt werden. Setzt man die Myozyten der Anoxie aus, ist die Konzentration von Adenosin im umgebenden Medium besonders hoch. Unter experimentellen Bedingungen kann man versuchen vor der Biolumineszenzmessung den Gehalt an Adenosin im Medium zu reduzieren, dies gelingt durch Zusatz von Adenosin-Deaminase (AD). Setzt man also Adenosin-Deaminase zum Messröhrchen hinzu ist das Signal erwartungsgemäß etwas höher als im Vergleichsröhrchen (Medium 199 ohne AD), jedoch ist das Signal wesentlich geringer, verglichen mit den Experimenten, die man mit Hanks-Puffer als Pufferlösung in den Meßröhrchen ausführt. Adenosin-Deaminase ist in der Lage, einen Großteil von Adenosin zu entfernen, indem es Adenosin in Inosin und NH_3 überführt. Hierbei ist eine Einheit Adenosin-Deaminase in der Lage, 1.0 mM Adenosin zu desaminieren (pro Minute und bei einem pH von 7.5 und einer Temperatur von 25 Grad Celsius). Aber auch ein relativ Adenosin-freies Medium 199 ist in der Lage, die freie Radikalbildung durch Vitamine und reduzierende Substanzen wie α -Tocopherol, Gluthation etc. abzupuffern. Das Medium 199 zur Kultivierung von Herzmuskelzellen enthält desweiteren Purin und Pyrimidinabkömmlinge, wie Adeninsulfat, Adenin-5-triphosphat, Adenin-5-phosphat, Guanin, Hypoxanthin, Uracil und Xanthin, welche in der Lage sein können, die Aktivierung der PMN zu bremsen. Die Reihenfolge der inhibierenden Wirkung wird von Elferink im Falle von Adenin-Verbindungen als von ATP, ADP, AMP zu Adenosin hin abnehmend beschrieben (Elferink et al. 1992). So wäre der ATP-Gehalt des Mediums für die Messung der Radikalproduktion von aktivierten PMN relevanter als endogen von Myozyten produziert Adenosin. Daraus folgt, daß Medium 199 ungeeignet zur Detektion der freien Radikale im Biolumineszenzassay ist, und es wird vor der Messung von den Myozyten getrennt und die Zellen während der Messung in Hanks-Puffer gehalten. Es wäre ebenfalls möglich für die kurze Zeit (12h) der Zellkultur die Kardiomyozyten in Hanks-Puffer zu halten, jedoch werden durch die Verwendung von Medium 199 optimale Bedingungen für die Myozytenkultur geschaffen.

4.3. Unterschiede in der Kinetik des „oxidative burst“ bei Verwendung verschiedener Substanzen zur Aktivierung der PMN (fMLP, PMA und Zymosan)

Die neutrophilen Granulozyten können durch verschiedene Substanzen zur Bildung von freien Radikalen angeregt werden. Durch die Methode der hochsensitiven Biolumineszenz wird das leicht durch Zellmembranen diffundierende H_2O_2 erfaßt, was direkt der Aktivität der NADPH-Oxidase entspricht. Die durch Luminol vermittelte Lichtemission ist proportional zu der Oxidase-Aktivität und somit auch zu der H_2O_2 -Produktion der PMN. Die Biolumineszenz eignet sich besonders für die Studie der Bildung freier Radikale durch Neutrophile, sie erfaßt H_2O_2 als Radikalenspezies selektiv und sensitiv, es kann nicht kumulieren und so das Signal etwa verzerren.

Es werden verschiedene Stimuli eingesetzt, um einen „respiratory burst“ der PMN zu erzeugen. fMLP ist ein aus drei Aminosäuren bestehendes Oligopeptid bakteriellen Ursprungs und dient als rascher Aktivator der Neutrophilen. PMA und Zymosan als weitere Stoffe, die im in-vitro-Experiment eingesetzt werden, sind in der Lage, die neutrophilen Granulozyten zu einem wesentlich längeren „oxidative burst“ anzuregen. Zymosan besteht aus komplexen Zellwand-Polysacchariden (nach der Kohlenhydratanalyse ist die Hauptkomponente Glukose) und Glykoproteinen aus Hefe. PMA, als Vertreter der Gruppe der Phorbolster, ist in der Lage direkt die Proteinkinase C zu stimulieren, was zur Aktivierung der PMN zum „respiratory burst“ führt.

In den folgenden Abbildungen (Abb.8, 9 und 10) werden die Charakteristika der drei eingesetzten Stimuli anhand von typischen kinetischen Meßergebnissen demonstriert. Die Kinetikkurven der Messungen: PMN und Stimulus (fMLP = N-formyl Met-Leu-Phe, PMA = Phorbol-12-Myristat-13-Azetat oder Zymosan) sind standardisiert und dienen in den weiterführenden Experimenten mit Zugabe von Myozyten zum Assay als Kontrolle. In Abbildung 8 ist die Produktion von freien Radikalen nach Stimulation von Neutrophilen mit verschiedenen Konzentrationen von fMLP dargestellt. Die Zahl der Lichtblitze, die der Zahl der produzierten freien Radikale proportional ist, ist in Abhängigkeit von der Zeit aufgetragen.



500000 PMN stimuliert mit fMLP in 1ml Assay
mit 10 U Peroxidase und 0,1 mM Na-Azid

Abb. 8: Kinetik des fMLP induzierten „oxidative burst“ von 500 000 PMN, in steigender Konzentration von fMLP von 0,5 bis 5nM

Im ansteigenden Schenkel der abgebildeten Kurve überwiegt die Produktion von freien Radikalen deutlich dem Abbau. Dieses Verhältnis kehrt sich dann nach Erreichen des Maximalwertes zugunsten des Abbaus der Sauerstoffradikalen um. Der daraus resultierende Graph hat bei Stimulation durch fMLP folgende Kinetik: Die Radikalproduktion der Neutrophilen steigt rapide an, um nach 20-30 Sekunden nach der Aktivierung das Maximum zu erreichen. Nach 60-80 Sekunden nach der Aktivierung nähert sich die Kurve sich wieder dem Ausgangswert an. In diesen Experimenten wird die Konzentration des stimulierenden fMLP im Assay, wie angegeben (0,5 bis 5 nM) variiert.

In den Experimenten der Abbildung 9 werden die Neutrophilen mit PMA stimuliert, während in Abbildung 10, das Ergebnis von Zymosan stimulierten Neutrophilen wiedergegeben ist.

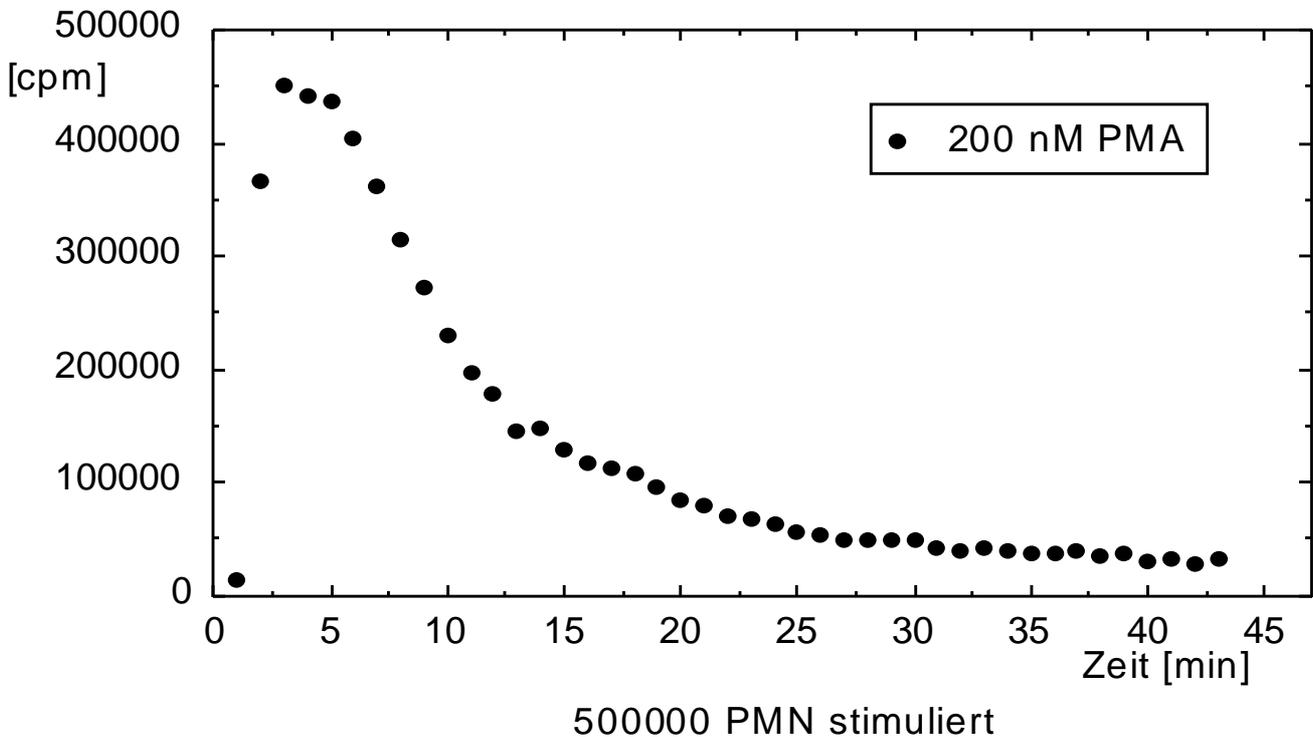


Abb. 9 : Kinetik des „oxidative burst“ bei Stimulation mit PMA

Das Maximum der Radikalbildung erscheint im Biolumineszenzassay mit durch PMA stimulierte PMN innerhalb der ersten 5 Minuten. Danach überwiegt der Abbau der Sauerstoffradikale, die aufgezeichnete Kurve fällt dann langsam wieder ab um sich etwa nach 40 Minuten dem Ausgangswert anzunähern.

Durch Zymosan wird die NADPH-Oxidase langanhaltend zur Produktion von H_2O_2 -Radikalen angeregt. Das Maximum der Radikalproduktion ist nach ca. 10 Minuten erreicht, daraufhin ist das Signal stetig abfallend innerhalb der folgenden 100 Minuten zu detektieren.

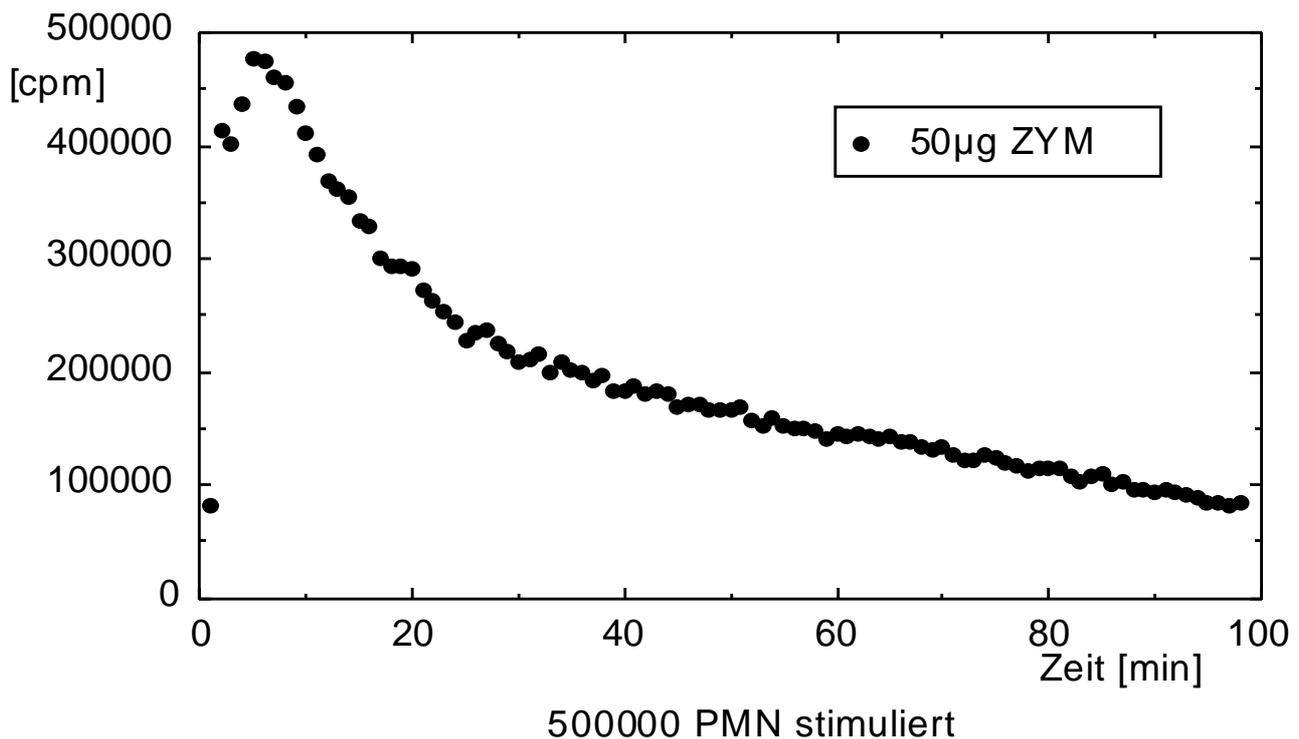


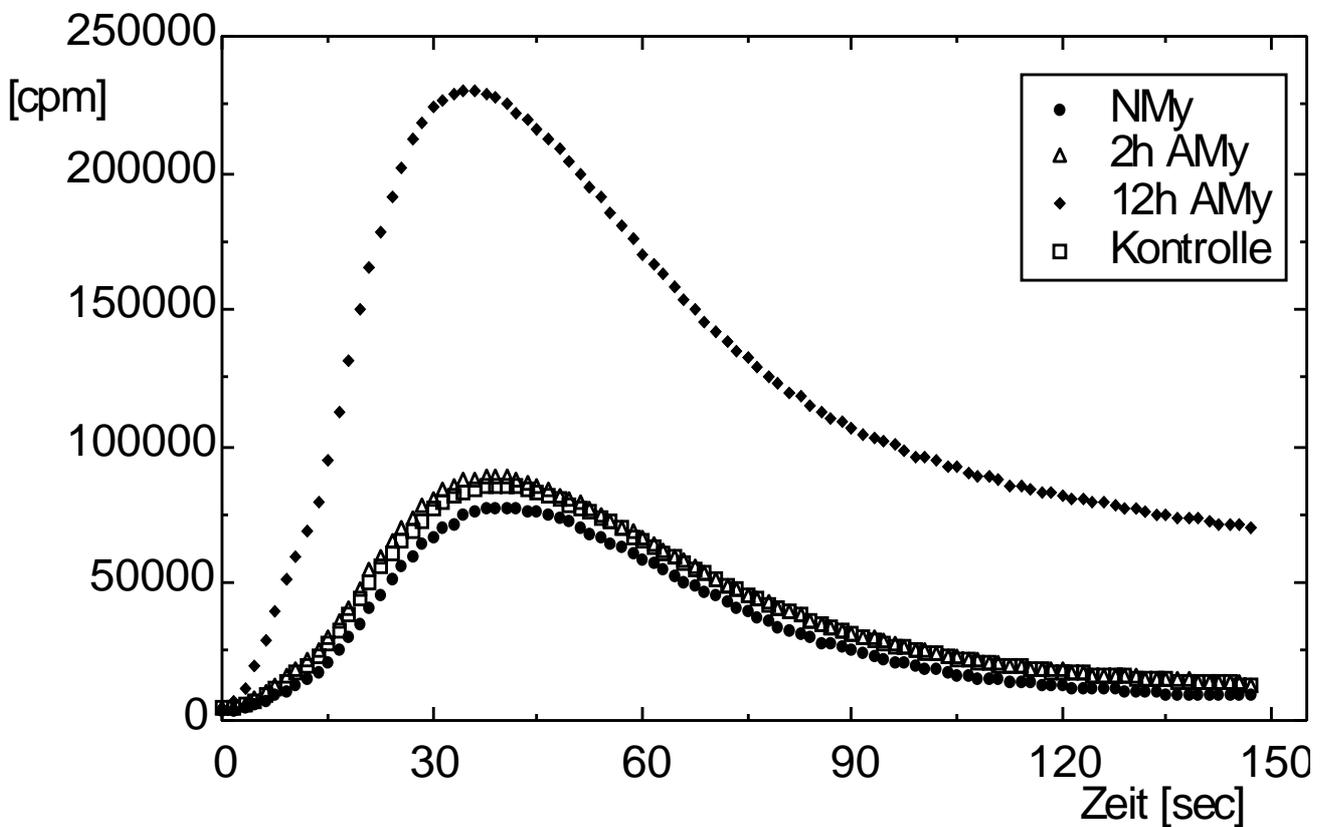
Abb. 10: Die Radikalproduktion von 500 000 PMN, aufgetragen über eine Meßzeit von 120 Minuten, bei Aktivierung durch Zymosan

4.4. Veränderung des „burst“ in Anwesenheit von Myozyten

In folgenden Experimenten wird untersucht wie sich die Produktion von freien Radikalen bei Anwesenheit von normoxischen oder anoxischen Myokardzellen ändert. Als Bezugswert dient, sofern nicht anders angegeben, das Signal von stimulierten polymorphkernigen Neutrophilen. Die Myozyten werden wie unter Methoden (Abschnitt 2.1.) beschrieben gewonnen und kultiviert. Zur Aktivierung der PMN werden wieder fMLP (0.1 μ M), PMA (200 nM) und Zymosan in einer Konzentration von 50 μ g/ml verwendet (=Kontrollwerte). Die in den Kulturschalen befindlichen adhärennten Myozyten werden mit einem sterilen Zellschaber abgetragen und mit dem auf den Schalen befindlichen Medium in ein Zentrifugenröhrchen überführt.

Durch Zentrifugation bei 480 rpm für 5 Minuten trennen sich die Myozyten als Sediment vom Überstand (Inkubat). Durch nochmaliges Waschen in Hanks-Puffer vermeidet man, daß sich noch Inkubatrete in der Myozytenfraktion befinden. Die Myozyten werden vor dem Biolumineszenzassay mit Hanks-Puffer resuspendiert, so daß sich in 1 ml Probe 50 000 Myozyten und 500 000 PMN befinden. Das Verhältnis zwischen PMN zu Myozyten beträgt damit 10:1.

In Abbildung 11 sind die Kinetiken der freien Radikalbildung bei Anwesenheit von normoxischen Myozyten und von anoxischen Myozyten gezeichnet. Die Neutrophilen werden hierbei mit fMLP stimuliert. Das Signal verringert sich in Anwesenheit von normoxischen Myozyten. Im Chemilumineszenzassay wird in Anwesenheit von Myozyten, welche zwei Stunden der Anoxie ausgesetzt waren, ein höheres Signal aktivierter PMN detektiert. In Anwesenheit von 12h anoxischen Myozyten kommt es zu einer massiven Steigerung der Radikalproduktion von aktivierten PMN. In den Kinetikgraphen macht sich die Anwesenheit von Myozyten in dem veränderten hohen „Peak“ bemerkbar, so daß sich auch das Integral und die Gesamt-Radikalproduktion dementsprechend verändert. Andere Parameter wie „Onset-Time“ (Beginn der Reaktion) und Dauer des „oxidative burst“ bleiben, wie die Kinetikgraphen zeigen, unverändert.



500000 PMN stimuliert mit fMLP, 50000 Myozyten

Abb. 11: Kinetik des „oxidative burst“ von fMLP aktivierten PMN mit normoxischen (NMy), 2h und 12h anoxischen Myozyten (AMy)

Wie die folgende Abbildung 12 des charakteristischen Kinetikgraphen zeigt, ist auch bei PMA-aktivierten Neutrophilen die Produktion freier Sauerstoffradikale durch 2h und 12h anoxische Myozyten im Assay erhöht, während normoxische Zellen das Signal reduzieren.

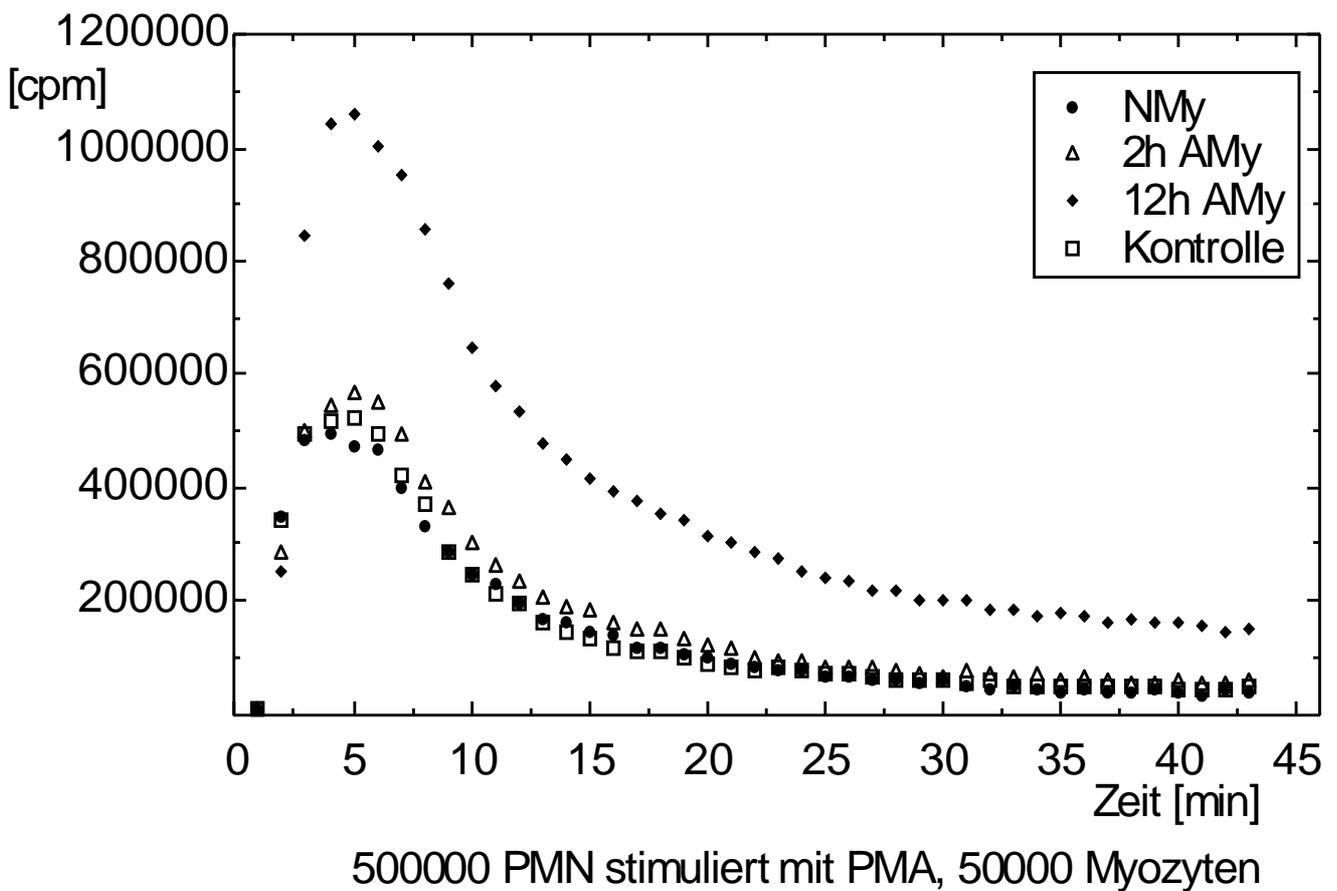
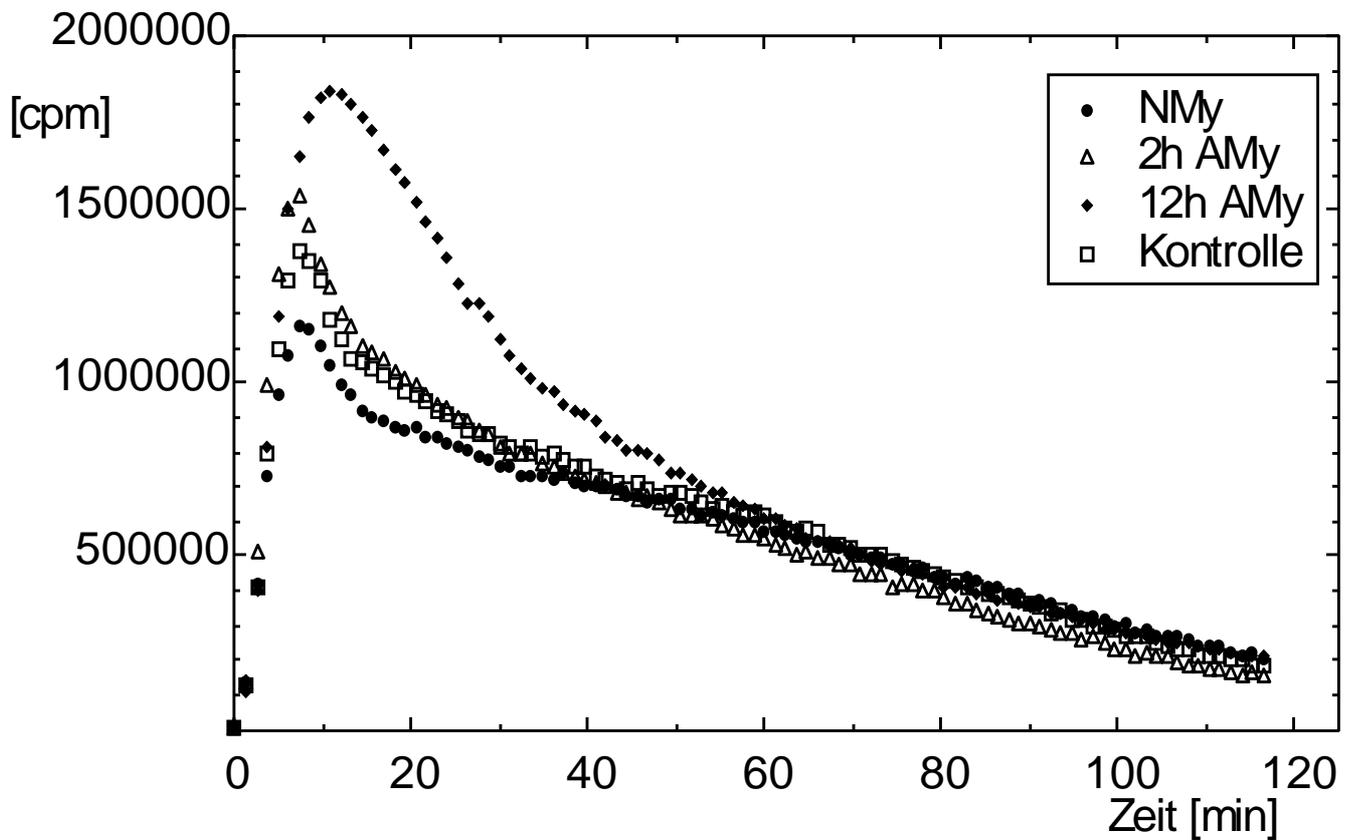


