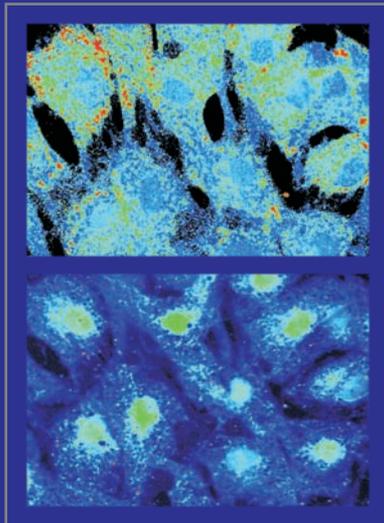


MECHANISMEN DER POSTCONDITIONING- VERMITTELTEN PROTEKTION GEGEN DEN ENDOTHELIALEN REPERFUSIONSSCHADEN

VERENA CHRISTIANE KRATZ



INAUGURAL-DISSERTATION zur Erlangung des Grades eines **Dr. med. vet.**
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



edition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

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

1. Auflage 2011

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

1st Edition 2011

© 2011 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

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

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Veterinär-Physiologie
der Justus-Liebig-Universität Giessen
Betreuer: Prof. Dr. J. Roth
und dem
Physiologischen Institut des Fachbereichs Humanmedizin
der Justus-Liebig-Universität Giessen
Betreuer: Prof. Dr. K.-D. Schlüter

**Mechanismen der Postconditioning-vermittelten Protektion
gegen den endothelialen Reperfusionsschaden**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Giessen

eingereicht von

Verena Christiane Kratz

Tierärztin aus Cochem/Mosel

Giessen 2011

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Giessen

Dekan: Prof. Dr. M. Kramer

Gutachter: Prof. Dr. J. Roth
Prof. Dr. K.-D. Schlüter

Tag der Disputation: 22. Februar 2011

Für Sabine

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der Abkürzungen	1
1 Einleitung	4
1.1 Endothel	4
1.1.1 Aufgaben und Bedeutung des Endothels	4
1.1.2 Der endotheliale kontraktile Apparat	5
1.1.3 NO / eNOS	5
1.2 Ischämie und Reperfusion	8
1.3 Prä- und Postkonditionierung	9
1.3.1 Präkonditionierung	9
1.3.2 Signaltransduktionsweg der Präkonditionierung	10
1.3.3 Ischämische Postkonditionierung	10
1.3.4 Signaltransduktionsweg der ischämischen Postkonditionierung	11
1.4 Pharmakologische RISK-Aktivatoren	12
1.4.1 Cannabinoide	13
1.4.1.1 Endogenes Cannabinoidsystem	13
1.4.1.2 RISK-Aktivierung durch Cannabinoide	14
1.4.1.3 Einfluss von Cannabinoiden in der Ischämie und Reperfusion	14
1.5 Zelltod	15
1.5.1 Einfluss von Ischämie und Reperfusion auf Nekrose	15
1.5.2 Einfluss von Cannabinoiden auf reperfusionsinduzierte Nekroseentwicklung	15
1.6 Zielsetzung und Fragestellung	16
2 Material und Methoden	17
2.1 Material	17
2.1.1 Chemikalien und Substanzen	17
2.1.2 Puffer und Lösungen	19
2.1.2.1 Zellkulturmedien	19

2.1.2.2	Perfusionsmedien	21
2.1.3	Geräte und Laborbedarf	21
2.2	Methoden	24
2.2.1	Versuche zur Simulation von Ischämie und Reperfusion an koronarvaskulären Endothelzellmonolayern	24
2.2.1.1	Versuchstiere	24
2.2.1.2	Isolierung und Kultivierung von mikrovaskulären koronaren Endothelzellen adulter Ratten	25
2.2.2	Experimente	28
2.2.2.1	Anoxie- Reoxygenationsversuche	28
2.2.2.2	Ermittlung der intrazellulären Ionenkonzentration von Ca^{2+} mittels Fluoreszenzmikroskopie	28
2.2.2.3	Größenbestimmung der Interzellularspaltenbildung	32
2.2.2.4	Methode zur Erfassung von Nekrose in koronaren Endothelzellen	33
3	Protokolle	35
3.1	Experimentelles Protokoll	35
3.2	Protokolle der Anoxie- und Reoxygenationsversuche	36
3.2.1	Ischämische Postkonditionierung	36
3.2.2	Pharmakologische Postkonditionierung	38
3.3	Messparameter	39
3.4	Statistik	39
4	Ergebnisse	40
4.1	Veränderung der interzellulären Lückenbildung und der zytosolischen Kalziumkonzentration von koronaren Endothelzellmonolayern während simulierter Ischämie und Reperfusion	40