Abb. 12 : Die Kinetik des „oxidative burst“ von PMA aktivierten PMN mit normoxischen (NMy), 2h und 12h anoxischen Myozyten (AMy)

Die Produktion von freien Radikalen durch Zymosan aktivierte PMN kann durch 2h und 12h anoxische Myozyten gesteigert werden, während normoxische Myozyten wiederum den Peak der Radikalbildung verringern, wie aus Abbildung 13 zu erkennen ist.



500000 PMN stimuliert mit ZYM, 50000 Myozyten

Abb. 13: Kinetik des „oxidative burst“ von Zymosan aktivierten PMN mit normoxischen (NMy), 2h und 12h anoxischen Myozyten (AMy)

Die Abbildung 14 faßt die Untersuchungen der Co-Inkubation von normoxischen und anoxischen Myozyten mit stimulierten Neutrophilen quantitativ zusammen. Als Kontrollwert (100%) dient hierbei die Radikalproduktion von polymorphkernigen Neutrophilen, die mit der jeweiligen Substanz (fMLP, PMA oder Zymosan) stimuliert werden.

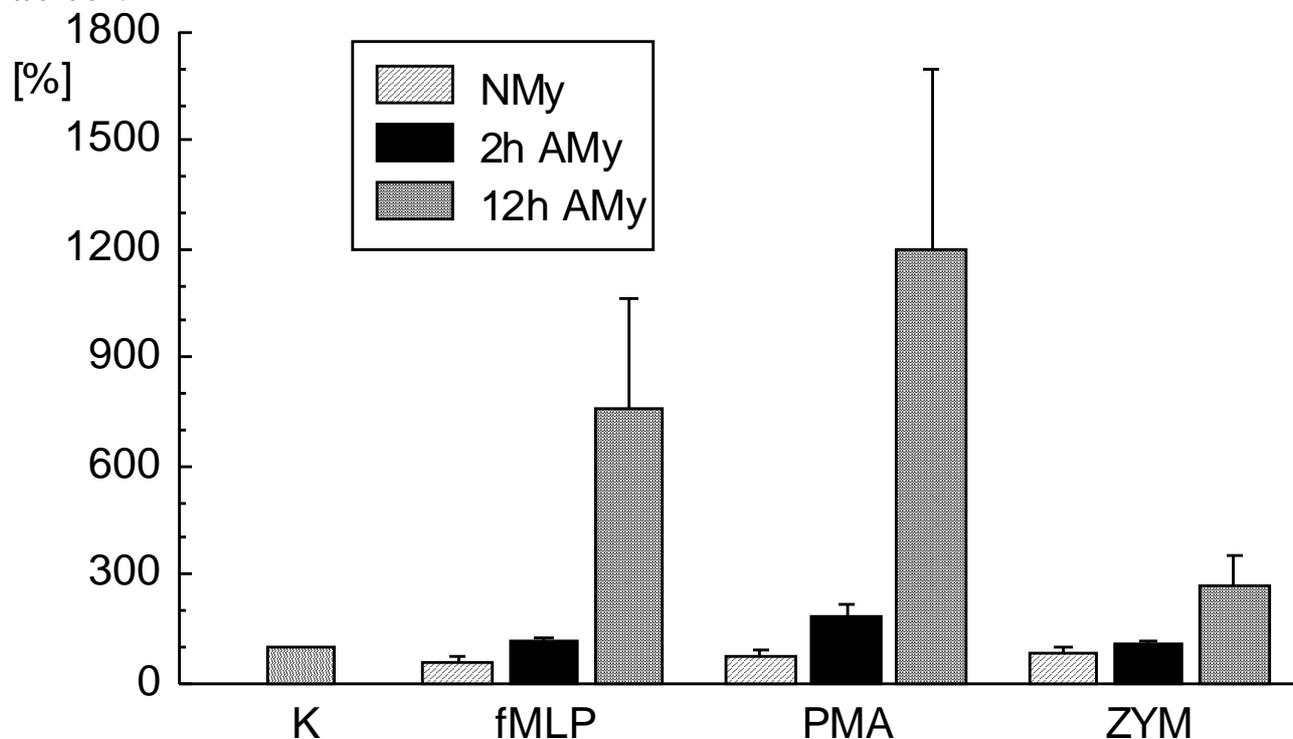


Abb. 14 a: Die Interaktion von normoxischen (NMy), 2h und 12h anoxischen Myozyten (AMy) im Assay mit fMLP, PMA und Zymosan aktivierten PMN

Nr.	Bezeichnung	Mean	Stand. Error	Vergleich	Equal-Variance	Aspin Welch	N	Stand. Error of Mean
1	fMLP + NM	52,5	5,0	1-3< >0	p=0,001	p=0,007	45	0,75
2	fmlp+2h AM	117,2	8,8	1-2< >0	p<0,001	p<0,001	8	3,11
3	fmlp+12hAM	413,8	24,8	2-3< >0	p=0,014	p<0,001	33	4,3
4	PMA + NM	53,4	8,4	4-6< >0	p<0,001	p<0,001	29	1,56
5	PMA+2h AM	182,4	34,7	4-5< >0	p<0,001	p=0,007	8	12,2
6	PMA+12hAM	855	53	5-6< >0	p=0,040	p=0,013	14	14,1
7	ZYM+NM	78,2	8,3	7-9< >0	p=0,006	p=0,054	13	2,6
8	ZYM+2hAM	155	15,8	7-8< >0	p=0,001	p=0,001	7	5,9
9	ZYM+12hAM	326,3	69,3	8-9< >0	p=0,033	p=0,049	7	26

Abb. 14 b: Statistische Auswertung der in Abb. 14a als Histogramm dargestellten Ergebnisse, als Referenzwert (100%) dient das Signal der mit dem jeweiligen Stimulus (fMLP, PMA oder Zymosan) aktivierten PMN

Die Bildung freier Radikale wird in Anwesenheit von normoxischen Myozyten (NMy) im Vergleich mit der Kontrolle (Neutrophile mit Stimulus) um 45% (fMLP als Stimulus), 30% (PMA) und 22% (Zymosan) vermindert. Dagegen erhöht sich das Signal in Anwesenheit von 2h anoxischen Myozyten (2h AMy) um 12% (fMLP), 81% (PMA) und 6% (Zymosan), und in Anwesenheit von 12h anoxischen Myozyten (12h AMy) steigt die Radikalbildung rapide weiter auf 918% (fMLP), 576% (PMA) und 198% (Zymosan) im Vergleich zur Kontrolle an. Als Kontrollwert (100%) dient hierbei die Radikalproduktion von polymorphkernigen Neutrophilen, die mit der jeweiligen Substanz (fMLP, PMA oder Zymosan) stimuliert werden.

4.5. Untersuchung des anoxischen Inkubates, des reoxygenierten Inkubates und der anoxischen Zellen

Zur Klärung der Frage, was für die zusätzliche Aktivierung der Neutrophilen im Assay mit anoxischen Kardiomyozyten verantwortlich ist, wird das zwischen anoxischen Zellen und ihrem Inkubat unterschieden. Durch Zentrifugation separiert man die Kardiomyozyten vom Inkubat und verwendet sowohl das Inkubat als auch die Zellen getrennt als Zusatz zur Biolumineszenzmessung mit aktivierten PMN.

Bei den Experimenten, dargestellt in den folgenden Abbildungen 15-17 werden die Myozyten kurz vor der Messung vom Inkubat getrennt. Damit trotzdem während der Anoxie optimale Kulturbedingungen für die Zellen herrschen, werden die Myozyten bis kurz vor der Messung in Medium 199 gehalten, das u.a. Nukleotide wie Adeninsulfat, Adenin-5-triphosphat und Adenin-5-phosphat enthält. Die Nukleotide sind in der Lage, die aktivierende Wirkung der Stimuli auf PMN über einen Adenosin-Rezeptor zu modulieren und den „burst“ zu vermindern (siehe Abschnitt 4.2.). Andere im Medium enthaltene Stoffe, wie einige Vitamine könnten als Radikalfänger wirken und so die entstandenen Sauerstoffradikale abfangen. Durch zweimaliges Waschen der Zellen in Hanks-Puffer und Verwendung von Hanks-Puffer während der Messung werden die supprimierenden Effekte des Mediums im Assay ausgeschlossen. Wie die Ergebnisse in Abschnitt 4.4. zeigen, können anoxische Myozyten, den „burst“ erhöhen. Für die gemessene Steigerung des Signals, welche mit der Anoxiedauer der Zellen korreliert, sind die anoxischen Zellen verantwortlich und nicht ihr Inkubat..

Um zu prüfen, ob Substanzen durch Myozyten während der Anoxie in das umgebende Medium abgegeben werden, die zur Aktivierung von PMN beitragen können, wird nun während der Anoxie statt Medium 199, das den Effekt von stimulierenden Substanzen maskieren könnte, Hanks-Puffer verwendet. Es läßt sich hierbei auch keine zusätzlich aktivierende Wirkung des anoxischen Inkubates bei aktivierten PMN zeigen (siehe Abb. 15). Es wird also deutlich, daß der Überstand keine ausreichende Menge an Faktoren enthält, die alleine in der Lage wären die PMN zu stimulieren, um die Steigerung des „oxidative burst“ in Anwesenheit von anoxischen Zellen erklären zu können.

In Abbildung 15 wird die Freisetzung freier Radikale fMLP-stimulierter Neutrophiler bei Zusatz von anoxischem Inkubat (Medium 199 und Hanks-Puffer) und bei Zusatz anoxischer Zellen zum Assay gegenübergestellt.

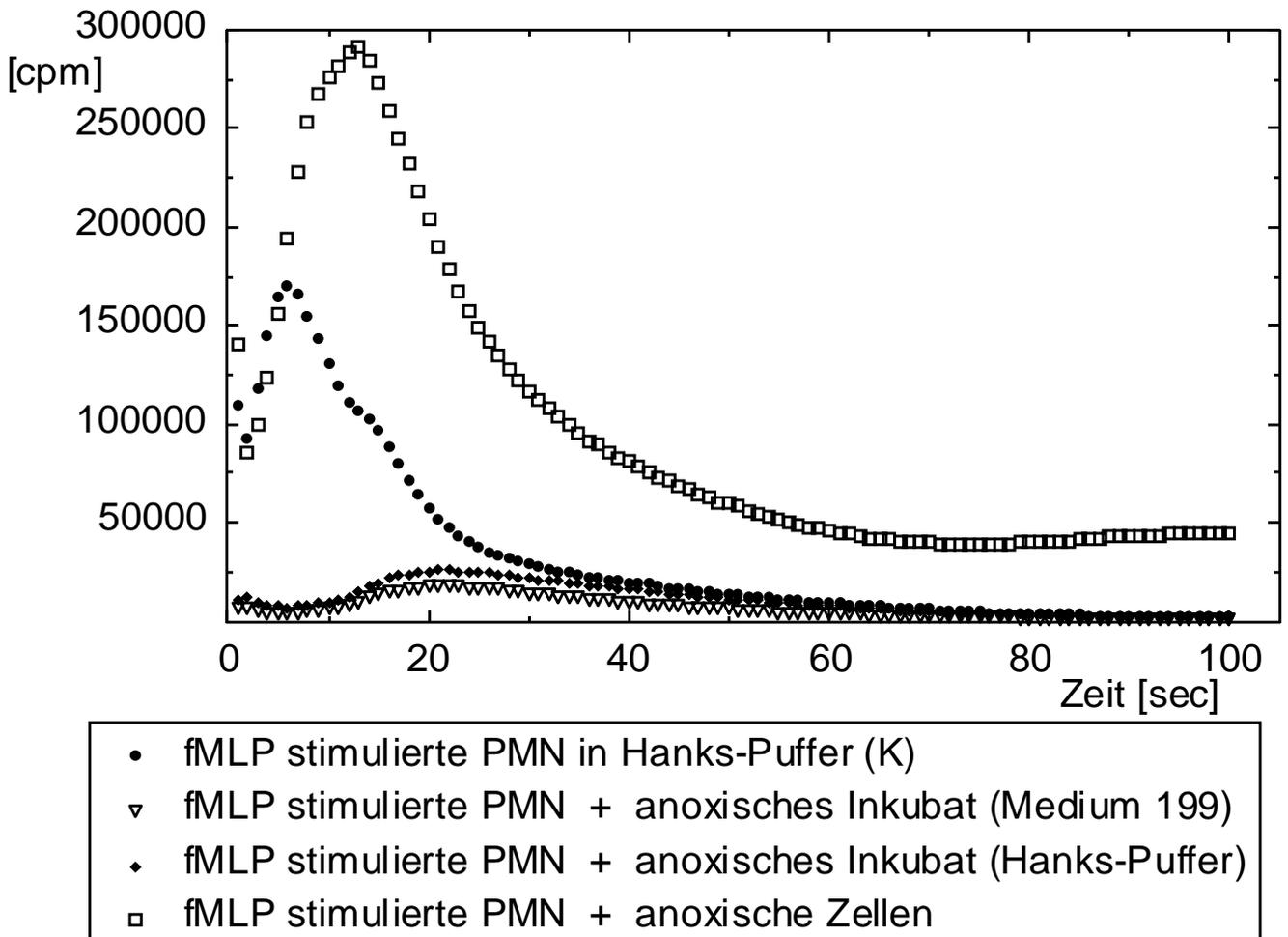
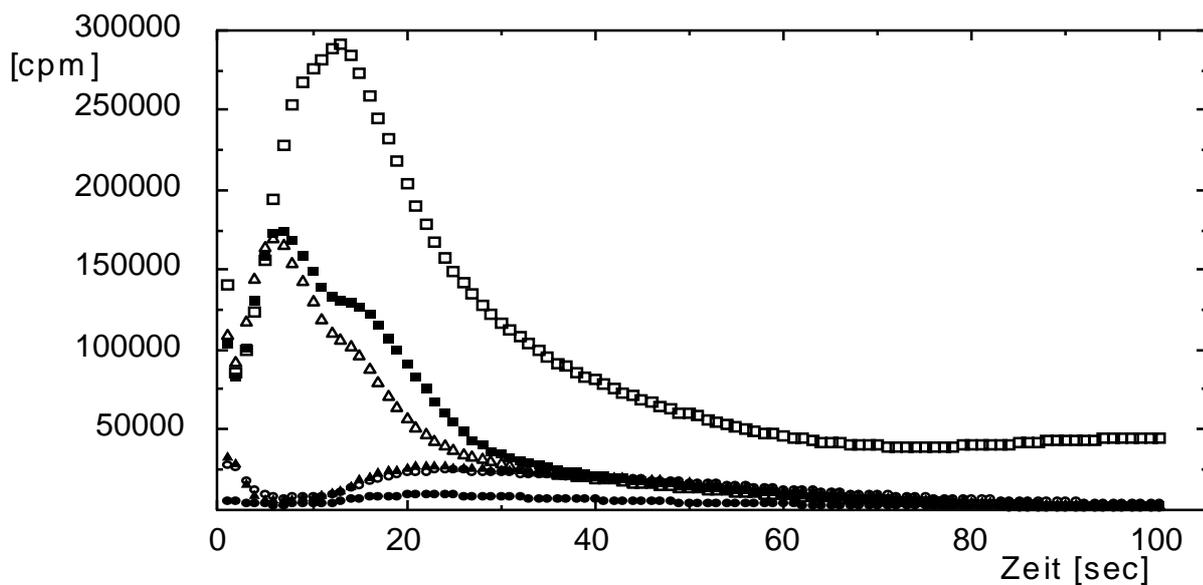


Abb. 15: Vergleich der Kinetikgraphen von fMLP aktivierten PMN bei Zusatz von anoxischem Inkubat (Medium 199 und Hanks-Puffer) und bei Zusatz von anoxischen Zellen

In einem weiteren Experiment wird der Hanks-Puffer nach Beendigung der Anoxie gewechselt. Der erneuerte Hanks-Puffer wird nach 30 Minuten Inkubation mit reoxygenierten Myozyten als zusätzlicher Stimulus für die Neutrophilen im Assay verwendet, in der Annahme, daß anoxische Myozyten aktivierende Substanzen ins umgebende Milieu abgeben könnten, sobald die Anoxie aufgehoben wird, in vivo also nach Reperfusion des ischämischen Gebietes. Auch hierbei läßt sich keine additive Wirkung weder bei fMLP, PMA noch bei Zymosan stimulierten PMN erzielen. Also auch bei Reoxygenierung läßt sich im Überstand kein stimulierender Faktor nachweisen, welcher für die Steigerung der Radikalbildung in Anwesenheit von anoxischen Myozyten verantwortlich gemacht werden könnte.

Die folgende Kinetik (Abbildung 16) veranschaulicht noch mal folgendes:

- Das reoxygenierte-Inkubat im Assay verändert die Kontrollkurve unwesentlich (Kontrolle = fMLP (0.1 μ M) aktivierte PMN).
- Das anoxische Inkubat (Medium 199) reduziert den „burst“ drastisch .
- Wird dem anoxischen Inkubat (Medium 199) Adenosin Deaminase zugesetzt, liegt die Kinetikkurve etwas über der Kurve des anoxischen Inkubates (Medium 199).
- Das anoxische Inkubat (Hanks-Puffer) reduziert ebenfalls den „oxidative burst“ deutlich.
- Wird das anoxische Inkubat (Hanks-Puffer) mit Adenosin-Deaminase (AD) versetzt, nähert sich der Wert der Referenzkurve.
- Gibt man dem Assay die anoxischen Kardiomyozyten in erneuertem Hanks-Puffer zu, so erzielt man eine rapide Steigerung des Signals.



- 500000 PMN + 0.1 μ M fMLP + anoxisches Inkubat (Medium 199)
- 500000 PMN + 0.1 μ M fMLP + anoxisches Inkubat (Medium 199) + 0.25U AD
- ▲ 500000 PMN + 0.1 μ M fMLP + anoxisches Inkubat (Hanks-Puffer)
- △ 500000 PMN + 0.1 μ M fMLP + reoxygeniertes Inkubat
- 500000 PMN + 0.1 μ M fMLP (=K)
- 500000 PMN + 0.1 μ M fMLP + anoxische Zellen

Abb. 16: Zusammenfassende vergleichende Kinetik bei Zugabe von reoxygeniertem Inkubat, von anoxischem Inkubat (Medium 199 und Hanks-Puffer), anoxischem Inkubat (Medium 199 und Hanks-Puffer) mit 0.25 U/ml Adenosin-Deaminase und von anoxischen Zellen zum fMLP-Assay

Die zusammenfassende Statistik, dargestellt in Abbildung 17 bestätigt, daß die Erhöhung des Signals durch die anoxischen Zellen verursacht wird, und weder das anoxische Inkubat (Hanks-Puffer) noch durch das Inkubat, gewonnen während einer 30minütigen Reoxygenierungszeit, in der Lage sind, die Neutrophilen additiv zu stimulieren. Das anoxische Inkubat vermindert das Signal sogar drastisch, dies geschieht hauptsächlich durch den Adenosingehalt, wie es die Experimente mit Adenosin-Deaminase zeigen. Durch Verwendung von Medium 199 kommen noch andere supprimierende Effekte durch z.B. einige im Medium enthaltenden Vitamine, welche die gebildeten Radikale gut abfangen können zum Tragen. Als Kontrolle dient bei der folgenden Abbildung das Signal von durch fMLP (0.1 µM), PMA (200 nM) oder Zymosan (50 µg) stimulierten PMN.

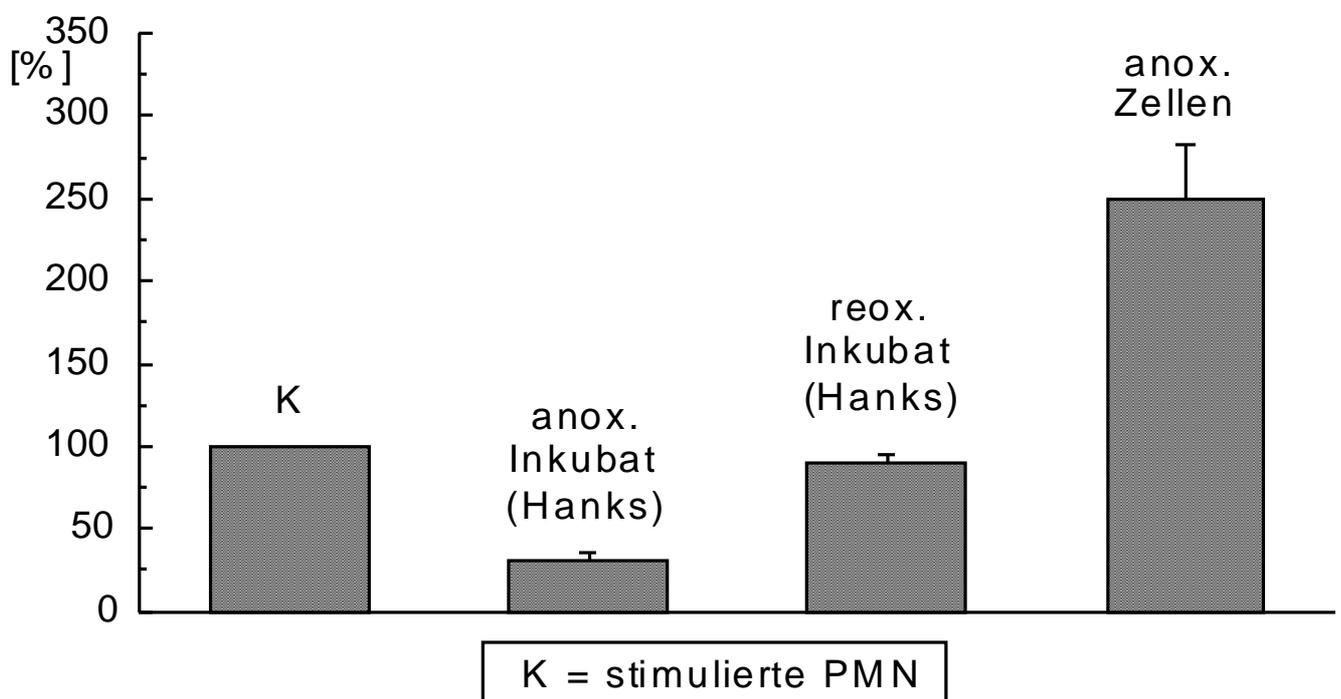


Abb. 17 a: Histogramm mit Darstellung des Unterschiedes bei Zusatz von anoxischen Zellen und - Inkubat zum Biolumineszenzassay

Nr.	Bezeichnung	Mean	Stand. Error	Vergleich	Equal-Variance	Aspin Welch	n	Stand. Error of Mean
1	Anox. Inkubat (Hanks)	30,2	5,2	1-2 < > 0	p < 0,001	p < 0,001	8	1,8
2	reox. Inkubat (Hanks)	89,6	5,3	2-3 < > 0	p < 0,001	p = 0,001	8	1,87
3	Anox. Zellen	250,5	32,5	1-3 < > 0	p < 0,001	p < 0,001	8	11,49

Abb. 17 b: Statistische Auswertung der in 17 a als Histogramm dargestellten Ergebnisse

Anoxische Myozyten sind im Gegensatz zum Inkubat in der Lage, PMN ohne zusätzlichen Stimulus zu aktivieren. Der „respiratory burst“ den PMN daraufhin erzeugen, zeigt die in Abbildung 18 dargestellte Kinetik und ist im Vergleich zum „respiratory burst“ durch z.B. PMA (200 nM) zwar geringer, jedoch klar zu detektieren und liegt z.B. deutlich über dem Signal, wenn PMA mit normoxischen Kardiomyozyten im Assay inkubiert werden.

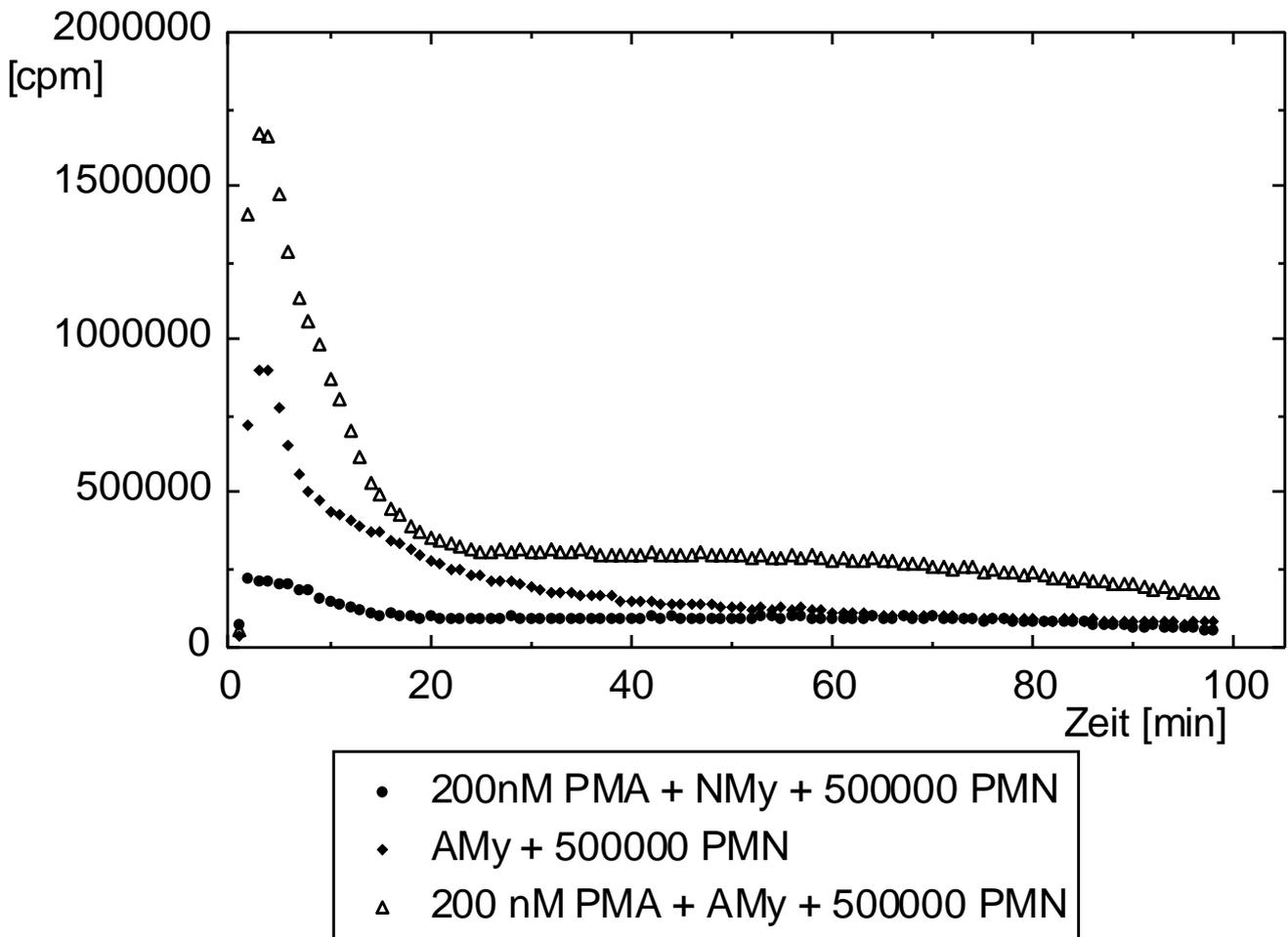


Abb. 18: Kinetikkurve von anoxischen Myozyten (AMy) im Assay mit unaktivierten PMN im Vergleich zu aktivierten PMN (ohne Myozyten und im Assay mit normoxischen Myozyten (NMy))

Als Kontrolle zu der Abbildung (PMN gemessen im Assay mit 12h anoxischen Myozyten ohne zusätzlichen Stimulus) kann man den Hintergrund heranziehen, d.h. nur PMN ohne Stimulus ergibt ein Signal etwa im Bereich von $2-3 \times 10^3$ cpm. Ebenfalls in diesem Bereich liegt das Signal, wenn man den unstimulierten PMN normoxische Myozyten zusetzt, wenn man das anoxische Inkubat als alleinigen „Stimulus“ im Assay mit PMN verwendet oder wenn man normoxische oder anoxische Kardiomyozyten ohne PMN im Biolumineszenzassay mißt. Als Fazit der Untersuchung, ob in das Inkubat freigesetzte Substanzen zur Aktivierung der PMN beitragen, oder ob die Aktivierung der PMN durch anoxische Myozyten geschieht, läßt sich feststellen, daß nicht das Inkubat, sondern die anoxischen Zellen in der Lage

sind, den „oxidative burst“ additiv beachtlich zu steigern und sogar unstimulierte PMN zur Radikalproduktion anzuregen. Die Aktivierung der Neutrophilen erscheint nach den vorliegenden Ergebnissen also nicht an einen löslichen freigesetzten Faktor im Überstand, sondern zellgebunden zu sein. Die detektierten Sauerstoffradikale stammen nicht aus den anoxischen Myozyten, sondern aus den aktivierten PMN, die mit einer gesteigerten Produktion von Sauerstoffradikalen reagieren. Anoxische Myozyten ohne PMN im Biolumineszenzassay gemessen ergeben ein Signal, welches im Bereich von $2-3 \times 10^3$ cpm liegt, also dem Hintergrund entspricht.

Durch die Anoxie scheinen sich die Myozyten so zu verändern, daß sie sowohl bei unstimulierten wie auch bei aktivierten PMN eine vermehrte Radikalbildung im Experiment hervorrufen. Diese Veränderungen können einerseits auf der Modifikation der Zelloberfläche (veränderter Rezeptorstatus der Myozyten durch die extremen Bedingungen der Anoxie) oder andererseits durch den zunehmenden Verlust der zellulären Radikalfängersysteme (insbesondere des SOD-Systems) zurückzuführen sein. Wahrscheinlich kommen beide Veränderungen für die massive Radikaldetektion im Assay von anoxischen Myozyten mit neutrophilen Granulozyten in Betracht (siehe Abschnitte 4.9.1 bis 4.11.2).

4.6. Lichtmikroskopische Unterschiede zwischen normoxischen und anoxischen Myozyten

Die folgenden Photographien von Myozyten im Lichtmikroskop belegen die Unterschiede von der Anoxie ausgesetzten Myozyten und von denen, die unter normoxischen Bedingungen in Kultur gehalten werden. Die Anoxie wird sicher durch das Gas-Pack-Plus-System erzeugt, ein in dem Behälter befindlicher Indikator beweist die Anoxie durch den Farbumschlag. Die Myozyten stellen während der veränderten atmosphärischen Bedingungen ihren Stoffwechsel auf anaerob um, man beobachtet mit zunehmender Anoxie einen Farbumschlag des im Myozytenmedium (M199) befindlichen Indikators, das Milieu wird zum sauren PH-Bereich verschoben. Die Morphologie der Myozyten nach der Anoxie zeigt folgende Unterschiede:

Die 12h anoxischen Myozyten sind durch Hyperkontraktion in den Sarkomeren etwas verkürzt und erscheinen, verglichen mit den „rod-shaped“-normoxischen Myozyten, etwas gedrungener. In der Vitalitätsprüfung mit Trypanblau zeigen anoxische und normoxische Myozyten keine sichtbaren Unterschiede, betrachtet man das Verhältnis an vitalen Zellen zu abgestorbenen Myozyten. Die morphologischen Unterschiede zwischen anoxischen und normoxischen Myozyten sind sehr gering, der durch die Anoxie bedingte Schaden scheint nur leicht zu sein, die Unterschiede in der Absterberate der Zellen sind unwesentlich - sehr wahrscheinlich handelt es sich bei dem stattgefundenen Anoxieschaden um eine reversible Zellschädigung.

Die folgenden Abbildungen 19 bis 22 zeigen unterschiedlich vergrößerte repräsentative Ausschnitte der Kulturen von normoxischen bzw. anoxischen Myozyten. Die Übersicht in Abbildung 21 und 22 macht deutlich, daß der Anteil von

abgerundeten Myozyten in der Gesamtkultur von normoxischen bzw. anoxischen Kardiomyozyten etwa vergleichbar ist. Jedoch erscheinen die anoxischen Myozyten in ihrer Morphologie etwas gedrungener, wie auf den Abbildungen 19 und 20 in einer größeren Vergrößerung zu erkennen ist. Die „rod-shaped“-Form normoxischer Myozyten wird durch die Anoxie verändert und die Zelle verkürzt sich dabei durch Hyperkontraktion der Sarkomere (Abbildung 20).



Abb. 19: Morphologie normoxischer Myozyten, Nativpräparat, 250fache Vergrößerung



Abb. 20: Morphologie anoxischer Myozyten, Nativpräparat, 250fache Vergrößerung

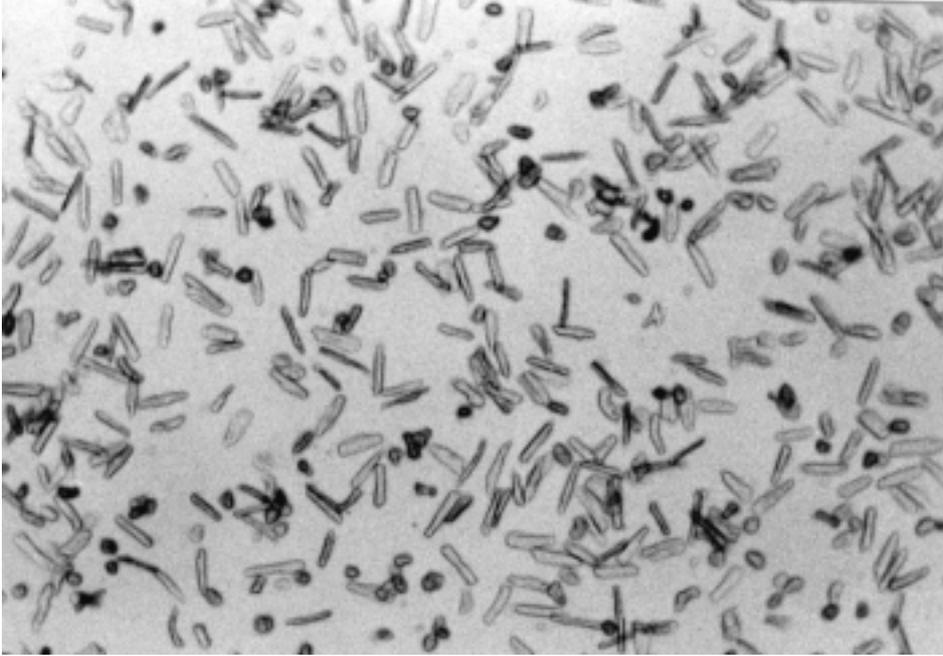


Abb. 21: Übersicht einer Kultur normoxischer Myozyten, Nativpräparat, 100fache Vergrößerung

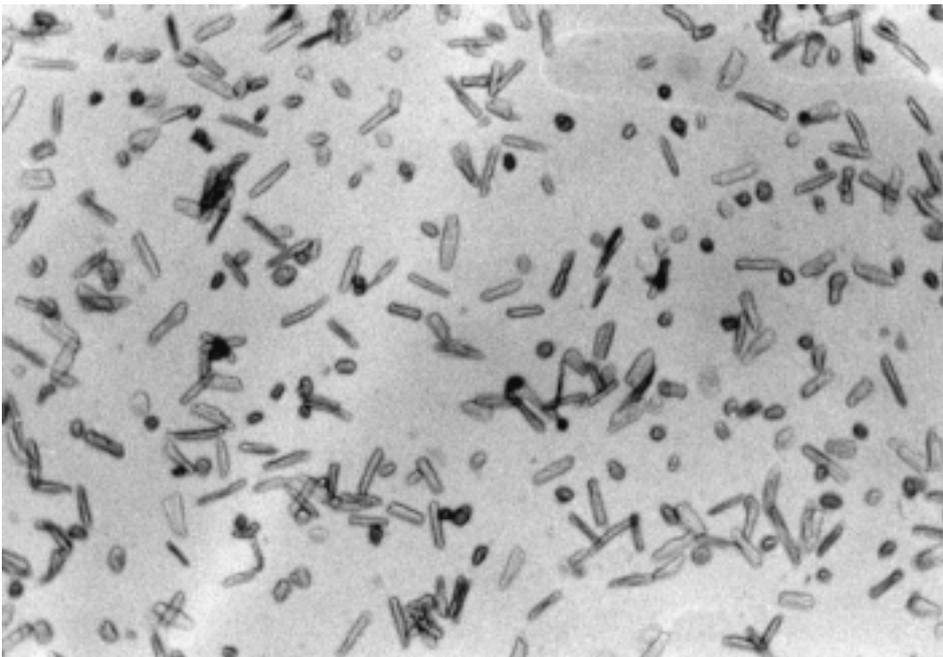


Abb. 22: Übersicht einer Kultur anoxischer Myozyten, Nativpräparat, 100fache Vergrößerung

4.7. Lichtmikroskopie von Myozyten unter Meßbedingungen

Zur Messung der Biolumineszenz im Auto-Lumat müssen die auf Kulturschalen angehefteten Myozyten abgeschabt werden um in das Meßröhrchen transferiert werden zu können. Eine mechanische Schädigung als Folge des Abschabens ist ein beschleunigter Abrundungsprozeß der Kardiomyozyten: Normoxische Myozyten runden sich zu 20 - 30% sofort ab. Ein großer Teil (80-90%) rundet sich während der Dauer der Messung ab, was auch ohne PMN-Inkubation während ein bis zwei Stunden zu beobachten ist. Die beschleunigte Abrundung ist eine Folge des Verlustes der zellulären Adhäsion der Kardiomyozyten. Abgerundete Myozyten sind zunächst noch vital (d.h. Abrundung ist nicht gleichbedeutend mit Zelltod), allerdings sterben sie nach Verlust der Adhäsion schneller ab. Die abgerundeten Myozyten sind bei Meßbeginn in der Gesamtheit vital und überstehen die Messphase von bis zu zwei Stunden in unangehefteten Zustand mit ca. 90%. Danach nehmen bis zu 10% bei der Vitalitätsprüfung Trypanblau auf. Ein ähnliches Verhalten zeigen anoxische Myozyten, d.h. sie runden sich durch Abschaben ab und sind nach 1-2h zu $\geq 10\%$ abgestorben. Hierbei ist der Prozentsatz der Zellen, die in stabförmigem Zustand sterben oder die noch während der nächsten 24h zugrunde gehen, deutlich höher als bei den normoxischen Myozyten. Der Anteil der 12h-anoxischen Myozyten, der in stabförmigem Zustand stirbt, variiert stark bei unterschiedlichen Messungen (von wenigen Prozent bis zu 60%). Einmal abgeschabte Kardiomyozyten können sich nicht mehr auf Kulturschalen anheften und sterben in den nächsten Tagen der Kultur ab. Die im vorgestellten in-vitro-Modell verwendeten Substanzen zur Erzeugung und Detektion von freien Radikalen (d.h.: fMLP, HPO, Natriumazid, PMA, Zymosan und Luminol) sind in den verwendeten Konzentrationen nicht toxisch für die Myozyten. Die folgenden Abbildungen 23 bis 25 machen die Wirkung unterschiedlicher Störgrößen auf normoxische Myozyten deutlich. Die Photographie der normoxischen Myozyten (Abbildung 23) charakterisiert die kultivierten Herzmuskelzellen, als stabförmige Zellen, bei denen u.U. auch gut die intrazelluläre Struktur mit der typischen Anordnung der kontraktilen Aktin und Myosinfilamente als Querstreifung lichtmikroskopisch zu erkennen ist. Durch den Verlust der Adhäsion an der Kulturschale verändert sich diese „rod-shaped“-Form der Myozyten und die Zellen beginnen sich abzurunden, was in Abbildung 24 dargestellt ist. Werden normoxische Myozyten in der Kultur mit aktivierten Neutrophilen konfrontiert, so kommt es zum Teil auch zu einer Abrundung der Zelle, andere Myozyten der gleichen Kultur können sich noch die „rod-shaped“-Form bewahren. Die folgenden lichtmikroskopischen Photographien machen deutlich, daß der Verlust der Adhäsion einen großen Einfluß auf den Abrundungsprozeß kultivierter Herzmuskelzellen hat. Die Folgen eines Adhäsionsverlustes sind schwerwiegender als die Inkubation von normoxischen Myozyten mit aktivierten PMN.

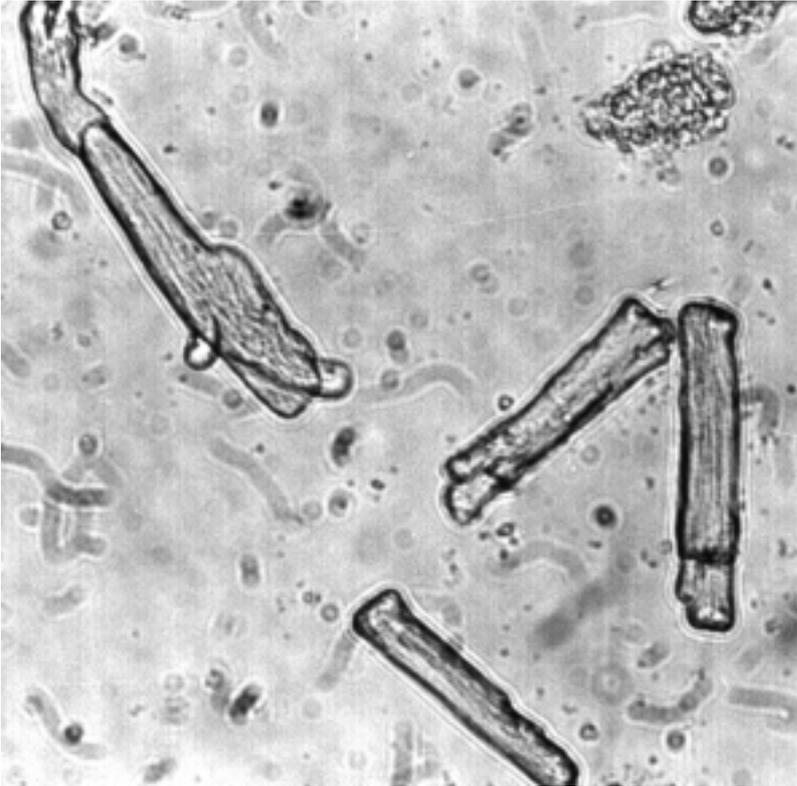


Abb. 23: Normoxische Myozyten (12h), Nativpräparat, 250fache Vergrößerung

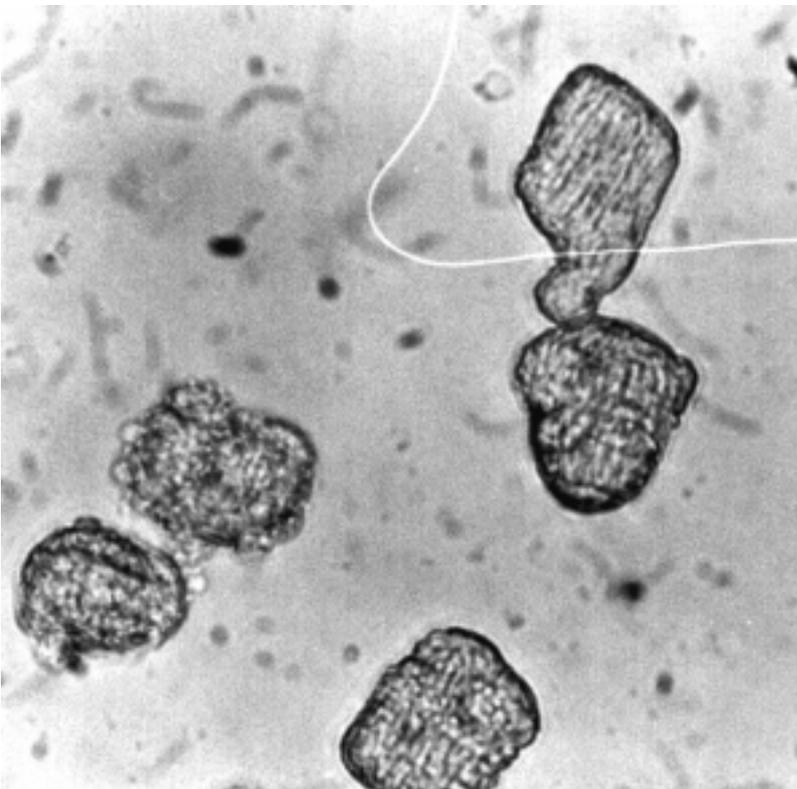


Abb. 24: Normoxische Myozyten mit Verlust der Adhäsion (12h), Nativpräparat, 250fache Vergrößerung

4.8. Charakteristische Veränderungen während der Co-Kultur von aktivierten PMN mit Myozyten

Vor der Co-Inkubation mit aktivierten PMN wird das Medium 199 durch Hanks-Puffer ersetzt. Myozyten bleiben auf der Kulturschale angeheftet, die PMN werden direkt auf die Kulturschale gegeben, aktiviert und die Wechselwirkung im Lichtmikroskop beobachtet. Zur Aktivierung der PMN wird vor Aufbringung der Neutrophilen auf die Kulturschale mit adhärennten Myozyten dem Puffer 0.1 µM fMLP, 10 U HPO und 0.1 mM Natriumazid zugesetzt.