4.2	Postkonditionierung an isolierten Endothelzellmonolayern während simulierter Ischämie und Reperfusion	42
4.2.1	Wirkung ischämischer Postkonditionierung auf die interzelluläre Lückenbildung und die zytosolische Kalziumkonzentration	42
4.2.1.1	Einfluss verschiedener ischämischer Postkonditionierungsprotokolle auf die interzelluläre Lückenbildung und die zytosolische Kalziumkonzentration	45
4.2.1.2	Protektionsauslösung der ischämischen Postkonditionierung	47
4.2.1.3	Wirkmechanismus der ischämischen Postkonditionierung	48
4.2.2	Pharmakologische Postkonditionierung an koronaren Endothelzellmonolayern während simulierter Ischämie und Reperfusion	49
4.2.2.1	Wirkung von Cannabinoiden auf die interzelluläre Lückenbildung und die zytosolische Kalziumkonzentration	50
4.2.2.2	Rezeptorvermittelte Protektion gegen reperfusionsinduzierte Lückenbildung durch Cannabinoide	53
4.2.2.3	Wirkmechanismus der CBR-vermittelten Protektion gegen reperfusionsinduzierte Lückenbildung	55
4.3	Einfluss von Cannabinoidrezeptoraktivierung auf die ischämie- und reperfusioninduzierte Endothelzellnekrose	57
5	Diskussion	59
5.1	Zellkulturmodell	59
5.2	Ischämische Postkonditionierung an koronaren Endothelmonolayern	60
5.3	Pharmakologische Postkonditionierung an koronaren Endothelmonolayern	64
5.4	Klinischer Ausblick	67
5.4.1	Ischämische Postkonditionierung	67
5.4.2	Therapeutischer Einsatz von Cannabis	68

6	Zusammenfassung	70
7	Summary	72
8	Literaturverzeichnis	74
9	Kongressbeiträge	100
10	Erklärung	101
11	Danksagung	102

Verzeichnis der Abkürzungen

2-AG	2-Arachidonylglycerol
Abb	Abbildung
AEA	Arachidonylethanolamin-Anandamid
AKT	Proteinkinase B; Serin-Threonin-Kinase
AM251	N-(Piperidin-1-yl)-5-(4-iodophenyl)-1-(2,4-dichlorophenyl)-4-methyl-1H-pyrazol-3-carboxamid
AM630	(6-Iodo-2-methyl-1-(2-morpholinyl)-1H-indol-3-yl)(4-methoxyphenyl)methanon
ATP	Adenosintriphosphat
BAPTA	1, 2-bis(o-aminophenoxy)ethan-N,N,N',N'-tetraacetat
BSA	Bovine Serum Albumin
BtMG	Betäubungsmittelgesetz
°C	Grad Celsius
ca.	zirka
Ca ²⁺	Kalzium
CaCl ₂	Kalziumchlorid
CB1R	Cannabinoid-1-Rezeptor
CB2R	Cannabinoid-2-Rezeptor
CBR	Cannabinoidrezeptor
cGMP	zyklisches 3',5'-Guanosinmonophosphat
cNOS	konstitutive Stickstoffmonoxidsynthase
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDRF	Endothelial Derived Relaxing Factor
EGTA	Ethylenglykol-bis-(aminoethylether-)tetraacetat
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxidsynthase
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERK1/2	extrazellulär regulierte Kinasen
ET-1	Endothelin
FCS	Fetales Kälberserum

Verzeichnis der Abkürzungen

Fura-2 AM	1-(2-(5-Carboxyoxazol-2-yl)-6-aminobenzofuran-5-oxy)-2-(2-2'-amino-5'-methylphenoxy)-ethan-N,N,N',N'-tetraacetat
g	Gramm
G-Protein	Guanosintriphosphatbindendes Protein
GTP	Guanosintriphosphat
GSK-3 β	Glykogensynthasekinase-3-beta
h	Stunde
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-2-ethansulfonsäure
i/o GPCR	inhibitorischer/olfaktorischer G-Protein-gekoppelter Rezeptor
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxidsynthase
KCl	Kaliumchlorid
kg	Kilogramm
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
KT 5823	C ₂₉ H ₂₅ N ₃ O ₅
KTR	Kontrolle
L-NAME, HCl	N-Nitro-L-arginin Methyl Ester, Hydrochlorid
LY294002	2-(4-Morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one
m ²	Quadratmeter
M	mol/Liter
MEK (MAPK)	Mitogen-activated protein kinase
MG	Molekulargewicht
mg	Milligramm
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
min	Minuten
ml	Milliliter
MLK	Myosinleichtkette
MLK-Kinase	Myosinleichtkettenkinase
mPTP	Mitochondriale Permeabilitäts-Transitions-Pore
μ g	Mikrogramm

Verzeichnis der Abkürzungen

μl	Mikroliter
N_2	Stickstoff
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO_3	Natriumhydrogencarbonat
NaOH	Natriumhydroxid
NCS	Neonatales Kälberserum
nNOS	neuronale Stickstoffmonoxidsynthase
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxidsynthase
O_2	Sauerstoff
PGI_2	Prostazyklin
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H_3O^+ -Konzentration
PC	mechanische Postkonditionierung
PI	Propidiumiodid
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PKB/AKT	Proteinkinase B
PKC	Proteinkinase C
PKG	Proteinkinase G
pO_2	Sauerstoffpartialdruck
R-1 Methanandamid (R1M)	(R) - (+)-Arachidonyl-1`-Hydroxy-2`-propylamid
RISK	Reperfusion Injury Salvage Kinases
sek	Sekunde
SEM	Standardabweichung des Mittelwertes
sGC	lösliche Guanylatzyklase
THC	(-)-Delta-9-tetrahydrocannabinol
U/min	Umdrehungen pro Minute
%	Prozent
$[\text{Ca}^{2+}]_i$	zytosolische freie Kalziumkonzentration
ZNS	zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Endothel

1.1.1 Aufgaben und Bedeutung des Endothels

Das vaskuläre Endothel kleidet in Säugetieren als einschichtige homogene Zellschicht luminal das gesamte Lymph- und Blutgefäßsystem sowie die Herzkammern aus. Es stellt mit ca. einer Billion Zellen, einer Masse von etwa 1,5 kg und einer Oberfläche von 1000 m² (Lemarchand et al. 1992; Helisch et al. 1999) eines der größten Organe des menschlichen Körpers dar.

Endothelzellen stellen prinzipiell eine Schranke zwischen Blut und Gewebe dar. Diese Barrierefunktion galt lange als einzige Aufgabe des Endothels. Die erstmalige Isolierung und Kultivierung von Endothelzellen (Jaffe et al. 1973) konnte dazu beitragen die Aufgaben und Bedeutung des Endothels weiter aufzuklären. Die Analyse kultivierter Endothelzellen zeigte die Vielzahl der Formen und Funktionen des Endothels. Sie bilden in Geweben, in denen eine genaue Kontrolle des Stoffaustausches erforderlich ist, eine dichte Zellschicht aus. Ein solches Schrankenendothel findet sich beispielsweise in den Gehirnkapillaren (Blut-Hirn-Schranke) oder den Kapillaren der Lunge (Blut-Luft-Schranke). Ein fenestriertes, sogenanntes Lückenendothel, befindet sich in Geweben mit hohem Stoffaustausch wie in den Glomerulus- und Tubuluskapillaren der Niere. Offene Kapillaren mit einem diskontinuierlichen Endothel ermöglichen einen beschleunigten Stoffaustausch wie es in der Leber oder der Milz nötig ist (Liebich et al. 2004).