4.8.1. Normoxische Myozyten mit aktivierten PMN und Vergleich zur Kontrollgruppe ohne PMN-Inkubation

Die normoxischen Myozyten zeigen in der Co-Kultur mit aktivierten PMN folgende Veränderungen:

Innerhalb 1-2h runden sich die normoxischen Myozyten zu einem geringen Teil ab oder kontrahieren sich deutlich mehr (bis zu 15-20% der Zellen verhalten sich so). Eventuell überstehen sie aber auch die PMN-Inkubation in ihrem Anfangszustand, höchstens bis zu 15% sterben nach 1-2h Inkubation. Die aktivierten PMN verteilen sich relativ diffus auf der Kulturschale, einzelne sitzen an stabförmigen Myozyten und an sich abrundenden Zellen, letzteres kann etwas häufiger beobachtet werden. Am zweiten Tag ist eine beginnendes Zell-„spreading“ (Erläuterungen weiter unten) zu sehen, die bis zum fünften Tag fortschreitet, dann erscheint das Zytoplasma vesikelreicher, die Letalitätsprüfung mit Trypanblau ergibt am 6. Tag nach der PMN-Inkubation: 15-20% der angehefteten und „entdifferenzierten“ Zellen nehmen Trypanblau auf. Der Anteil an abgerundeten Zellen am 7. Tag ist konstant und ist bei normoxischen mit oder ohne PMN-Inkubation und bei 12h anoxischen Myozyten ohne PMN Inkubation gleich.

Normoxische Myozyten in der Kultur dienen als Kontrolle, folgende Charakteristika weist diese Zellkultur auf: In der Langzeitkultur von Kardiomyozyten wird das sog. Zell-„spreading“ (*Piper 1990*) beobachtet. Die Zellen verlieren ihre für Herzmuskelzellen typische Morphologie, also die längliche, stäbchenartige Form und die Querstreifung. Das „cell-spreading“ geht mit einer äußeren Formveränderung (Abrundung und danach Abflachung), sowie mit einem intrazellulären Umbau z.B. der kontraktile Elemente einher, was den Verlust der Querstreifung erklärt. Zell-„spreading“ verläuft in der Langzeitkultur über einen initialen Abrundungsprozeß, diesem Zustand folgt dann, daß die Kardiomyozyten extrem flach werden und viele zytoplasmatische Zellausläufer bekommen, diese „entdifferenzierte“ Zellform ist morphologisch von der ursprünglichen stabförmigen Form („rod shaped“ Form) der Kardiomyozyten zu unterscheiden.

Wie früh das Phänomen des „spreadings“ in der Kultur auftritt, hängt z.B. davon ab, wie oft das Medium gewechselt wird, vom Serumgehalt des Mediums und von vielen anderen Faktoren. So beschleunigen z.B. auch Katecholamine (insbesondere α_1 -Agonisten), hoher Serumgehalt und „verbrauchtes“ Medium mit einer hohen Anzahl von Stoffwechselendprodukten das „cell-spreading“ der Myozyten.

Die Kontroll-Kultur ohne PMN-Inkubation zeigt am zweiten Tag ebenfalls ein beginnendes „spreading“, welches am fünften Tag im Gesamtbild aber nicht so viele vesikelreiche Zellen aufweist. Das „cell-spreading“ scheint auch nicht so bizarre Zellausläufer wie vergleichsweise bei normoxischen Myozyten in Anwesenheit von PMN und wie bei 12h anoxischen Myozyten zu produzieren. Der Prozentsatz der „entdifferenzierten“ Zellen, die am sechsten Tag Trypanblau aufnimmt, ist 10 bis 15%.

Die Abbildungen 25 bis 28 machen die Veränderungen von normoxischen Myozyten bei Anwesenheit von aktivierten PMN nach 24h und nach einigen Tagen deutlich. In Abbildung 26 ist zu erkennen, daß trotz Co-Kultur mit aktivierten Neutrophilen ein Großteil der Myozyten stabförmig („rod-shaped“) bleibt. Die lichtmikroskopischen Aufnahmen (Abbildung 27) zeigen die normalen Veränderungen der Myozyten bei längerdauernder Kultur. Es ist zu sehen, daß die Zellen ihre „rod-shaped“-Form verlieren, sich abrunden, Zellausläufer bekommen und die typische Querstreifung verlieren. Entsprechendes geschieht auch mit normoxischen Myozyten in der Co-Kultur mit aktivierten PMN, wie die Abbildung 28 demonstriert.

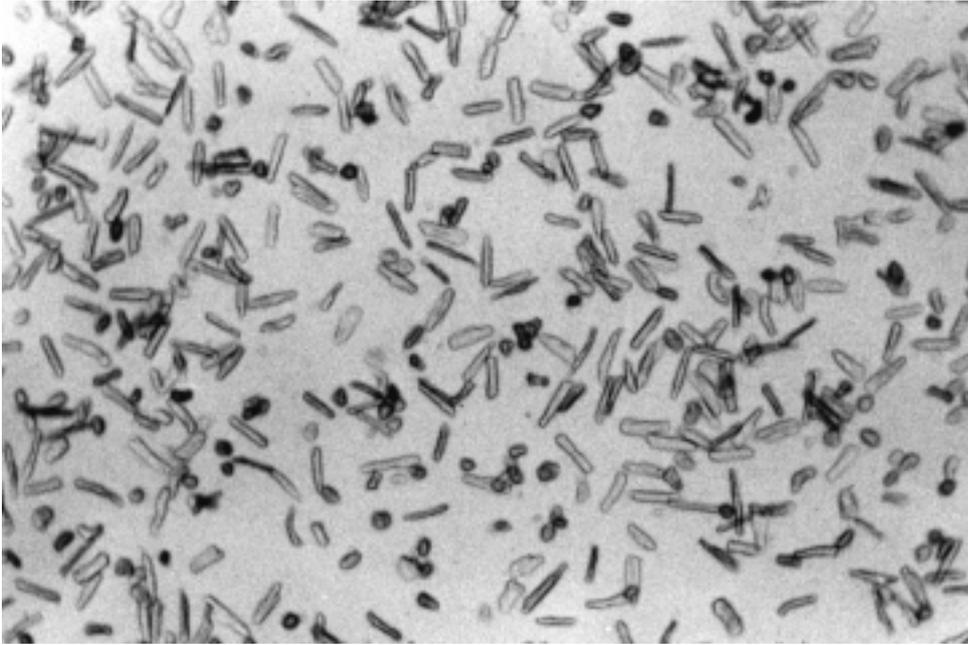


Abb. 25: Normoxische Myozyten nach 24h, Nativpräparat, 100fache Vergrößerung

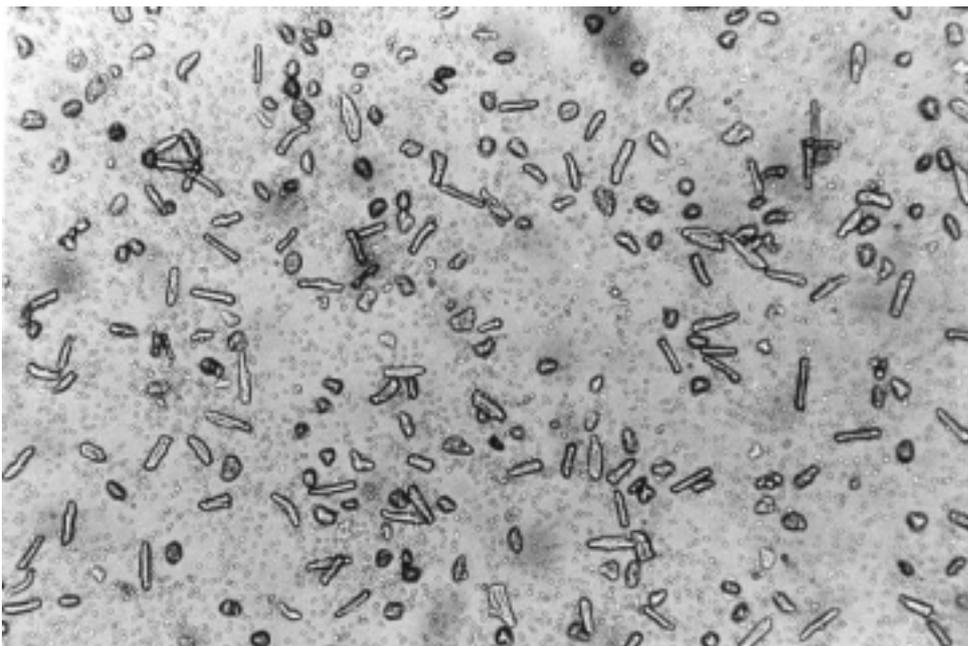


Abb. 26: Normoxische Myozyten mit aktivierten PMN nach 24h, Nativpräparat, 100fache Vergrößerung



Abb. 27: Normoxische Myozyten am 6. Tag, Nativpräparat, 150fache Vergrößerung

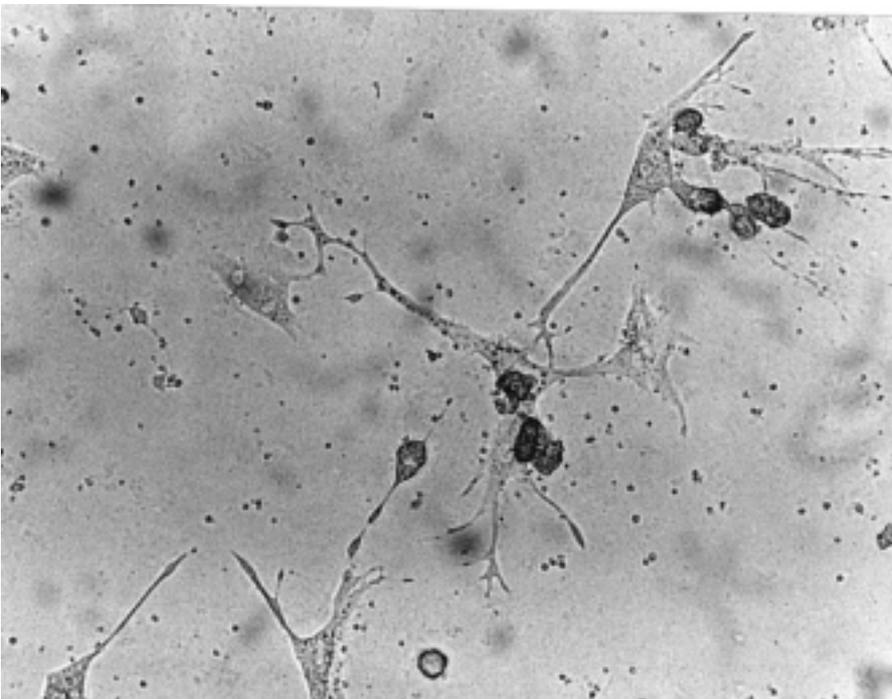


Abb. 28: Normoxische Myozyten mit aktivierten PMN am 6. Tag, Nativpräparat, 150fache Vergrößerung

4.8.2. 12h anoxische Myozyten und aktivierte PMN im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne PMN-Inkubation

Während der PMN-Inkubation runden sich bis zu 65% der Zellen ab oder sterben im stabförmigen Zustand (Kriterium für den Zelltod ist hierbei die Anfärbung der Zellen mit Trypanblau). Die aktivierten Neutrophilen besetzen und sammeln sich in der Nähe der absterbenden Myozyten, sie umrahmen die sich abrundenden Zellen, aber auch stabförmige Zellen, die dann in diesem Zustand sterben. Am zweiten Tag nach der PMN-Inkubation sind alle 12h anoxischen Myozyten nicht mehr in der Lage, Trypanblau auszuschließen, ihre Membranen sind dafür durchlässig geworden, ein Kriterium, das auf den Zelltod hinweist. Myozyten, die stabförmig sterben, bleiben auch über Tage in diesem Zustand, bis sie sich durch Autolyse zunehmend auflösen. Man beobachtet wegen des frühen Zelluntergangs (bereits während des ersten Tages) kein „spreading“ der Zellen.

Die Kultur von 12h anoxischen Myozyten dient als Kontrollgruppe, folgendes kann man beobachten: Während der Anoxie verkürzen sich die Myozyten z.T. geringfügig, sie sind etwas kontrahierter als normoxische Myozyten. Der Prozentsatz der vitalen Zellen entspricht denen der normoxischen. Am zweiten Tag sind sie in der Lage, eine beginnendes Zell-„spreading“ durchzumachen, die am fünften Tag bizarrer und vesikelreicher erscheint als bei normoxischen Herzmuskelzellen. Der Anteil der absterbenden „entdifferenzierten“ Zellen beträgt am sechsten Tag 35%. So scheinen anoxische Myozyten sich schneller zu „entdifferenzieren“ und eher in der Langzeitkultur abzusterben im Vergleich zu normoxischen Myozyten, eine Zwischenstellung nehmen normoxische Myozyten mit PMN-Inkubation ein (siehe Abschnitt 4.7.1.).

Die folgenden Abbildungen 29 bis 32 der Myozytenkulturen machen die Veränderungen der anoxischen Myozyten bei Zusatz der aktivierten PMN zur Kultur deutlich. Abbildung 30 demonstriert, daß bereits nach 24h der Großteil der anoxischen Myozyten abgerundet ist und, wie eine Trypanblauprobe zeigt, abgestorben ist. Dementsprechend ergibt eine Langzeitbeobachtung über einige Tage keine Veränderungen mehr im Sinne eines Zell-„spreadings“ (siehe Abbildung 32). Daß aber Myozyten, die einer 12h-Anoxie ausgesetzt waren in der Kultur länger überleben und auch entsprechende Effekte des Zell-„spreadings“ nach einigen Tagen aufweisen können, ist in der Abbildung 31 zu erkennen.

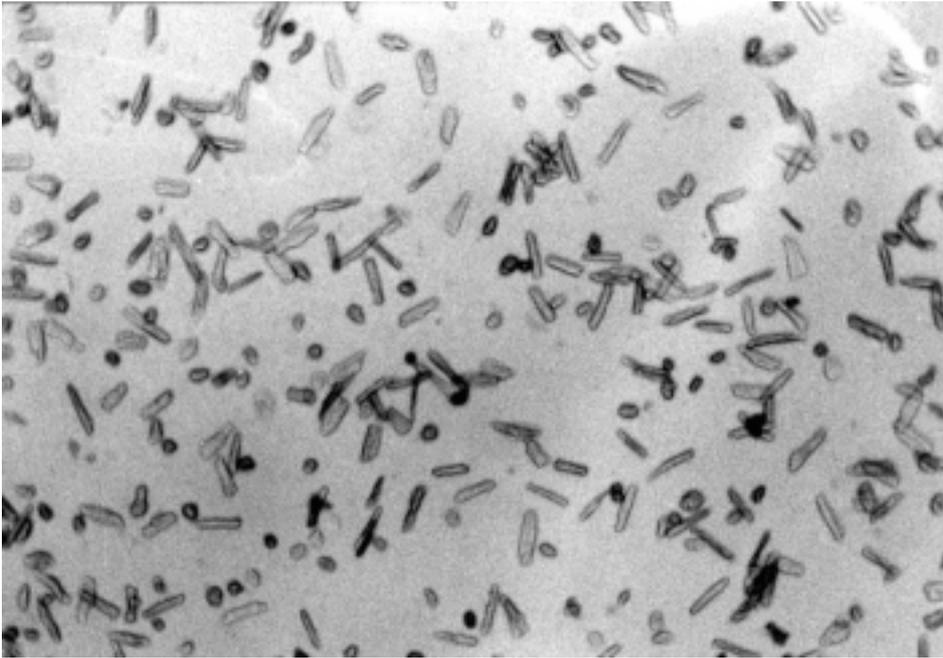


Abb. 29 : Anoxische Myozyten nach 24h, Nativpräparat, 100fache Vergrößerung

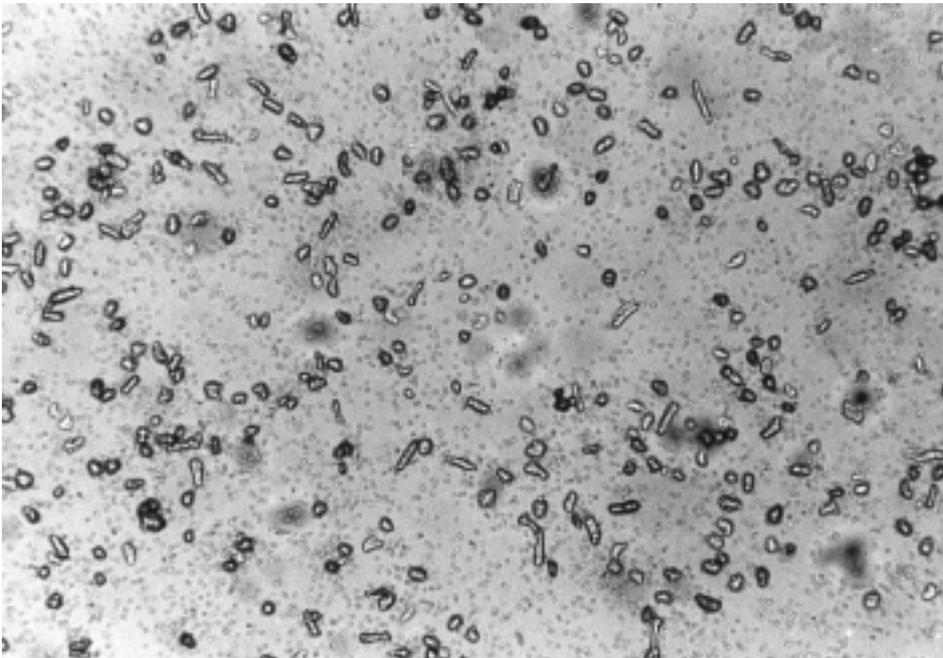


Abb. 30: Anoxische Myozyten mit aktivierten PMN nach 24h, Nativpräparat, 100fache Vergrößerung

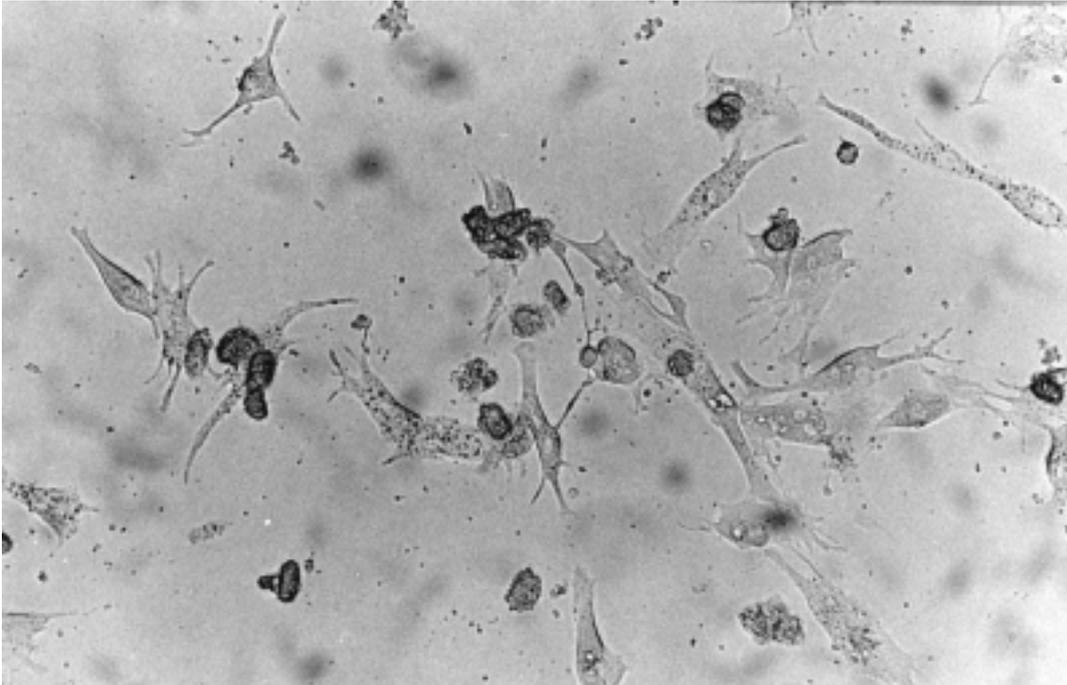


Abb. 31: Anoxische Myozyten am 6. Tag, Nativpräparat, 150fache Vergrößerung

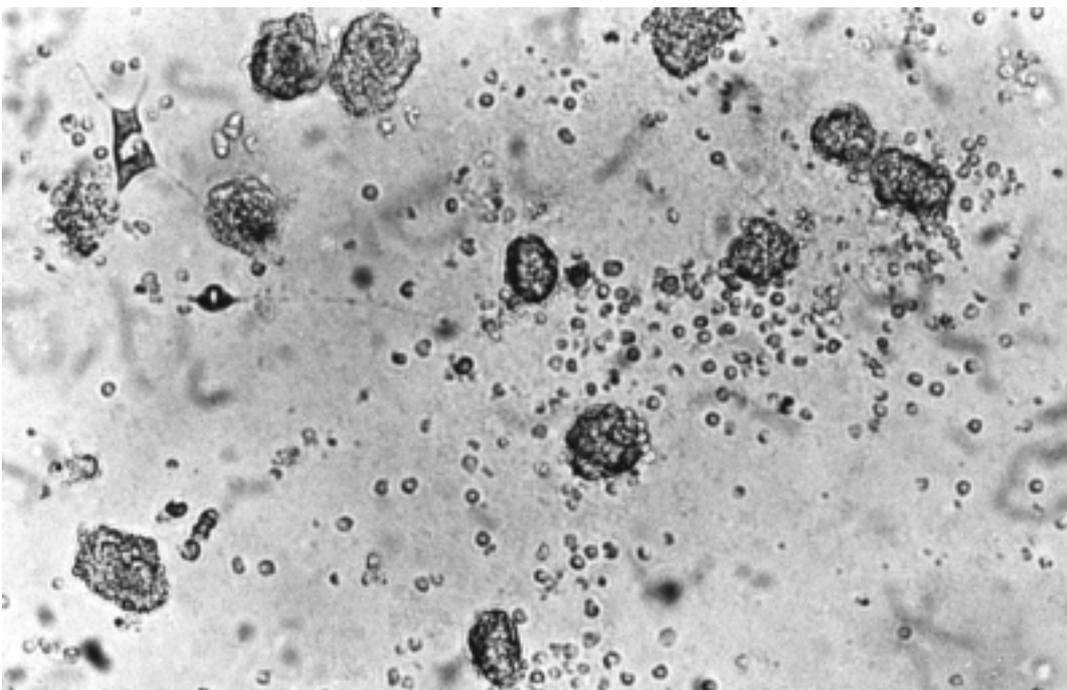
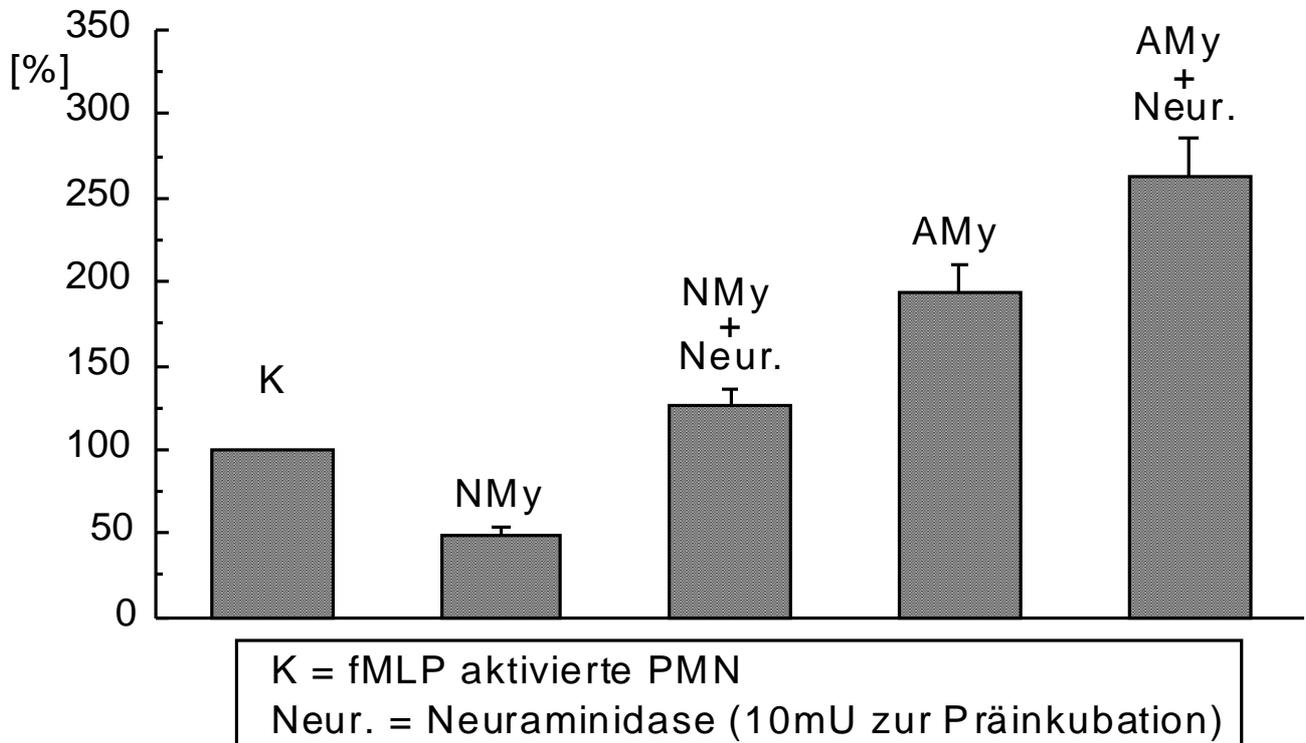