Das Endothel trägt maßgeblich zur Regulation des Gefäßtonus bei, verfügt über einen kontraktilen Apparat (Curry 1992) und vermittelt immunologische Prozesse (Cotran 1987). Endothelzellen dienen sowohl aktiv als auch passiv dem Stoffaustausch zwischen dem intra- und extravasalen Raum. Niedermolekulare hydrophile und lipophile Substanzen können dabei die Barriere via Diffusion passieren, während andere Stoffe über aktive Transportmechanismen befördert werden können.

Akute und chronische Entzündungen, Hypertonie, Ischämie und Reperfusion können zur Funktionsstörung der endothelialen Schrankenfunktion führen (Cardillo et al. 1998; Schäfer et al. 2003).

Frühere Untersuchungen an Endothelzellen konnten zeigen, dass es nach simulierter Ischämie in der Reperfusion zu einer deutlichen Zunahme der interzellulären Lücken kommt. Für die Vergrößerung der Interzellulärspalten ist hier die Aktivierung des endothelialen kontraktiven Apparates von entscheidender Bedeutung (Garcia et al. 1995; Schäfer et al. 2003).

1.1.2 Der endotheliale kontraktile Apparat

Endothelzellen besitzen, wie Muskelzellen, die Hauptkomponenten des kontraktiven Apparates: Aktin, Myosin und Tropomyosin (Gabbiani et al. 1983; Wong et al. 1983; Schnittler et al. 1990). Myosin ist dabei die kraftgebende Komponente in dem Aktin-Myosin-Filamentsystem (Sheldon et al. 1993; Vale 1994). Der größte Anteil von Aktin und Myosin liegt in der Nähe der Zellränder und wird Ca^{2+} -abhängig reguliert. Kommt es über Ca^{2+} -Kanäle aus dem Extrazellulärraum oder durch Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum zu einem intrazellulären Ca^{2+} -Anstieg, bindet Ca^{2+} an Calmodulin und aktiviert die Myosinleichtketten-Kinase (MLK-Kinase). Durch Phosphorylierung der Myosinleichtketten (MLK) kommt es zur Zellkontraktion (Goeckeler und Wysolmerski 1995; Garcia und Schaphorst 1995, Garcia et al. 1995; van Hinsbergh 1997), zur Entstehung interzellulärer Lücken (Schäfer et al. 2003; Gündüz et al. 2006; Kasseckert et al. 2009) und zu einer gesteigerten Permeabilität (Gündüz et al. 2003). Diese Permeabilitätssteigerung spielt auch bei der Pathogenese des kardialen Ödems eine zentrale Rolle (Garcia-Dorado und Oliveras 1993; Geissler und Allen 1998; Mehlhorn et al. 2001).

1.1.3 NO / eNOS

Der Endothelial Derived Relaxing Factor (EDRF) wurde 1980 von Furchgott und Zawadzki entdeckt. 1987 identifizierten Palmer et al. Stickstoffmonoxid (NO) als EDRF. Eine der wichtigsten Funktionen von NO ist die Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur, wobei NO eine zentrale Rolle bei der Regulation des Gefäßtonus spielt.

NO wirkt zudem inhibierend auf die Thrombozytenaggregation und deren Adhäsion an die Gefäßwand (Sneddon und Vane 1988; Radomski et al. 1990, 1993) und verringert dadurch die intravasale Gerinnung und das Thrombenwachstum (Loscalzo 2001; Jin et al. 2005). Durch Hemmung der Zelladhäsion von Leukozyten wirkt es antiarteriosklerotisch (Moncada und Higgs 1995; Diaz et al. 1997).

NO wird durch NO-Synthasen (NOS) gebildet. Von den NO-Synthasen sind drei Isoformen bekannt, die in zwei Gruppen unterteilt werden:

- Kalziumunabhängige, induzierbare NO-Synthase (iNOS = NOS2)
- Kalziumabhängige, konstitutiv exprimierte NO-Synthasen (cNOS):
die neuronale NOS (nNOS = NOS1) und die endotheliale NOS (eNOS = NOS3).

In Endothelzellen liegt die eNOS hauptsächlich in Einstülpungen der Plasmamembran vor, den sogenannten Caveoli. Die Aktivität der eNOS wird unter anderem durch den intrazellulären Ca^{2+} -Spiegel kontrolliert. Eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration steuert die Bindung des Ca^{2+} /Calmodulin-Komplexes an die eNOS und kann so zu einer Überführung des Enzyms in seine aktive Form führen (Nathan und Xie 1994). Die aktivierte eNOS bildet aus der Aminosäure L-Arginin NO. Eine Inhibition der NO-Synthese mit L-Arginin-Analoga (L-NAME) können zu einer Verringerung des Blutflusses und einer Unterdrückung der endothelvermittelten Vasodilatation führen (Cooke et al. 1991).

Das entstandene NO diffundiert aus den Endothelzellen in die glatte Muskulatur. NO aktiviert dort die im Zytosol befindliche lösliche Guanylatzyklase (sGC) (Saxenhofer et al. 1993; Foster 1999; Brunner 2003). Die sGC katalysiert die Umsetzung von Guanosintriphosphat (GTP) zu zyklischem 3',5'-Guanosinmonophosphat (cGMP). Der „second messenger“ cGMP aktiviert die Proteinkinase G, die unter anderem den intrazellulären Ca^{2+} -Spiegel erniedrigt und eine Relaxation der glatten Muskulatur bewirkt (siehe Abb. 1.1.3).