Abb. 32: Anoxische Myozyten mit aktivierten PMN am 6. Tag, Nativpräparat, 150fache Vergrößerung

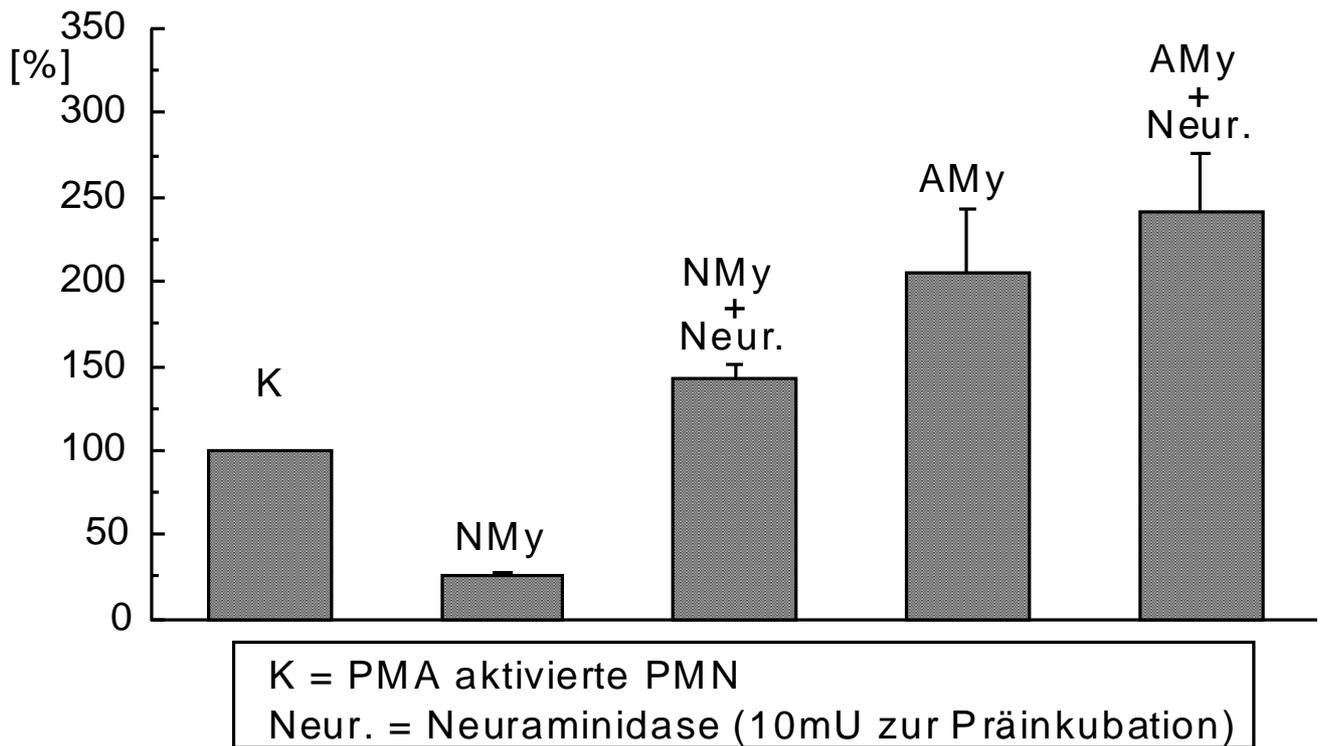
4.9.1. Einfluß der Oberflächenstrukturen auf die Interaktion von Myozyten und PMN

Die Annahme, daß zelluläre Kontakte zwischen anoxischen Myozyten und PMN zur Aktivierung der Neutrophilen beitragen (siehe Abschnitt 4.5.), läßt sich überprüfen, indem die Zell-Zell-Verbindungen durch Substanzen gestört werden, damit die Interaktionen, die zur Stimulierung der PMN führen, verhindert werden. Die aktivierenden interzellulären Kontakte durch Veränderung der Oberflächenstrukturen der Myozyten könnten durch Einsatz von Neuraminidase unterbunden werden. Es wird folglich angenommen, daß es durch mit Neuraminidase behandelte anoxische Myozyten zu keiner additiven Aktivierung der PMN mehr kommt. Werden Myozyten mit Neuraminidase vorbehandelt, werden bestimmte Zuckermoleküle der Glykokalyx abspalten und dadurch Oberflächenstrukturen relativ unspezifisch verändert. Die Neuraminidase von *Clostridium perfringens* ist eine Acylneuraminyl-Hydrolase und ist in der Lage, von Oligosacchariden, Glykoproteinen oder Glykolipiden folgende Verbindungen zu spalten: Hydrolyse von 2.3-, 2.6-, und 2.8-glykosidischen Verbindungen von N- oder O-acylneuraminyl-Resten von Galactose, von N-Azetylhexosaminen oder von N- oder O-azylierten neuraminyl-Resten von Zuckermolekülen der Glykokalyx. In den folgenden Experimenten werden die Myozyten ca. 30 Minuten mit der Neuraminidase präinkubiert, danach wird durch Abzentrifugieren des Puffers die Neuraminidase entfernt und die so vorbehandelten Zellen im Biolumineszenzassay verwendet. Werden Myozyten mit der Acylneuraminyl-Hydrolase (10 mU/ml) vorbehandelt, so steigert sich jedoch der „oxidative burst“ im Vergleich zu dem „burst“ von aktivierten PMN in Anwesenheit von normoxischen bzw. anoxischen Myozyten, wie die folgenden Diagramme (Abbildung 34 und 35) veranschaulichen. Die Abbildung 36 zeigt eine dosisabhängige Steigerung des „respiratory burst“ mit steigenden Konzentrationen von Neuraminidase (1 mU/ml, 3 mU/ml und 10 mU/ml) bei der Präinkubation von normoxischen Myozyten am Beispiel einer Kinetikgraphik eines fMLP-Assays.



Nr.	Bezeichnung	Mean	Stand. Error	Vergleich	Equal-Variance	Aspin Welch	n	Stand. Error of Mean
1	NMy	48,6	4,5				11	1,35
2	Nmy+neur.	126,2	9,8	1-2< >0	p<0,001	p<0,001	11	2,9
3	AMy	194,3	15,8				13	4,38
4	AMy+neur.	272	9,6	3-4< >0	p=0,019	p=0,021	13	2,66

Abb. 34 a und b: Die Wirkung von Neuraminidase auf die Interaktion von anoxischen (AMy) und normoxischen Myozyten (NMy) im Assay mit fMLP und PMA aktivierten PMN, dargestellt als Histogramm und die statistische Auswertung in tabellarischer Form



Nr.	Bezeichnung	Mean	Stand. Error	Vergleich	Equal- Variance	Aspin Welch	n	Stand. Error of Mean
1	NMy	26,5	0,9				6	0,36
2	NMy+neur.	142,5	9,0	1-2< >0	p<0,001	p<0,001	6	3,67
3	AMy	205,2	37,6				4	18,8
4	AMy+neur.	242	34,4	3-4< >0	p=0,498	p=0,498	4	17,2

Abb. 35 a und b: Die Wirkung von Neuraminidase auf die Interaktion von anoxischen (AMy) und normoxischen Myozyten (NMy) im Assay mit fMLP und PMA aktivierten PMN, dargestellt als Histogramm und die Statistische Auswertung in tabellarischer Form

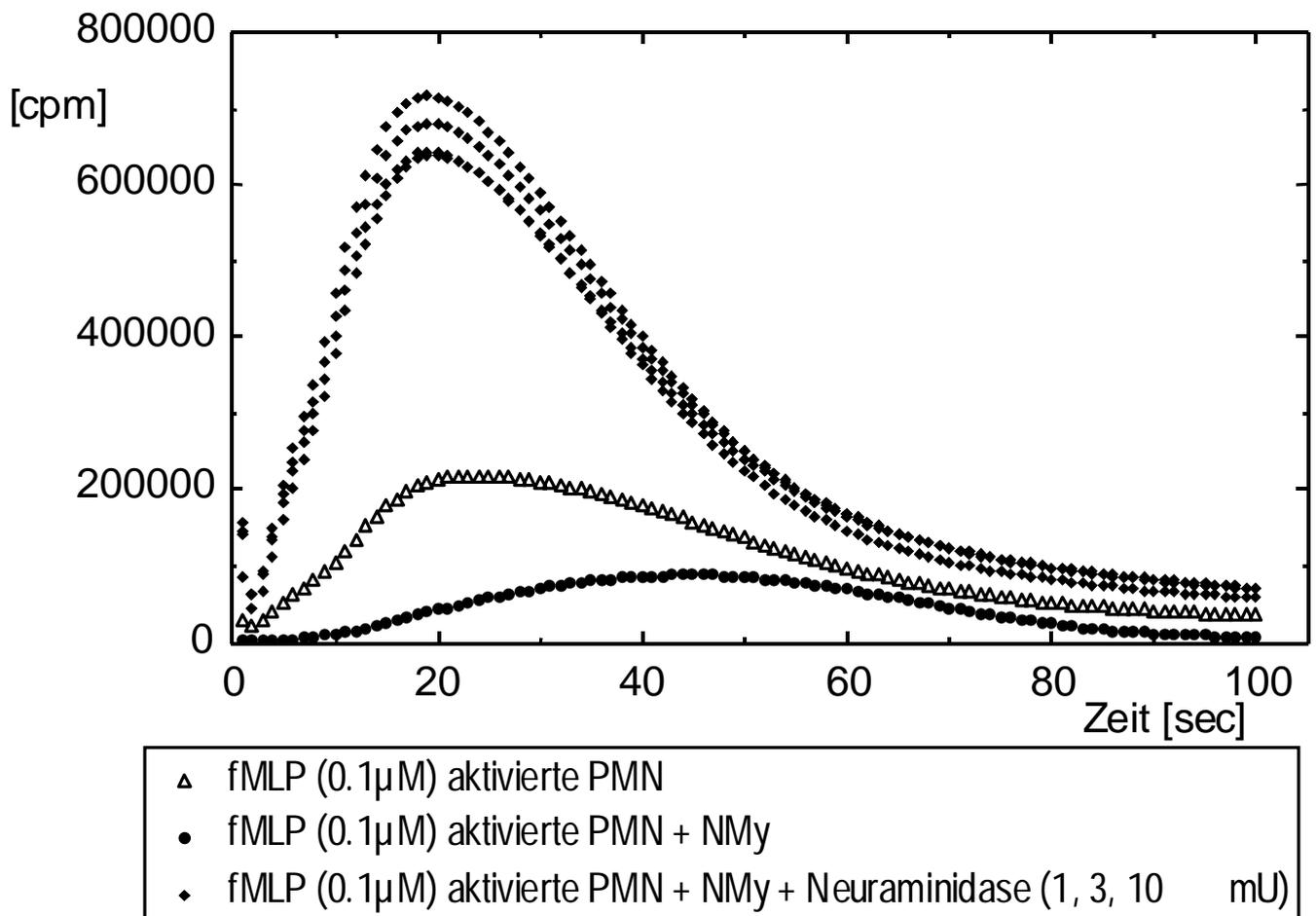


Abb. 35: Dosisabhängige Steigerung des „respiratory burst“ mit steigenden Konzentrationen von Neuraminidase (1, 3 und 10 mU/ml) bei der Präinkubation von normoxischen Myozyten (NMy) (Kinetikgraphik am Beispiel von fMLP aktivierten PMN und steigenden Konzentrationen von Neuraminidase)

4.9.2. Der Einfluß der Neuraminidase in der Co-Kultur

Präinkubiert man normoxische Myozyten mit Neuraminidase (10 mU/ml) und setzt sie dann aktivierten PMN aus, so beobachtet man in dieser Co-Kultur eine vergleichsweise hohe Absterberate der Myozyten im Vergleich zur Kontrollkultur (Abbildung 37 und 38).

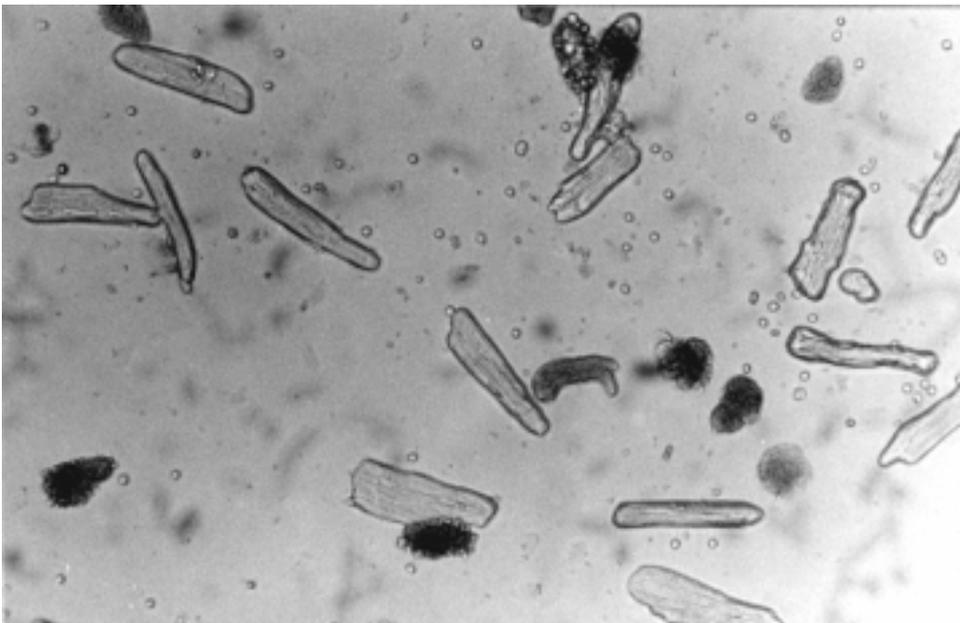


Abb. 37: Normoxische Myozyten mit aktivierten PMN nach 24h, Nativpräparat, 150fache Vergrößerung

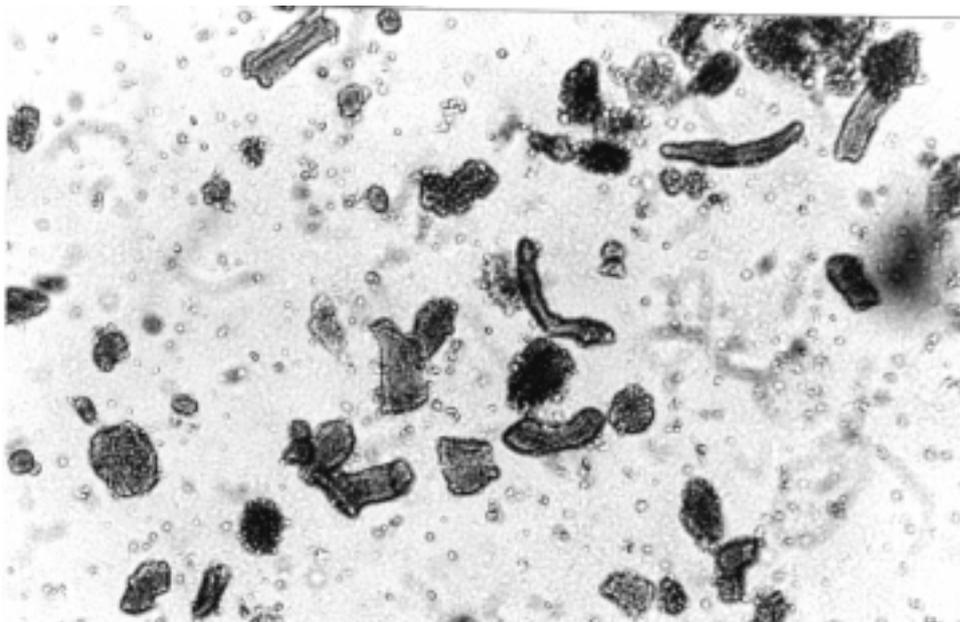
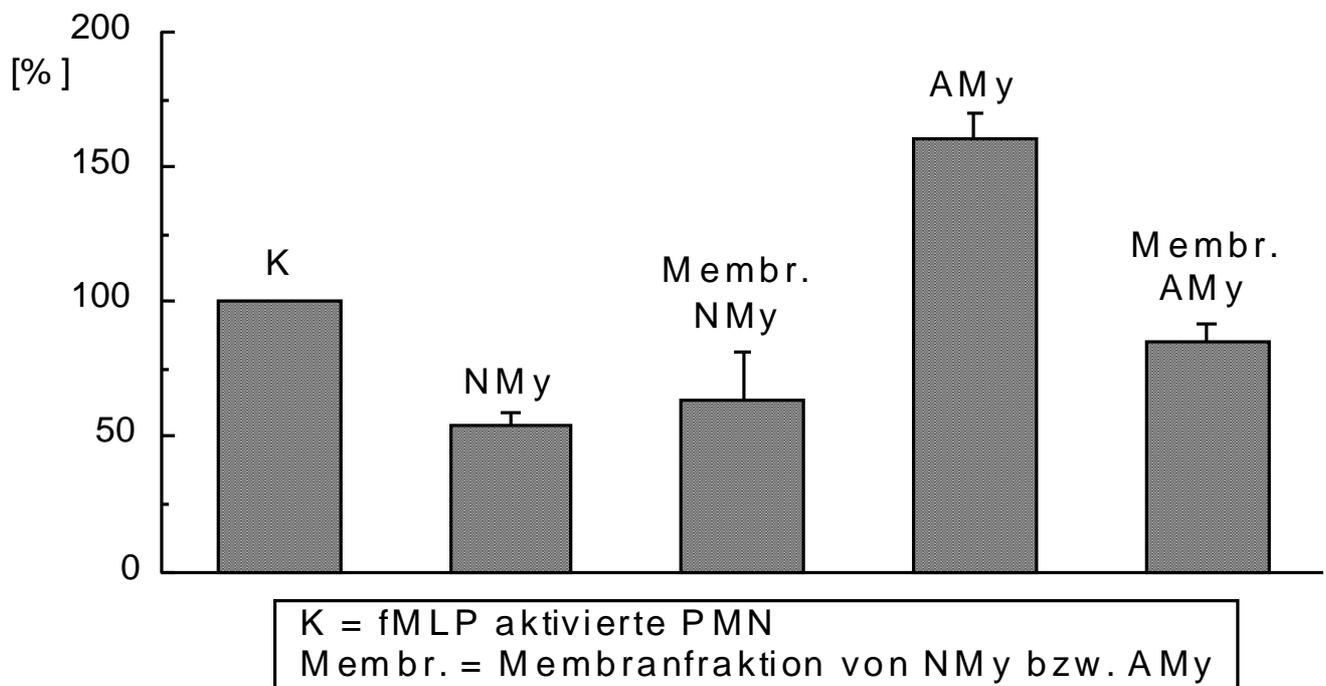


Abb. 38: Mit Neuraminidase vorbehandelte normoxische Myozyten mit aktivierten PMN nach 24h, Nativpräparat, 150fache Vergrößerung

4.10.1. Membranfraktionen der Myozyten als Zusatz im Biolumineszenzassay

In weiteren Experimenten wird der Einfluß von Membranfraktionen, gewonnen aus der Zellpopulation von normoxischen oder anoxischen Kardiomyozyten im Lumineszenzassay mit aktivierten PMN untersucht. Nach Homogenisieren der Zellen kann durch Zentrifugation im Zuckergradienten (siehe 3.1.5.) die Membranfraktion von 50 000 Myozyten separiert und im Assay als Zusatz verwendet werden. Durch Homogenisieren entstehen Membranstücke, welche sich wieder zu Vesikeln schließen können. Die ursprüngliche Oberfläche der Zelle kann nach außen oder nach innen gekehrt sein („inside out“). Die Membranfraktion aus normoxischen Myozyten reduziert das Signal aktivierter PMN im Biolumineszenzassay weniger, verglichen mit intakten normoxischen Zellen. Die Membranfraktion von anoxischen Myozyten ist erstaunlicherweise kaum noch in der Lage, den „burst“ in dem Maße zu steigern, wie es die kompletten anoxischen Zellen tun. Als Referenzwert gilt in Abbildung 39 das Signal von fMLP (0.1 µM) aktivierten polymorphkernigen Neutrophilen.



Nr.	Bezeichnung	Mean	Stand. Error	Vergleich	Equal-Variance	Aspin Welch	n	Stand. Error of Mean
1	NMy	54,3	4,8				6	1,95
2	NMy-HOM	85,3	7,3	1-2<>0	p=0,005	p=0,006	6	2,9
3	AMy	161,3	10				6	4,08
4	AMy-HOM	74,5	14,9	3-4<>0	p<0,001	p<0,001	6	6,0

Abb. 39 a und b: Der Einfluß der Membranfraktion von anoxischen (AMy) und normoxischen Myozyten (NMy) auf die aktivierten PMN dargestellt als Histogramm, Statistische Auswertung und Darstellung in tabellarischer Form

4.11.1. Untersuchungen am SOD-System der Myozyten

Die Ergebnisse der Experimente in Abschnitt 4.9.1., 4.9.2. und 4.10.1. zeigen, daß die Myozyten offensichtlich ein intaktes Membransystem zu einer physiologischen Wechselwirkung mit stimulierten Neutrophilen benötigen. Ergänzend sei an die Ergebnisse in Abschnitt 4.4. erinnert, die demonstrieren, daß normoxische Myozyten in der Lage sind, das Biolumineszenzsignal im Assay mit fMLP, PMA oder Zymosan aktivierten PMN im Vergleich zur Kontrolle (aktivierte PMN ohne Myozyten) zu senken. Da das zelluläre Radikalfängersystem mit der äußeren Zellmembran assoziiert ist, lassen die Ergebnisse die Bedeutung eines zellulären Radikalfängersystems, z.B. des Superoxid-Dismutase-Systems (SOD) an der Wechselwirkung Myozyt-Neutrophiler vermuten.

Die Wirkung von SOD auf das Chemilumineszenzsignal im Luminol vermittelten Assay von aktivierten Neutrophilen wird kontrovers diskutiert. Die Radikalfängerwirkung von SOD ist nicht durch die Reaktionsgleichung (siehe Seite 3) zu erklären, welche zur Bildung von H_2O_2 aus 2O_2^- und 2H^+ führt:



Vielmehr würde man aus dieser Gleichung eine Steigerung der H_2O_2 -Produktion und damit des Signals im Assay mit SOD erwarten. Das Gegenteil ist aber tatsächlich der Fall, SOD führt zu einer deutlichen Reduktion des „oxidative burst“ fMLP stimulierter PMN (*S. Szalay*). Das Signal der Chemilumineszenz wird im Assay mit durch fMLP aktivierte Neutrophile auf $29\% \pm 5,6$ ($p < 0,001$) reduziert. Dieses Phänomen beschreiben auch *Dahlgren* und *Takahashi*, haben allerdings auch keine endgültige Erklärung für die widersprüchliche Wirkung und vermuten eine direkte Beeinflussung der MPO-abhängigen und Luminol vermittelten Chemilumineszenz durch SOD (*Dahlgren 1987, Takahashi et al. 1991*). Dieses experimentelle Ergebnis, nämlich, daß SOD im Assay mit aktivierten PMN den „oxidative burst“ deutlich zu reduzieren vermag und eine Radikalfängerwirkung hat, ist Basis für die im Folgenden beschriebenen Experimente mit dem SOD-Inhibitor.

Werden die normoxischen Myozyten mit dem SOD-Inhibitor Diethyl-dithiocarbaminsäure präinkubiert, so verlieren sie die Fähigkeit, die von den aktivierten PMN freigesetzten Radikale „abzufangen“, was auf die Bedeutung des Radikalfängersystems (insbesondere SOD-System) von normoxischen Myozyten hinweist.

Die Abbildung 40 zeigt eine dosisabhängige Erhöhung des „oxidative burst“ mit steigenden Konzentrationen von SOD-Inhibitor (10^{-7} , 10^{-6} und 10^{-5} M) bei der Präinkubation von normoxischen Myozyten am Beispiel der Kinetikgraphik eines fMLP-Assays.

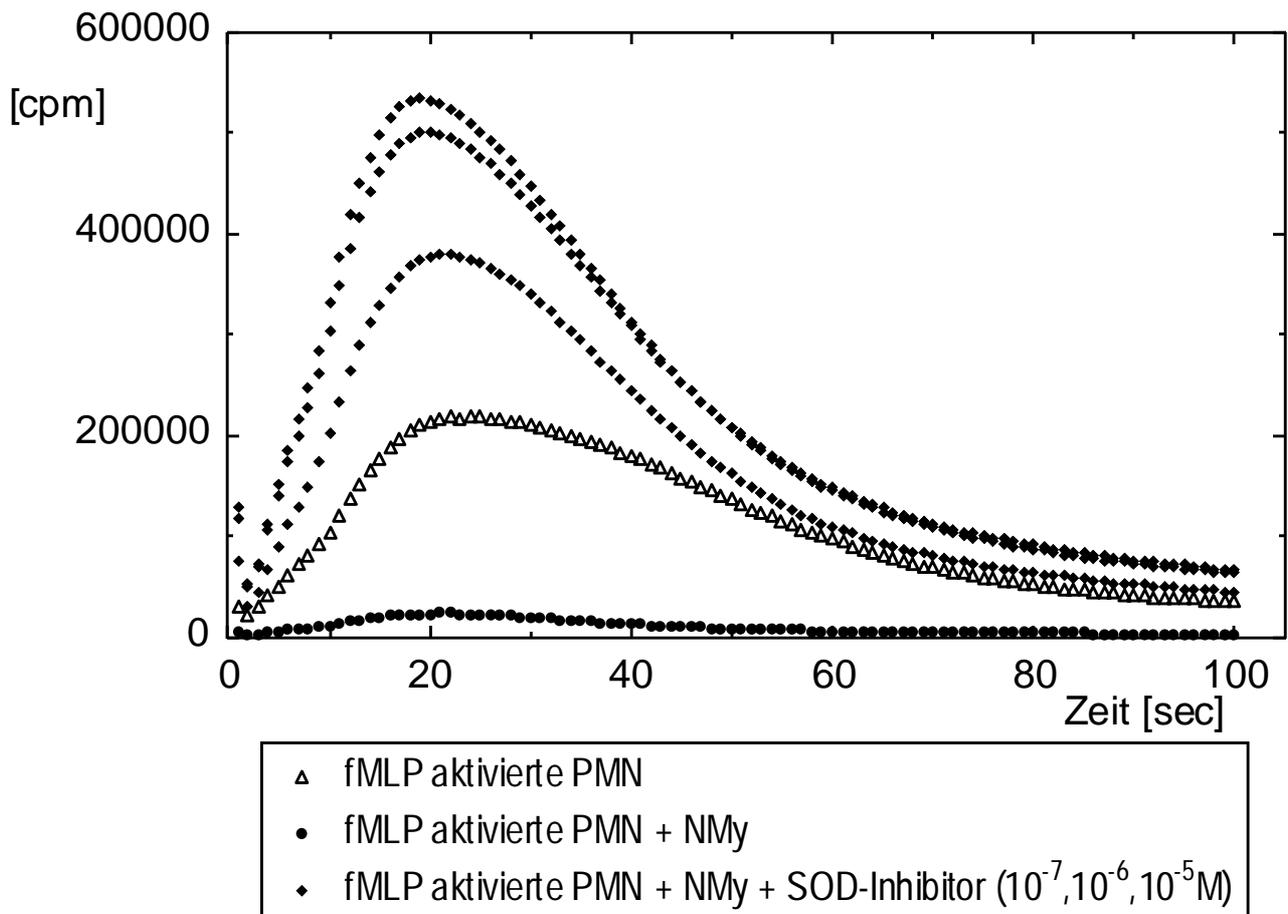
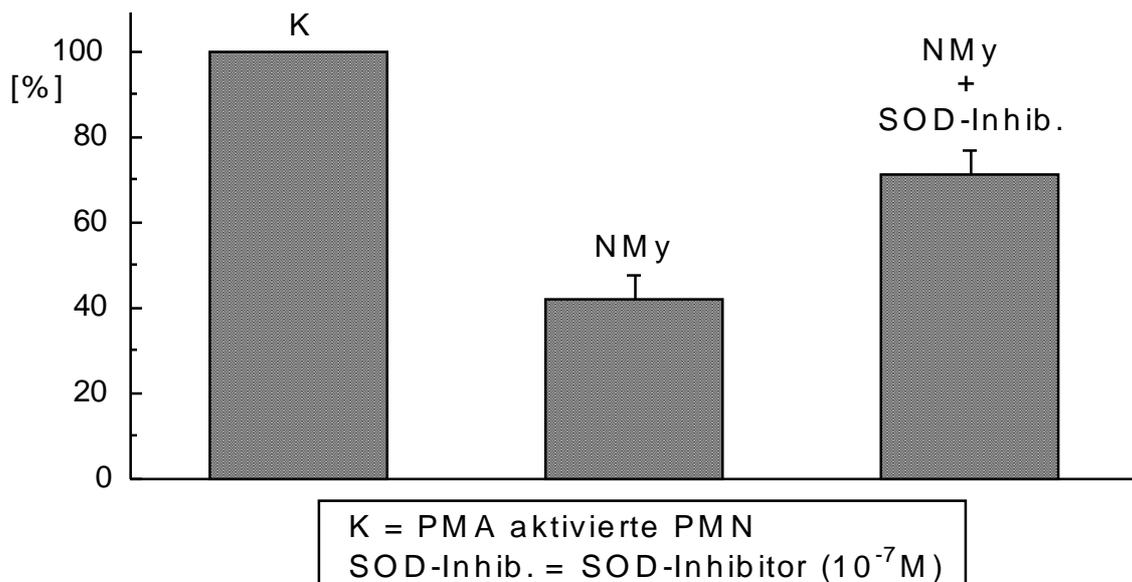
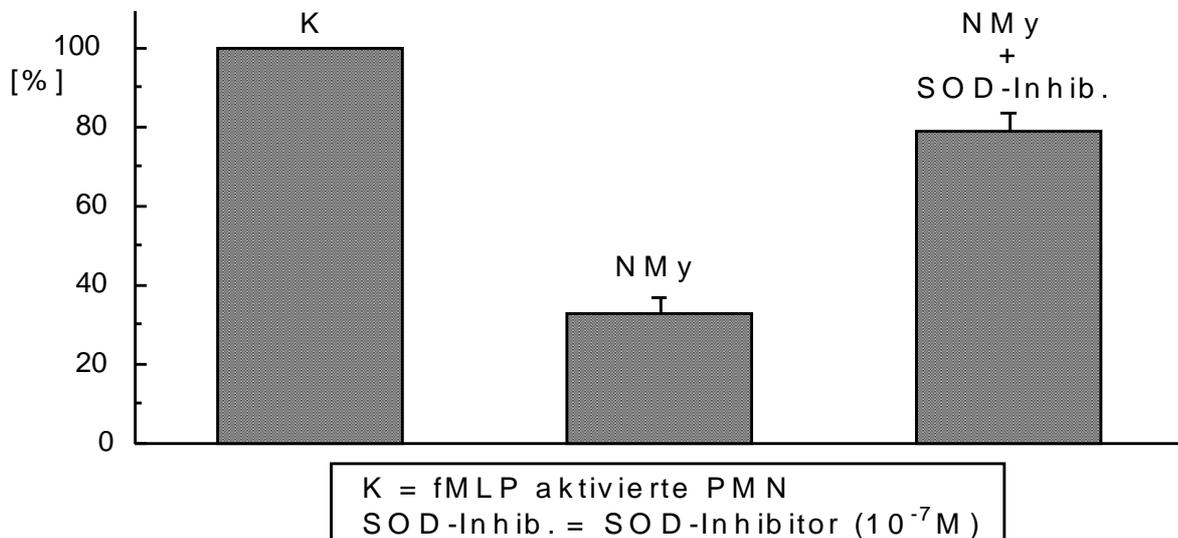


Abb. 40: Dosisabhängige Steigerung des „oxidative burst“ mit steigenden Konzentrationen von SOD-Inhibitor bei der Präinkubation von normoxischen Myozyten (NMy), (Kinetikgraphik am Beispiel von fMLP-aktivierten PMN)

Quantitativ sind diese Ergebnisse in den Abbildungen 41 und 42 zusammengefaßt. Der Einfluß des SOD-Inhibitors (10^{-7} M) bei der Präinkubation von normoxischen Myozyten im Assay mit fMLP ($0.1 \mu\text{M}$), bzw. mit PMA (200 nM) als Aktivator:



Nr.	Bezeichnung	Mean	Stand. Error	Vergleich	Equal-Variance	Aspin Welch	N	Stand. Error of Mean
1	fMLP: NMy	32,8	4,5				8	1,59
2	fMLP: NMy + SOD-inhib.	78,7	5,2	1-2 > 0	p < 0,001	p < 0,001	8	1,83
3	PMA: NMy	42	5,8				9	1,93
4	PMA: NMy + SOD-inhib.	71	5,9	3-4 > 0	p = 0,003	p = 0,003	9	1,96

Abb. 41a, 41b und 42: Die Wirkung von Diethylthiocarbamat auf die Interaktion von anoxischen (AMy) und normoxischen Myozyten (NMy) im Assay mit fMLP (41a) und PMA (41b) aktivierten PMN, dargestellt als Histogramm sowie statistische Auswertung in tabellarischer Form (Abb. 42), Kontrolle dient das Signal von fMLP bzw. PMA aktivierten PMN

4.11.2. Der Einfluß des SOD-Inhibitors in der Co-Kultur

Werden kultivierte normoxische Herzmuskelzellen mit dem SOD-Inhibitor Diethyldithiocarbaminsäure (10^{-6} M) vorbehandelt und danach mit fMLP aktivierten PMN inkubiert, so überstehen sie die Co-Kultur deutlich schlechter, als normoxische Myozyten. Ein wesentlich höherer Prozentsatz nimmt von den SOD-Inhibitor behandelten Myozyten nach 24h-Co-Kultur mit aktivierten PMN Trypanblau auf, wie es die folgenden Photos (Abbildung 43 und 44) zeigen.

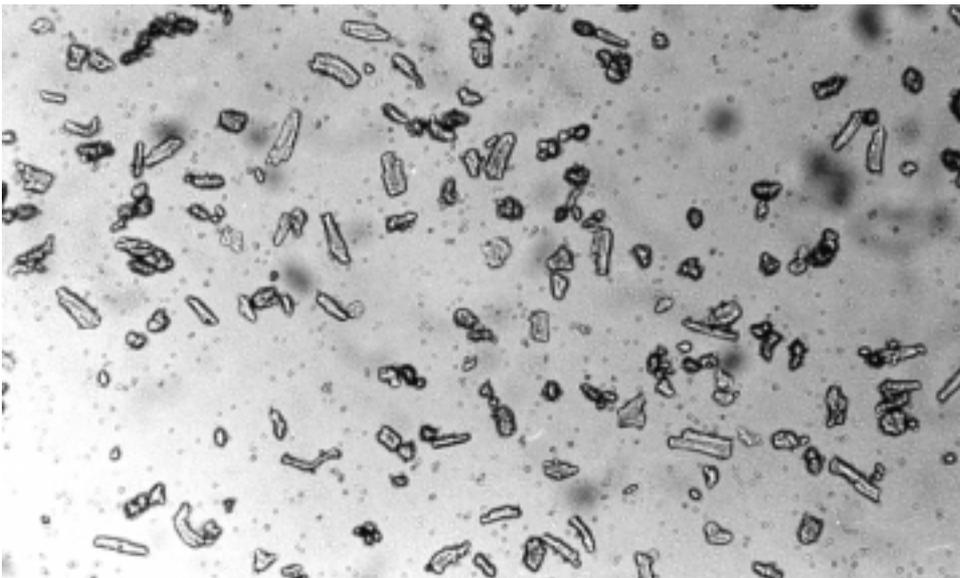


Abb. 43: Normoxische Myozyten mit aktivierten PMN nach 24h, 100fache Vergrößerung, keine Färbung

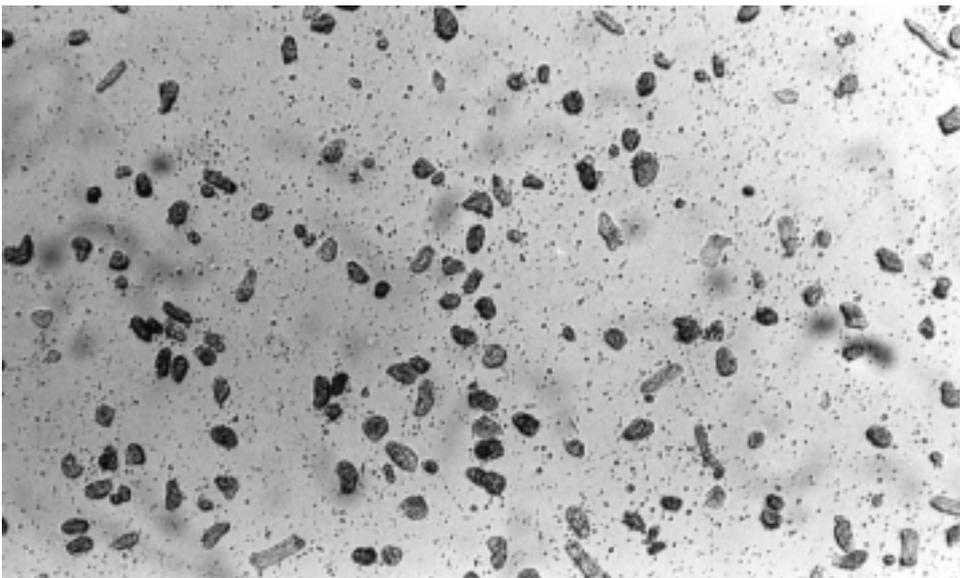


Abb. 44 Mit SOD-Inhibitor präinkubierte normoxische Myozyten mit aktivierten PMN nach 24h, 100fache Vergrößerung, keine Färbung

5. Diskussion

5.1. Auswahl der Methoden

Mit der nach *Piper* beschriebenen Methode der Isolierung und Kultivierung von Herzmuskelzellen erhält man eine hochreine Myozytenkultur nach dem „Rapid-Attachment-Modell“ (*Piper 1990*). Der Percoll-Zentrifugierungsschritt während der Isolation und die Verwendung von Medium mit 4% FKS während der ersten 2h der Zellkultur separiert intakte Myozyten von Zelltrümmern, beschädigten Zellen oder Nicht-Myozyten. Die Myozyten, die in die Biolumineszenzmessung eingehen, haben eine Kultivierung von maximal 12h hinter sich, so daß man Effekte, die insbesondere in der Langzeit-Kultur zum Tragen kommen, ausschließen kann. Das Überwuchern von Nicht-Myozyten oder auch das Phänomen des Zell-„spreadings“ in der Langzeitkultur könnte die Wechselwirkungen von Myozyten und PMN während der Messung beeinflussen.

Die Verwendung von maximal 12h kultivierten und adhärenen Kardiomyozyten kommt der in-vivo-Situation am nächsten, denn die Zellen behalten (meist über drei Tage) ihre typische Morphologie und die Adhäsion der Myozyten an Laminin wird erst sehr kurz vor der Messung durch mechanisches Abschaben beendet. Die mechanische Methode mit dem Zellschaber ist hierbei wesentlich schonender als die Behandlung der Zellen mit Trypsin zum Lösen der Adhäsion.

Zur Erzeugung von anoxischen Bedingungen wurde das Gas-Pack-Plus-System von Becton-Dickinson gewählt. Die Vorteile liegen darin, daß die Anoxie durch den Entzug von Sauerstoff erreicht wird mit der Entwicklung von 5% CO₂, und nicht durch Verdrängung des Sauerstoffs durch Einbringung von unphysiologischen Gaskonzentrationen (z.B. 100% Stickstoff). Die Benutzung des Gas-Pack-Plus-Systems ermöglicht die Realisierung einer Anoxie mit geringem experimentellen Aufwand und ergänzt sich mit den gewählten Kulturbedingungen. So erzeugen z.B. PH-Verschiebungen infolge der Stoffwechsellumstellung auf die anaerobe Glykolyse mit dem Endprodukt Laktat während der Anoxie eine metabolische Azidose, welche der in-vivo vorherrschenden Situation bei der Ischämie recht nahekommt.

Die Isolierung der neutrophilen Granulozyten der Ratte gelingt mit den beschriebenen Methoden auf eine schonende Weise, so daß eine Aktivierung der PMN während der Reinigung vermieden werden kann. Die Reinheit der isolierten PMN-Fraktion wurde mehrmals durch Färbung und anschließende Zelldifferenzierung im Mikroskop überprüft und beträgt zwischen 90 und 95%.

Als Aktivatoren des „oxidative burst“ bieten die Stoffe fMLP, PMA und Zymosan eine unterschiedliche Kinetik und Wirkungsweise. Die verwendeten Substanzen erzeugen ein gut detektierbares Biolumineszenzsignal und eine reproduzierbare Kinetikkurve. Die Wirkung auf die Neutrophilen ist zum einen sehr spezifisch (und geschieht bei fMLP und Zymosan über spezielle Rezeptoren), und ein Effekt auf die im Assay enthaltenen Myozyten ist nicht zu beobachten. Auch in der Zellkultur erweisen sich die Substanzen in den angewandten Konzentrationen als nicht toxisch für die Myozyten.

Als Pufferlösung während der Biolumineszenzmessung erscheint Hanks-Puffer am geeignetsten, da die Interaktion zwischen PMN und Myozyten unbeeinflusst bleibt, und der „respiratory burst“ als Signal gut erfaßbar ist.

Die Wechselwirkungen zwischen stimulierten PMN und Myozyten werden im Biolumineszenzassay aus der Freisetzung der freien Radikale abgeleitet. Freie Radikale sind Sauerstoffradikale-Spezies, die leicht durch Membranen diffundieren durch die Luminol-Reaktion als Lichtsignal zu messen sind.

Die Wahl beider Zellpopulationen aus derselben Spezies ermöglicht es, evtl. Interaktionen zwischen anoxischen Myozyten und neutrophilen Granulozyten in einen direkten Zusammenhang zu bringen und auf eine adäquate Situation in-vivo zu übertragen.

Einräumend muß man feststellen, daß die im in-vitro-Modell konstruierte Situation nicht uneingeschränkt auf die Verhältnisse in-vivo zu übertragen ist. So ist das in der Biolumineszenzmessung verwendete Verhältnis von PMN : Myozyten von 10 : 1 zwar geeignet, klare Sachverhalte im Experiment herauszuarbeiten, ist aber in-vivo sehr unphysiologisch und würde eine massive Entzündungsreaktion bedeuten, wie sie im Myokard kaum vorkommt. Ein solches Verhältnis setzt eine massive Einwanderung der PMN ins Myokardgewebe voraus, wie sie z.B. bei einer akuten Entzündungsreaktion oder bei einem Myokardinfarkt kaum zu finden wäre. Eine weitere Schwierigkeit ist es, den Zustand der Myozyten mit dem Lichtmikroskop nach der Anoxie zu beurteilen und reversibel oder irreversibel geschädigte Myozyten zu definieren. Als Kriterium, daß es sich um eine reversible Zellschädigung durch die Anoxie handelt, wird die „Nicht-Anfärbbarkeit“ mit Trypanblau gewählt. Dieses lichtmikroskopisch dann einfache entscheidende Merkmal erscheint geeignet, um nach der Anoxie den Zustand der Myozyten zu beurteilen. Aus den Ergebnissen ergibt sich, daß der Anteil der Zellen, die sich mit Trypanblau anfärben lassen, in der Kultur der 12h kultivierten anoxischen Myozyten nicht größer ist als der Anteil der abgestorbenen Zellen in der entsprechenden normoxischen Kultur. Allerdings werden wahrscheinlich die 12h anoxischen Myozyten durch die Anoxie reversibel geschädigt, was sich dann zu einem späterem Zeitpunkt durch z.B. zusätzliche „Streßfaktoren“ (wie beispielsweise die aktivierten PMN oder die Bedingungen einer Langzeitkultur) ausgelöst, in einem verstärkten Zelluntergang manifestiert. So überstehen die der Anoxie ausgesetzten Myozyten die Langzeitkultur deutlich schlechter, erst recht wenn sie mit aktivierten neutrophilen Granulozyten in Kontakt kommen.

5.2. Interpretation und Kritik der Ergebnisse

5.2.1. Unterschiedliche Wirkungsweisen der eingesetzten Stimuli (fMLP, PMA und Zymosan) führen zur Aktivierung der NADPH-Oxidase

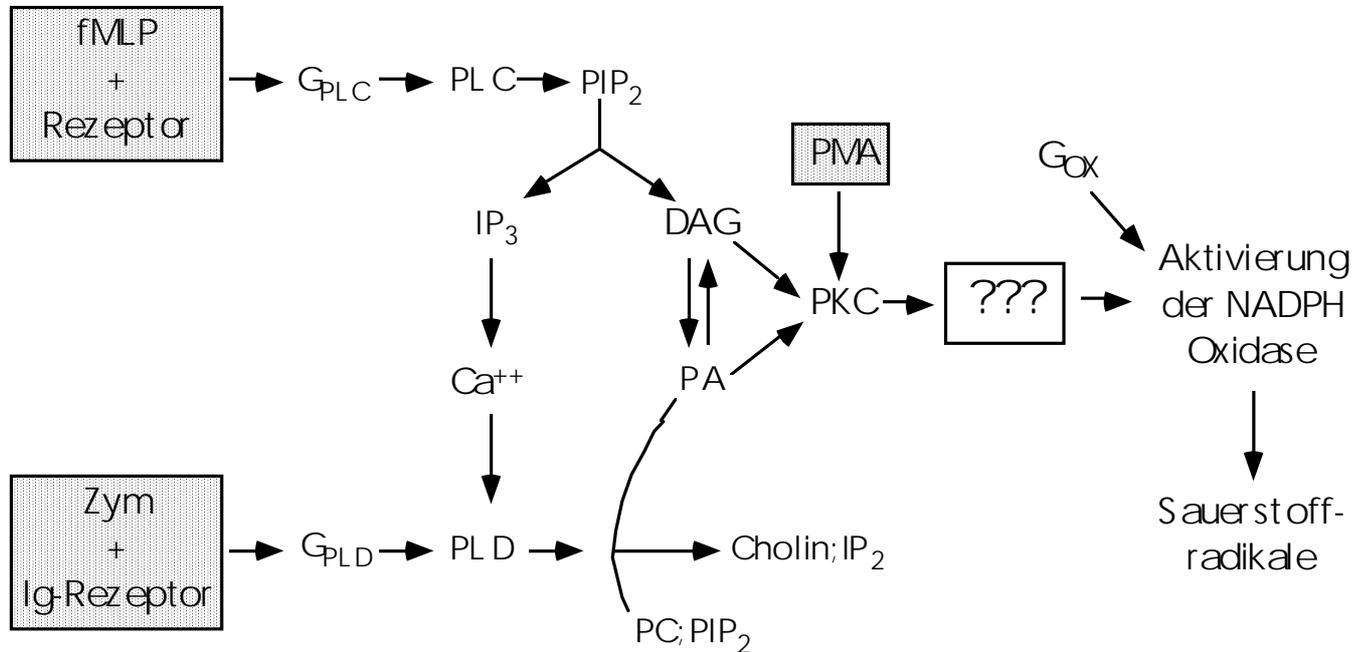
Vergleicht man die Kinetik des „oxidative burst“ bei Einsatz verschiedener Stimuli (fMLP, PMA und Zymosan), so liegt die Vermutung nahe, daß unterschiedliche Mechanismen letztlich zur Aktivierung der NADPH-Oxidase führen (*Wymann et al. 1987*). Die durch Messung der freien Radikalbildung im Biolumineszenzautomat erhaltene Kinetik unterscheidet sich abhängig von dem eingesetzten Stimulus grundsätzlich in Bezug auf „Onset-time“ (Startzeitpunkt der Reaktion), Maximum und Dauer des Signals: Der „burst“ durch fMLP-stimulierte PMN ist charakterisiert durch ein frühes Maximum der freien Radikalbildung bei ca. 20 Sekunden, während durch PMA bzw. Zymosan Maxima bei 5 und 15 Minuten erreicht werden, wie es die Kinetiken in Abbildung 8 bis 10 verdeutlichen. Das Signal durch PMA-Stimulation erreicht ein späteres Maximum bei ca. 5 Minuten und erstreckt sich über eine Meßzeit von 60 Minuten. Durch Zymosan erscheint das Maximum des „respiratory burst“ vergleichsweise spät bei ca. 15 Minuten und überdauert 120 Minuten. Die Verschiedenartigkeit der Kinetik des „oxidative burst“ durch fMLP, PMA bzw. Zymosan stimulierte PMN bestärkt die postulierte Hypothese von unterschiedlichen Wirkungsweisen der aktivierenden Substanzen auf die NADPH-Oxidase.

Für das Oligopeptid fMLP wurde auf der Zelloberfläche der neutrophilen Granulozyten ein entsprechender Rezeptor gefunden (*Smolen 1992*). Auch opsonisiertes Zymosan bewirkt durch einen Oberflächenrezeptor (Ig-Rezeptor) die Aktivierung einer „second messenger“-Kaskade, welche dann in der Aktivierung der NADPH-Oxidase der PMN gipfelt (*Zeller et al. 1992*). Für PMA dagegen ist kein Rezeptormechanismus bekannt, es ist wahrscheinlich, daß PMA durch die Zellmembran penetriert und einen direkten Einfluß auf ein Schlüsselenzym der Aktivierungs-Kaskade, nämlich auf die Protein Kinase C (PKC), ausübt (*Cockcroft 1992*).

Bruchstücke der Reaktionswege der eingesetzten Stimuli sind bereits erforscht, aber der Mechanismus, wie sie letztlich die NADPH-Oxidase aktivieren, ist noch unklar.

Folgendes Modell veranschaulicht die Reaktionen und Interaktionen von fMLP, PMA und Zymosan mit den Neutrophilen:

Abb. 33



Modell der Wirkungsweise von fMLP, PMA und Zymosan auf neutrophile Granulozyten

fMLP ist ein Oligopeptid und ist aus drei Aminosäuren zusammengesetzt. Für fMLP existiert ein spezifischer Rezeptor auf der Oberfläche der neutrophilen Granulozyten (English 1992), der durch ein G-Protein (G_{PLC}) die Phospholipase C (PLC) zur Spaltung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) in Inositoltriphosphat (IP_3) und Diacylglycerol (DAG) aktiviert. DAG aktiviert die Proteinkinase C (PKC), die über einen Phosphorylierungsmechanismus Enzyme aktiviert, und am Ende dieses Reaktionsweges steht die Aktivierung der NADPH-Oxidase über einen noch unbekanntes Mechanismus. fMLP ist in der Lage, alle drei Phospholipasen (C, D und A_2) zu aktivieren. IP_3 mobilisiert Kalzium (Ca^{++}), welches die Ca^{++} -abhängige PLD anschalten kann. DAG ist das Produkt der Wirkung der PLC auf PIP_2 , oder es entsteht aus Phosphatidsäure (PA, welches durch PLD-vermittelte Hydrolyse von Phosphatidylcholin (PC) in Cholin und PA entsteht) durch Dephosphorylation, katalysiert durch die PA-Phosphohydrolase.

PMA ist ein direkter Aktivator der Proteinkinase C. PMA durchdringt die Zellmembran und kann intrazellulär unmittelbar die Proteinkinase C aktivieren.

Zymosan ist ein Zuckermolekül, an welches durch ein bestimmtes Verfahren Immunglobuline gebunden werden können (siehe Abschnitt 7.1.2.4.c). Ein so durch Immunglobuline opsonisiertes Zymosanmolekül kann sich nun an die Fc-Rezeptoren auf der PMN-Oberfläche binden und über einen „second messenger“-Weg, indem ein G-Protein und die Phospholipase D eingeschaltet sind, schließlich auch die Proteinkinase C aktivieren.

Die Zellantwort auf den dargebotenen Stimulus ist der detektierte H_2O_2 -„burst“, aber auch andere Funktionen der PMN wie Adhärenz, Aggregation, Chemotaxis, Exozytose von spezifischen Granula und letzten Endes die Phagozytose können stimulusabhängig die Folge der Aktivierung sein (Vlahos *et al.* 1992). Während der Biolumineszenzmessung wird lediglich die H_2O_2 -Produktion als Antwort auf den Stimulus erfaßt. Die anderen zellulären Folgen der Aktivierung von PMN durch einen in-vitro dargebotenen Stimulus spielen aber sicher auch eine Rolle in der Co-Kultur von Myozyten und aktivierten Neutrophilen und bestimmen das Überleben der Kardiomyozyten. Insbesondere Adhärenz und Aggregation lassen sich lichtmikroskopisch gut in der Co-Kultur verfolgen.

5.2.2. Abschließende Bemerkungen über die für die Interaktion wesentlichen Aspekte

Die zusammenfassende Betrachtung der Ergebnisse der Biolumineszenzmessungen zeigt, daß normoxische Myozyten bei allen drei verschiedenen Stimuli den „oxidative burst“ der aktivierten PMN zu reduzieren vermögen. Es wird angenommen, daß normoxische Myozyten in der Lage sind, die von den stimulierten PMN gebildeten Radikale abzufangen. Ein zelluläres Radikalfänger-System der Myozyten wird postuliert, wofür auch die Resultate mit den, durch den SOD-Inhibitor Diethyldithiocarbamat präinkubierten, normoxischen Myozyten im Assay sprechen. Die mit dem SOD-Inhibitor vorbehandelten Myozyten verlieren weitgehend ihre Fähigkeit, die gebildeten Sauerstoffradikale abzapuffern, was die Bedeutung dieses endogenen Radikalfänger-Systems der Myozyten unterstreicht. Die Wirkung von SOD auf die Luminol vermittelte Chemilumineszenz (LCL) im Assay mit aktivierten PMN ist kritisch zu sehen (siehe Erläuterungen im Abschnitt 4.11.1: Untersuchungen am SOD-System der Myozyten). Die Ergebnisse bezüglich der Reduktion des Signals durch SOD (S. Szalay 1997) sind Basis für die Untersuchungen am Myozytensystem mittels SOD-Inhibitor. Vergleichbare Ergebnisse erzielten Dahlgren und Takahashi in ihren Abhandlungen (Dahlgren *et al.* 1987 und Takahashi *et al.* 1991). Die mikroskopischen Beobachtungen während der Co-Kultur (Myozyten und aktivierte PMN) korrelieren mit den im Biolumineszenzassay gewonnenen Ergebnissen und unterstützen die Relevanz eines intakten zellulären Radikalfängersystems (insbesondere des SOD-Systems) für das Überleben der Myozyten in der Co-Kultur mit aktivierten PMN (siehe Abschnitt 4.11.2.).

Die Steigerung des „oxidative burst“ der aktivierten PMN in Anwesenheit von anoxischen Myozyten ist bei allen drei eingesetzten Stimuli zu erkennen. Durch Experimente mit dem anoxischen Inkubat, dem reoxygenierten Inkubat und der vom Inkubat separierten anoxischen Zellen wird deutlich, daß die Ursache der zusätzlichen Aktivierung bei den Zellen selbst zu suchen ist. Eine längerdauernde

Anoxie bringt sogar morphologische Veränderungen mit sich, die man schon lichtmikroskopisch an einer Hyperkontraktion der Sarkomere erkennen kann. Eine Reihe anderer Folgen der Anoxie sind durch biochemische Analysen feststellbar. Die Myozyten erfahren eine Stoffwechsellage auf die weniger effektive anaerobe Glykolyse, die als Endprodukt Laktat und einen pH-Umschlag zum azidotischen Milieu zur Folge hat. Es wird postuliert, daß während der anoxischen Bedingungen das endogene Radikalfänger-System der Myozyten Schaden nimmt oder nicht mehr als Radikalfänger funktionieren kann. Ein so durch die Anoxie beschädigter Myozyt kann die Radikalengeneration der im Experiment aktivierten PMN nicht mehr genügend abpuffern, so daß die gebildeten Sauerstoffradikale nun ungehindert im ursprünglichen Ausmaß während der Messung erfaßt werden. Die Gesamtheit der gebildeten Sauerstoffradikale kann nun wiederum ungehindert die schon durch die Anoxie geschädigten Zellen attackieren und den Zelluntergang beschleunigen, wofür auch die Experimente in der Zellkultur sprechen. Die Aktivierung der PMN durch anoxische Myozyten übertrifft allerdings die Radikalproduktion die man erhält, wenn man nur den Stimulus (fMLP, PMA oder Zymosan) im Experiment benutzt. Das bedeutet, daß zusätzlich zu den verwendeten Stimuli ein aktivierender Effekt von den anoxischen Myozyten ausgehen muß, um die massive Steigerung der Radikalproduktion zu erklären.

Die Sauerstoffradikalgeneration ist also nicht alleine durch den Defekt im endogenen Radikalfängersystem der anoxischen Myozyten zu erklären, sondern zusätzliche zelluläre Veränderungen (etwa die Modifikation der Zelloberfläche bzw. des Rezeptorstatus der anoxischen Herzmuskelzellen) müssen während der Anoxie der Kardiomyozyten stattgefunden haben, welche die neutrophilen Granulozyten zu solcher Radikalproduktion veranlassen können.

Die Experimente mit den mit Neuraminidase präinkubierten Myozyten belegen, daß sich die PMN durch so vorbehandelte und veränderte Zellen zu einer erhöhten freien Radikalfreisetzung stimulieren lassen. Das wird insbesondere bei den normoxischen Myozyten deutlich, die nach Inkubation mit Neuraminidase die Fähigkeit verloren haben, den „respiratory burst“ abzufangen und sogar noch im Vergleich zum Kontrollwert zusätzlich aktivieren können. Auch die anoxischen Myozyten erfahren durch die Neuraminidase-Behandlung eine zusätzliche Steigerung in der stimulierenden Wirkung auf die Neutrophilen. Die neutrophilen Granulozyten lassen sich also additiv aktivieren, werden dem Assay Neuraminidase vorbehandelte Myozyten zugesetzt, die eine veränderte Zelloberfläche aufweisen. In der Co-Kultur mit aktivierten PMN sind die Neuraminidase präinkubierten normoxischen Myozyten den attackierenden PMN stärker ausgesetzt und überleben im Vergleich zur Kontrollkultur viel schlechter.

Die Membranfraktionen von Myozyten im Assay vermögen das Signal im Vergleich zur Kontrolle zu reduzieren, im Falle der Membranfraktion von normoxischen Myozyten auf ca. 63% und im Falle der anoxischen Myozyten auf ca. 85%. Dieser Effekt ist wohl durch die unspezifische Wirkung von biologischen Membranen zu erklären, mit deren Fähigkeit, Radikale durch Oxidation abzufangen. Daß die Membranfraktion der normoxischen Myozyten nicht mehr in dem Maße in der Lage ist, verglichen mit intakten normoxischen Herzmuskelzellen, den „burst“ aktivierter PMN abzufangen, kann auf eine Beeinträchtigung des endogenen

Radikalfängersystems, das normalerweise eingebunden oder locker assoziiert mit der Zellmembran vorliegt, hinweisen. Das Versagen des endogenen Radikalfänger-Systems ist wahrscheinlich durch Zellhomogenisierung und anschließende Separation der Membranfraktion in der Zentrifuge bedingt.

Die während der Beobachtung der Co-Kultur gewonnenen Erkenntnisse (insbesondere was das Überleben von normoxischen, anoxischen, mit SOD-Inhibitor und Neuraminidase vorbehandelten Herzmuskelzellen betrifft) decken sich mit den Ergebnissen der Biolumineszenzmessung. Zusätzlich ist es möglich in der Co-Kultur die Interaktion von aktivierten PMN mit Myozyten über einen größeren Zeitraum (hier von einem bis zu sechs Tagen) zu beobachten. Die Kriterien, die hierbei in die zusammenfassenden Ergebnisse eingingen waren hauptsächlich das Verhältnis von vitalen zu abgestorbenen Zellen in der jeweiligen Kultur. Nebenbei lassen sich auch physiologische Phänomene wie Adhärenz der PMN, Aggregation und Chemotaxis der Neutrophilen an beschädigte Myozyten verfolgen.

5.3. Ausblick

Für die weitergehende Interpretation der Interaktion von PMN und anoxischen Myozyten ist es wichtig zu untersuchen, welcher Mechanismus in-vivo die größte Bedeutung für die Aktivierung der PMN haben könnte. Das heißt, welche Veränderungen während der Ischämie des betreffenden Herzmuskelbezirkes könnte zur Emigration der PMN ins ischämische Gewebe und zur Aktivierung der Neutrophilen führen? Weiterhin ist es von großem Interesse nach Möglichkeiten zu suchen, die Aktivierung der PMN zu verhindern oder abzumildern, oder die Folgen für das Gewebe (Myokard) einzudämmen. Dies bedeutet, nach geeigneten Substanzen zu forschen, die den „respiratory burst“ in Anwesenheit von anoxischen Myozyten unterdrücken und so das Überleben der anoxischen Myozyten in Gegenwart von aktivierten neutrophilen Granulozyten verbessern können.

6. Zusammenfassung

Rattenmyozyten werden durch Perfusion mit Kollagenaselösung im Langendorffmodell isoliert. Die Myozyten werden 2h bzw. 12h anoxisch inkubiert. Eine 90% reine PMN-Fraktion wird aus Rattenblut durch Leukozytenauftrennung im Dichtegradienten gewonnen. Durch unterschiedliche Stimuli wird der „oxidative burst“ der PMN erzeugt und die freie Radikalbildung im Auto-Lumat LB 953 als Biolumineszenzsignal detektiert. PMN werden durch N-formyl Met-Leu-Phe (fMLP) mit seinem Maximum der freien Radikalbildung in den ersten 20 Sekunden,

Phorbolmyristatazetat (PMA) und Zymosan (Zym) mit ihren Maxima bei 5 bzw. 20 Minuten aktiviert. Der „respiratory burst“ der stimulierten polymorphkernigen Neutrophilen ist in Anwesenheit von normoxischen Myozyten abgeschwächt. Das Signal erhöht sich in Anwesenheit von 2h bzw. 12h anoxischen Myozyten im Vergleich zu normoxischen deutlich bzw. massiv. Normoxische Herzmuskelzellen werden nicht durch gebildete Sauerstoffradikale aktivierter PMN attackiert und überstehen die Co-Inkubation in der Zellkultur entsprechend gut, während bei anoxischen Kardiomyozyten die freie Radikalbildung mit der Anoxiedauer korreliert. Die Überlebenszeit der anoxischen Kardiomyozyten in der Co-Kultur mit aktivierten PMN nimmt abhängig von der Anoxiedauer der Myozyten drastisch ab. Mit einem SOD-Inhibitor vorbehandelte normoxische Myozyten verlieren ihre Fähigkeit die Radikale abzapfen und sterben viel eher in der Co-Kultur ab im Vergleich zu normoxischen Myozyten ohne Präinkubation. Damit nähern sie sich in ihrem Verhalten während der Radikalmessung von aktivierten PMN dem der anoxischen Myozyten an, wobei sie aber nicht ganz die Sauerstoffradikalbildung der anoxischen Myozyten erreichen. Neben dem SOD-System der Myozyten spielen aber wahrscheinlich Oberflächenveränderungen während der Anoxie eine zusätzliche Rolle.

Durch Neuraminidase vorbehandelte Myozyten erzeugen einen Anstieg der Radikalproduktion und damit einen gesteigerten „respiratory burst“ der aktivierten PMN. Die aus den Experimenten gewonnenen Messergebnisse des Biolumineszenzassays und die Beobachtungen aus der Zellkultur weisen daraufhin, daß einerseits das endogene Radikalfängersystem der Myozyten Schaden nimmt, so daß die gebildeten Radikale nicht mehr eliminiert werden können, bevor sie Zellschäden verursachen können, und andererseits auch die veränderten Oberflächenstrukturen der Myozyten die aktivierten PMN zu einer höheren Radikalproduktion anregen. Beide Komponenten bewirken dann unter anderem die kurze Überlebenszeit der anoxischen Myozyten im Kontakt mit aktivierten PMN.

Die Ergebnisse deuten darauf hin, daß bei der Reperfusion und Reoxygenierung des Myokards, mit dem Blut PMN eingeschwemmt werden, welche nach Aktivierung im Gewebe die reversibel geschädigten, ischämischen Myozyten durch die Produktion von freien Sauerstoffradikalen schädigen können.

7. Anhang

7.1. Material

7.1.1. Chemikalien und Material

- Wistar Ratten 150 g und 250 g: Süddeutsche Tierzuchtanstalt, Stuttgart
- Kollagenase „Worthington“ Typ CLS II: Biochrom, Berlin
- Dispase (Grad 1): Boehringer, Mannheim
- CR-Laminin, ECGS: Colaborative Resarch Incorporation, Bedford, USA
- L-Glutamin, myoklonales fötales Kälberserum, Medium 199 mit Hanks-Salz mit 0.35 mg/l NaHCO₃, Natrium-pyruvat, Nicht-essentielle Aminosäuren (Nicht-ess AS, 100-fach), Penizillin/Streptomycin (Pen/Strept., 10 000 U/10 000 µg), MEM Vitaminlösung (100-fach): Gibco, Schottland
- Adenin, Allopurinol, BSA (Bovine Serum Albumine = Rinderserumalbumin) Fraktion V (frei von Fettsäuren), Kreatin, fMLP (N-formyl Met-Leu-Phe), Diethyldithiocarbaminsäure, Gelatine, Harnsäure, Heparin-Natriumsalz, N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethansulfonsäure (HEPES), Insulin, Kaliumchrom III - sulfat, Luminol (5-Amino-2,3-Dihydro-1.4-Phtalazinedion), Meerettich-Peroxidase (HPO) Typ I, PMA (Phorbol-12-Myristat-13-Azetat), Natriumpyruvat (Typ II), D-Ribose, Taurin, Trypsin, Zymosan A (von *Saccharomyces cerevisiae*): Sigma, Deisenhofen
- Dimethylsulfoxid (DMSO), Natriumazid, Neuraminidase (aus *Vibrio comma Cholera*): Merck, Darmstadt
- Gas Pak Plus TM, Methylenblau-Indikatorstäbe: Becton und Dickinson, USA
- Carbogen (95% O₂, 5% CO): Messer, Griesheim
- Percoll: Pharmacia, Schweden
- Nylonnetze (200 µM Maschenweite): ZBF, Rüschnikon, Schweiz
- Sterifilter (Sterifex GV 0.22 µM): Millipore, Frankreich

- Kuturschalen (Falcon 3003, 78, 2 cm²), sterile Zentrifugenröhrchen (Blue Max 50 ml, Falcon 2070, 15 ml): Becton und Dickinson, Lincoln Park, USA
- Trypanblau: Biochrom, Berlin
- Einmal-Zellschaber, sterile Einmalpipetten, 1, 2, 5, 10, 25 ml: Costar, USA
- Autolumat LB 953: Berthold, Wildbad
- Messröhrchen, 5 ml (75 x 12 mm Durchmesser): Sarstedt
- Einmalspritzen (20 und 2 ml): Braun, Melsungen

Alle übrigen Chemikalien sind von höchstem Reinheitsgrad und werden von den Firmen Merck, Darmstadt und Sigma, Deisenhofen bezogen.

7.1.2. Lösungen und Puffer

Lösungen und Puffer werden bereitete und anschließend steril filtriert.

7.1.2.1. Lösungen und Puffer zur Myozytenisolation

Krebs-Henseleit-Medium (KHM):

siehe *Piper 1990*

Hepes Earlsalz-Lösung (HES)

siehe *Piper 1990*

Kollagenase Lösung

40 ml KHM mit 0.012% w/v Trypsin, 0.012% w/v Dispase, 200 U/ml Kollagenase Typ D und BSA bis zu einem Gesamtproteingehalt von 0.27% w/v, 20 µl CaCl₂ (50 mmol).

Laminin-Lösung

10 µg Laminin pro 1 ml Medium 199, aliquotiert und bei -20 Grad Celsius eingefroren. Die Kulturschalen werden vor der Zellkultivierung der Myozyten, mit Laminin 25 µg/ml Medium 199 beschichtet und für 2h im Brutschrank bei 37 Grad Celsius inkubiert.

EARL-Salz

siehe *Piper 1990*

HEPES-Lösung (20fach)

500 mM HEPES; 2 g Albumin in 100 ml Puffer (pH: 7.2).

Percoll-Gradient 18 (90% Percoll)

63.5 ml Percoll
3.5 ml HEPES
3.5 ml EARL-Salz

Percoll-Gradient M (Myozyten)

8.5 ml Percoll 18
11.5 ml HES

Insulin

1 mg/ml Insulin-Lösung wird mit 100 ml Medium 199 versetzt, aliquotiert bei -20 Grad Celsius aufbewahrt.

iFKS (inaktiviertes fötales Kälberserum)

FKS wird im Wasserbad auf 37 Grad Celsius erwärmt und anschließend für 30 Minuten auf 56 Grad Celsius erhitzt, aliquotiert und bei -20 Grad Celsius gelagert.

Medium der Myozyten

Das Medium 199 der Firma Gibco eignet sich zur Kultivierung adulter Kardiomyozyten, es ist eine Komposition aus folgenden Substanzen (Angaben in mg/L):

a) Salze		b) Aminosäuren		c) Vitamine		d) andere Komponenten	
CaCl ₂ *2 H ₂ O	185	DL-Alanin	50	Ascorbinsäure	0.05	Adeninsulfat	10
Fe(NO ₃) ₃ *9 H ₂ O	0.72	L-Arginin HCl	70	α-Tocopherol-phosphat	0.01	Adenin-5-triphosphat	1
KCl	400	Asparaginsäure	60	D-Biotin	0.01	Adenin-5-phosphat	0.20
KH ₂ PO ₄	60	DL-Cystein HCl	0.10	Calciferol	0.10	Cholesterol	0.20
MgSO ₄ *7 H ₂ O	200	L-Cystin	20	D-Ca ⁺⁺ -Pantothenat	0.01	2-Desoxy-D-Ribose	0.50
NaCl	80 000	Glutaminsäure	150	Cholinchlorid	0.50	D-Glukose	1000
NaHCO ₃	350	L-Glutamin	100	i-Inositol	0.05	Glutathion (reduziert)	0.05
Na ₂ HPO ₄	48	Glycin	50	Menadion	0.01	Guanin	0.30
		L-Histidin HCl *H ₂ O	21.80	Niacin	0.025	Hypoxanthin	0.30
		L-Hydroxyprolin	10	Niacinamid	0.025	Ribose	0.50
		DL-Isoleucin	40	para-Aminobenzoesäure	0.05	Natriumazetat *3 H ₂ O	83
		L-Lysin HCl	70	Pyreidoxal HCl	0.025	Thymin	0.30
		DL-Methionin	30	Riboflavin	0.01	Tween [®] 80 R	20
		Phenylalanin	50	Thiamin HCl	0.01	Uracil	0.30
		L-Prolin	40	Vitamin A	0.01	Xanthin	0.30
		DL-Serin	50	Folsäure	0.01		
		DL-Threonin	60	Pyridoxin HCl	0.025		
		DL-Tryptophan	20	Vitamin E	0.10		
		L-Tyrosin	40				
		DL-Valin	50				

Zur Vermeidung eventuell störender Effekte bei der Biolumineszenzmessung durch einen Farbstoff, wird möglichst von Beginn der Zellkultur an Medium 199 ohne den Indikator Phenolrot verwendet. Dem Medium wird folgendes zugesetzt:

a) Medium 199 ohne FKS

Medium 199	190 ml	(1:50)
MEM Vitamine	4 ml	
Insulin	2 ml	(10 µg/ml)
Pen/Strept	2 ml	(100 U bzw 100 µg/ml)
Nicht-ess.-AS	2 ml	(1:100)

b) Medium 199 mit 4% FKS

Medium 199	182 ml	(1:50)
IFKS	8 ml	
MEM Vitamine	4 ml	
Insulin	2 ml	(10 µg/ml)
Pen/Strept	2 ml	(100 U bzw 100 µg/ml)
Nicht-ess.-AS	2 ml	(1:100)

7.1.2.2. Lösungen und Puffer für die Isolation der Neutrophilen

Hanks-Puffer

Siehe: *Wymann et al. 1989*

Percoll-Dichtegradient

Nr	Dichtegrad	H ₂ O (ml)	NaCl (1.5 M)	Percoll (ml)
I	1.052	22	4 ml	14
II	1.063	18	4 ml	18
III	1.075	15	4 ml	21
IV	1.085	12	4 ml	24
V	1.100	7	4 ml	29

7.1.2.3. Lösungen zur Biolumineszenzmessung

Luminol-Lösung

Endkonzentration im Meßröhrchen mit 1 ml Volumen beträgt 0.01 mM. Eine 0.1 mM Luminollösung wird mit Hanks-Puffer und 0.2% DMSO angesetzt und vor Licht geschützt.

7.1.2.4. Lösungen und Substanzen zur Aktivierung der PMN

Verschiedene Substanzen sind in der Lage, Neutrophile zur Radikalproduktion anzuregen. Im in-vitro-Modell werden der Probe aktivierende Substanzen für PMN zugesetzt. Ein „oxidativer burst“ läßt sich so durch fMLP, PMA und Zymosan erzeugen. Die folgenden Angaben sind Endkonzentrationen und beziehen sich auf 1 ml Probenvolumen.

a) fMLP

Für fMLP beträgt die Konzentration 0.1 μ M in der Probe. fMLP ist in PBS mit 0.2% DMSO gelöst. Dem Assay wird 0.1 mM Natriumazid und 10 U horseradish Peroxidase (HPO = Meerrettich-Peroxidase), beides gelöst in Phosphatpuffer, zugegeben.

Phosphatpuffer (PBS)

b) PMA

PMA wird in einer Konzentration von 200 nM der Probe zugesetzt. PMA wird gelöst in DMSO und PBS, die Endkonzentration von DMSO sollte nicht über 0.2% liegen, da DMSO einen permeabilitätssteigernden Effekt auf biologische Membranen hat.

c) Zymosan

Zur Herstellung von opsoniertem Zymosan wird Zymosan in 10 ml FKS gelöst und 3 mal jeweils für 5 Minuten bei 2 000 g zentrifugiert. Nach Auflösen von Zymosan in frischem Rattenserum, welches die Immunglobuline enthält, wird das Suspensat 20 Minuten lang bei 37 Grad Celsius im Wasserbad geschwenkt. Durch diesen Vorgang binden sich die Immunglobuline an das hauptsächlich aus einem Zucker bestehenden Zymosanmolekül. Danach wird die Lösung noch zweimal mit 10 ml FKS 5 Minuten lang bei 2 000 g zentrifugiert. Gelöst in Puffer wird Zymosan in einer Konzentration von 0,5 mg/ml bei -20 Grad Celsius eingefroren.

8. Literatur

M. Baggiolini, A. Walz, S.L. Kunkel

Neutrophil-activating peptide-1/Interleukin 8, a novel cytokine that activates neutrophils

J. Clin. Invest., 84, 1045-1049, 1989

M. Baggiolini, F. Boulay, J.A. Badwey, J.T. Curnutte

Activation of neutrophil leukocytes: Chemoattractant receptors and respiratory burst
The FASEB Journal, 7, 1004-1010, 1993

C. Bengis-Garber, N. Gruener

Cross-talk between cAMP and formyl Met-Leu-Phe in human neutrophils:
Phosphorylation of a 52,000 molecular weight protein
Cellular Signalling, 4, 247-260, 1991

G. Berton, C. Laudanna, C. Sorio, F. Rossi

Generation of signals activating neutrophil functions by leukocyte integrins: LFA-1 and gp150/95, but not CR3, are able to stimulate the respiratory burst of human neutrophils

The Journal of Cell Biology, 116, 1007-1017, 1992

S. Cockcroft

G-protein-regulated phospholipases C, D and A₂-mediated signalling in neutrophils
Biochimica et Biophysica Acta, 1113, 135-160, 1992

B. N. Cronstein, L. Dagume, D. Nichols, A. J. Hutchison, M. Williams

The adenosine/neutrophil paradox resolved: Human neutrophils possess both A₁ and A₂ receptors that promote chemotaxis and inhibit O₂- generation, respectively

J. Clin. Invest., 85, 1150-1157, 1992

B. N. Cronstein, R. I. Levin, J. Belanoff, G. Weissmann, R. Hirschhorn

Adenosine: An endogenous inhibitor of neutrophil-mediated injury to endothelial cells
J. Clin. Invest., 78, 760-770, 1986

C. Dahlgren

Polymorphonuclear leukocyte chemiluminescence induced by formylmethionyl-leucyl-phenylalanine and phorbol myristate acetate: effects of catalase and superoxide dismutase

Agents-Actions, 21, 104-12, 1987

D. M. Danilenko, P. F. Moore, P. V. Rossitto

Canine leukocyte cell adhesion molecules (LeuCAMs): Charakterization of the CD11/CD18 family

Tissue Antigens, 40, 13-21, 1992

R. F. Dudley

Chemiluminescence immunoassay: An alternative to RIA
Laboratory medicine, 21, 216 pp., 1990

J. G. R. Elferink, B. M. de Koster, G. J. J. C. Boonen, W. de Priester

Inhibition of neutrophil chemotaxis by purinoceptor agonists
Archives internationales de Pharmacodynamie et de Thérapie, 317, 93-106, 1992

R. L. Engler

Free radical and granulocyte-mediated injury during myocardial ischemia and reperfusion
The American Journal of Cardiology, 63, 19E-23E, 1989

D. English

Involvement of phosphatidic acid, phosphatidate phosphohydrolase, and inositide-specific phospholipase D in neutrophil stimulus-response pathways
J. Lab. Clin. Med., 120, 520-526, 1992

R. Ferrari, C. Ceconi, S. Curello, O. Alfieri, O. Visiolini

Myocardial damage during ischaemia and reperfusion
European Heart Journal, 14, 25-30, 1993

R. Ferrari

Metabolic disturbances during myocardial ischemia and reperfusion
American Journal of Cardiology, 76, 17B-24B, 1995

J. T. Flaherty

Myocardial Injury mediated by oxygen free radicals
The American Journal of Medicine, 91, 79-88, 1991

W. F. M. Fulton, C. C. Thomas

The coronary arteries
By: Charles C. Thomas, Springfield, 1965.

M. Gottwig, W. Schaper

Controversy: Do coronary collaterals have protective potential?
J. Cardiovasc. Med., 7, 1272-1275, 1982.

D. N. Granger, P. R. Kvietys

Leukocyte - endothelial cell adhesion induced by ischemia and reperfusion
Can. J. Physiol. Pharmacol., 71, 67-75, 1993

R. S. Vander Heide, D. Rim, C. M. Hohl

An in-vitro model of myocardial ischemia utilizing isolated adult rat myocytes
J. Mol. Cell. Cardiol., 22, 165-181, 1986

U. Hantke

Chemilumineszente organische Verbindungen
Mechanistische Vorstellungen zur Chemilumineszenzreaktion und mögliche
Einflußgrößen auf die Chemilumineszenz dieser Verbindungen
Das Ärztliche Laboratorium, 32 , 1-10, 1986

T. D. Henry, S. L. Archer, D. Nelson, E. K. Weir, A. H. L. From

Enhanced chemiluminescence as a measure of oxygen-derived free radical generation
during ischemia and reperfusion
Circulation Research, 67, 1453-1460, 1990

*R. B. Johnston, B. B. Keele, H. P. Misra, J. E. Lehmeyer, L.S. Webb, R. L. Baehmer, K.
V. Rajagopalan*

The role of superoxide anion generation in phagocytic bactericidal activity
J. clin. Invest., 55, 1357-1372, 1975

A. M. Kidwai, M. A. Radcliffe, E. E. Daniel

Isolation of plasma membrane from smooth, skeletal, and heart muscle
Biochim. Biophys. Acta, 233, 538 pp., 1971

*G. S. Liu, J. Thoruton, D. M. Van Winkler, A. W. H. Stanley, R. A. Olsson, J. M.
Downey*

Preconditioning protection is mediated by A₁-adenosin receptors in the rabbit heart
Circ. Suppl. III, 464, 1990

R. P. McEver

Selectins: Novel receptors that mediate leukocyte adhesion during inflammation
Thrombosis and Haemostasis, 65 , 223-228, 1991

K. Mullane

Neutrophil and endothelial changes in reperfusion injury
Trends Cardiovasc. Med., 1, 282-289, 1991

L.H. Opie

Reperfusion Injury and its pharmacologic modification
Circulation, 80, 1049-1062, 1989

L.H. Opie

The mechanism of myocyte death in ischaemia
European Heart Journal, 14, 31-33, 1993

L. Osborn

Leukocyte adhesion to endothelium in inflammation
Cell, 62, 3-6, 1990

K. D. Patel, G. A. Zimmerman, S. M. Prescott, R. P. McEver, T. M. McIntyre
Oxygen radicals induce human endothelial cells to express GMP-140 and bind
neutrophils

The Journal of Cell Biology, 112, 749-760, 1991

H. M. Piper

Cell culture techniques in heart and vessel research, Springer-Verlag, 1990

R. A. Quaife, Kohmotoo, W. Barry

Mechanismus of reoxygenation injury in cultured ventricular myocytes
Circulation, 83, 566-577, 1991

Y. Sawa, S. Bernotat-Danielowski, B. Winkler, J. und W. Schaper

Do neutrophils play a role in killing myocytes reversibly injured by hypoxia?
J. Mol. Cell. Cardiol., 24, 3-25, 1990

J. Schaper, S. Hein, B. Speiser, R. Froede, N. Bleese

Ultrastructural changes, the cytoskeleton and the extracellular matrix in chronic
ischemia
J. Mol. Cell. Cardiol., 24, 7-1, 1984

A. G. Semb, J. Vaage, O. D. Mjos

Oxygen free radical producing leukocytes cause functional depression of isolated rat
hearts: Role of leukotrienes
J. Mol. Cell. Cardiol., 22, 555-563, 1990

B. Siegmund, A. Koop, P. Schwartz, H. M. Piper

Sarcolemmal integrity and metabolic competence of cardiomyocytes under anoxia-
reoxygenation
Am. J. Physiol., 258, H285- H291, 1990

J. E. Smolen

Neutrophil signal transduction: Calcium, kinases, and fusion
J. Lab. Clin. med., 120, 527-532, 1992

T. A. Springer

Adhesion receptors of the immune system
Nature, 346, 425-433, 1990

M. J. Steinbeck, A. U. Khan, M. J. Karnovsky

Interacellular singlet oxygen generation by phagocytosing neutrophils in response to particles coated with a chemical trap
The Journal of Biological Chemistry, 267, 13425-13433, 1992

Szalay S.

Pharmakologische Modulation des „oxidative burst“ aktivierter neutrophiler Granulozyten in Anwesenheit von anoxischen Kardiomyozyten
Inaugural-Dissertation, Justus-Liebig-Universität Gießen, 1997

R. Takahashi, K. Edashige, E. Sato, M. Inoue, T. Matsuno, K. Utsumi

Luminol chemiluminescence and active oxygen generation by activated neutrophils
Arch-Biochem-Biophys., 285, 325-30, 1991

C. J. Vlahos, W. F. Matter

Signal transduction in neutrophil activation
FEBS, 309, 242-248, 1992

P. A. Ward

Mechanismus of endothelial cell killing by H₂O₂ or products of activated neutrophils
The American Journal of Medicine, 91, 3-89, 1991

J. S. Woodhead

Chemiluminescence immunoassay
Journal of Clinical Immunoassay, 7, 82-89, 1984

M. P. Wymann, V. von Tscherner, D. A. Deranleau, M. Baggiolini

Chemiluminescence detection of H₂O₂ Produced by human neutrophils during the respiratory burst
Analytical Biochemistry, 165, 371-378, 1987

M. P. Wymann, V. von Tscherner, D. A. Deranleau, M. Baggiolini

The onset of the respiratory burst in human neutrophils
The Journal of Biological Chemistry, 262, 12048-12053, 1987

J.M. Zeller, B. L. Sullivan

C-reactive protein selectively enhances the intracellular generation of reactive oxygen products by IgG-stimulated monocytes and neutrophils
Journal of Leukocyte Biology, 52, 449-504, 1992

9. Abbildungsverzeichnis

Nr.	Titel	Seite
1	Langendorff-Perfusionsapparatur	6
2	Separierung der Leukozyten im Percoll-Dichtegradienten	9
3	PMN in der Neubauer-Zählkammer	10
4	Luminol- Reaktion nach <i>Dudley</i> (1990)	11
5	Leukozyten- und PMN-Fraktion nach May-Grünwald-Giemsa gefärbt	16
6	Die Kinetik fMLP aktivierter PMN in Medium 199 und in Hanks-Puffer	17
7	Vergleich des fMLP induzierten „burst“ in Medium 199, in Medium 199 mit Adenosin-Deaminase und in Hanks-Puffer	18
8	Kinetik des fMLP induzierten „oxidative burst“ von 500 000 PMN	21
9	Kinetik des „oxidative burst“ bei Stimulation mit PMA	22
10	Die Radikalenproduktion von 500 000 PMN, aufgetragen über eine Meßzeit von 120 Minuten, bei Aktivierung durch Zymosan	23
11	Kinetik des „oxidative burst“ von fMLP aktivierten PMN mit normoxischen, 2h und 12h anoxischen Myozyten	24
12	Die Kinetik des „oxidative burst“ von PMA aktivierten PMN mit normoxischen, 2h und 12h anoxischen Myozyten	25
13	Kinetik des „oxidative burst“ von Zymosan aktivierten PMN mit normoxischen, 2h und 12h anoxischen Myozyten	26
14	Vergleich der Kinetikgraphen von fMLP aktivierten PMN bei Zusatz von anoxischem Inkubat (Medium 199 und Hanks-Puffer) und bei Zusatz von anoxischen Zellen	27
15	Vergleich der Kinetikgraphen von fMLP aktivierten PMN bei Zusatz von anoxischem Inkubat (Medium 199 und Hanks-Puffer) und bei Zusatz von anoxischen Zellen	29
16	Zusammenfassende vergleichende Kinetik bei Zugabe von reoxygeniertem Inkubat, von anoxischem Inkubat (Medium 199 und Hanks-Puffer), anoxischem Inkubat (Medium 199 und Hanks-Puffer) mit 0.25 U/ml Adenosin-Deaminase und von anoxischen Zellen zum fMLP-Assay	30
17	Histogramm mit Darstellung des Unterschiedes bei Zusatz von anoxischen Zellen und -Inkubat zum Biolumineszenzassay	31
18	Kinetikkurve von anoxischen Myozyten im Assay mit unaktivierten PMN im Vergleich zu aktivierten PMN (ohne Myozyten und im Assay mit normoxischen Myozyten)	32

Nr.	Titel	Seite
19	Morphologie normoxischer Myozyten	34
20	Morphologie anoxischer Myozyten	34
21	Übersicht einer Kultur normoxischer Myozyten	35
22	Übersicht einer Kultur anoxischer Myozyten	35
23	Normoxische Myozyten (12h)	37
24	Normoxische Myozyten mit Verlust der Adhäsion (12h)	37
25	Normoxische Myozyten nach 24h	40
26	Normoxische Myozyten mit aktivierten PMN nach 24h	40
27	Normoxische Myozyten am 6. Tag	41
28	Normoxische Myozyten mit aktivierten PMN am 6. Tag	41
29	Anoxische Myozyten nach 24h	43
30	Anoxische Myozyten mit aktivierten PMN nach 24h	43
31	Anoxische Myozyten am 6. Tag	44
32	Anoxische Myozyten mit aktivierten PMN am 6. Tag	44
33	Modell der Wirkungsweise von fMLP, PMA und Zymosan auf neutrophile Granulozyten	48
34/35	Die Wirkung von Neuraminidase auf die Interaktion von anoxischen und normoxischen Myozyten im Assay mit fMLP und PMA aktivierten PMN, dargestellt als Histiogramm	50
36	Dosisabhängige Steigerung des „respiratory burst“ mit steigenden Konzentrationen von Neuraminidase bei der Präinkubation von normoxischen Myozyten (Kinetikgraphik am Beispiel von fMLP aktivierten PMN)	52
37	Normoxische Myozyten mit aktivierten PMN nach 24h	53
38	Mit Neuraminidase vorbehandelte normoxische Myozyten mit aktivierten PMN nach 24h	53

Nr.	Titel	Seite
39	Der Einfluß der Membranfraktion von anoxischen und normoxischen Myozyten auf die aktivierten PMN	54
40	Dosisabhängige Steigerung des „oxidative burst“ mit steigenden Konzentrationen von SOD-Inhibitor bei der Präinkubation von normoxischen Myozyten (Kinetikgraphik am Beispiel von fMLP aktivierten PMN)	55
41/42	Die Wirkung von Diethyldithiocarbamat auf die Interaktion von anoxischen und normoxischen Myozyten im Assay mit fMLP und PMA aktivierten PMN, dargestellt als Histiogramm	56
43	Normoxische Myozyten mit aktivierten PMN nach 24h	57
44	Mit SOD-Inhibitor präinkubierte normoxische Myozyten mit aktivierten PMN nach 24h	57

Zoltán Szalay
Liebigstraße 35
35392 Gießen

Lebenslauf:

Geburtsdaten: geboren am 01. Juli 1967 in Gießen als zweites von drei Kindern
Eltern: Klara Szalay, geb. Assmann, und Dr. György Szalay

Familienstand: seit 15. November 1991 verheiratet mit Susanne Szalay, geb. Holbe
am 08. April 1992 Geburt unserer Tochter Lisa May
am 04. April 1994 Geburt unseres Sohnes Valentin Felix

Staatsangehörigkeit: deutsch

Konfession: röm.-katholisch

Ausbildungs-und Werdegang:

- 08/73-07/77: Grundschule Rosbach v.d.H.
- 08/77-07/86: St.-Lioba-Schule, bischöfliches Gymnasium in Bad Nauheim, Schulabschluß mit dem Abitur (Leistungsfächer: Physik und Erdkunde)
- 01/87-09/88: Zivildienst an der *William-Harvey-Klinik* in Bad Nauheim
(Prof. Dr. med. W. Hach), einjährige Ausbildung als Krankenpflegehelfer
- 09/88-06/90: vier Semester Vorklinik an der *Semmelweis-Universität* in Budapest/Ungarn, Abschluß mit der Ärztlichen Vorprüfung
- 10/90-08/93: klinischer Abschnitt (6 Semester) an der *Justus-Liebig-Universität* in Gießen bis zum Zweiten Staatsexamen

Teilnahme am Kongreß der *Deutschen Gesellschaft für Herz und Kreislaufforschung* in Mannheim im April 1993

Teilnahme am Kongreß der *American Heart Association* in Atlanta/USA im November 1993
- 10/93-10/94: Praktisches Jahr an der Justus-Liebig-Universität in Gießen:
- 12/94-5/96: Arzt im Praktikum in der Kardiovaskularchirurgie der Kerckhoffklinik in Bad Nauheim bei Prof. Dr. med. Klövekorn.

Seit 6/96: Assistenzarzt in der Kardiochirurgie der Kerckhoffklinik in Bad Nauheim.