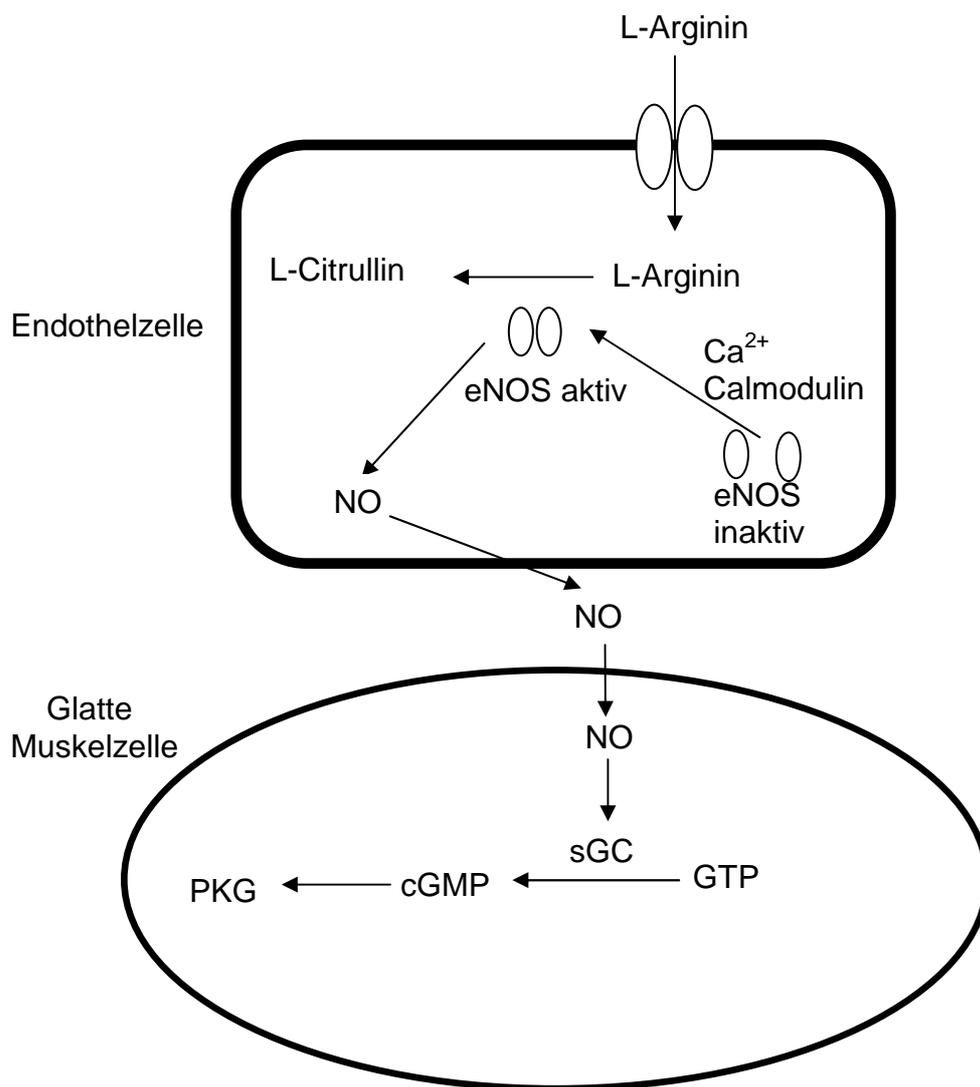


Abb. 1.1.3: Schematische Darstellung der NO-Synthese in Endothelzellen, Diffusion und Mechanismus in der glatten Muskelzelle (eNOS: endotheliale Stickstoffmonoxidsynthase; NO: Stickstoffmonoxid; GTP: Guanosintri-phosphat; sGC: lösliche Guanylatzyklase; cGMP: zyklisches Guanosinmonophosphat; PKG: Proteinkinase G).

Eine Stimulation der cGMP-Signaltransduktion an Endothelzellen erhöht die Ca^{2+} -Sequestrierung in das endoplasmatische Retikulum (ER) und vermindert die reperfusioninduzierte Zunahme der zytosolischen Kalziumkonzentration und interzellulärer Spalten (Kasseckert et al. 2009). An reperfundierten Herzen führt die Stimulation der löslichen Guanylatzyklase zu einer Verminderung des kardialen Ödems in der Reperfusion (Kasseckert et al. 2009).

1.2 Ischämie und Reperfusion

Ischämie ist die Unterversorgung von Gewebe bzw. eines Organs mit Blut und somit auch mit Sauerstoff und Nährstoffen. Medizinische Behandlungen ischämischer Gewebe zielen darauf diesen Mangelzustand durch eine Wiederdurchblutung (Reperfusion) möglichst schnell zu beheben. Eine frühzeitige Reperfusion ist unabdingbar für das postischämische Überleben von Geweben. Der Vorgang der Reperfusion beinhaltet jedoch nicht nur die Wiederaufnahme von gewebeversorgenden Transportvorgängen wie Nährstoff- und Sauerstoffversorgung, Schadstoffabtransport und endokrine Signalweitergabe, sondern geht paradoxerweise auch mit gewebescheidenden Effekten einher. Es kommt zu einem Reperfusionsschaden, der sich als Endothel- und Myozytenschädigung ausbildet und sich in morphologischen und funktionellen Veränderungen manifestiert.

Die Entwicklung einer Zellschädigung im ischämischen Areal beginnt mit einer Störung des zellulären Energiestoffwechsels und dies kann zu einer Einschränkung der endothelialen Gewebefunktion führen. Zur Deckung ihres Energiebedarfs nutzen Endothelzellen die Glykolyse und die oxidative Phosphorylierung. Endothelzellen generieren lebenswichtiges Adenosintriphosphat (ATP) in der mitochondrialen Atmungskette als letzten Schritt der Verstoffwechslung von Nährstoffen zu Kohlendioxid und Wasser. Bei Störungen dieses Atmungszyklus durch den dauerhaften Abfall der Sauerstoffkonzentration und der Nährstoffzufuhr in der Ischämie kommt es zum Abbau von ATP und zur Kumulierung saurer Stoffwechselmetabolite.

Endothelzellen reagieren auf einen Abfall des zytosolischen ATP-Gehaltes sehr empfindlich (Watanabe et al. 1991; Noll et al. 1995; Muhs et al. 1997). In früheren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass eine Erniedrigung der intrazellulären ATP-Konzentration zu einem deutlichen biphasischen Kalziumanstieg führt (Noll et al. 1995; Schäfer et al. 2001). Vermittelt wird der initial transiente Ca^{2+} -Anstieg durch eine Aktivierung der Inositoltriphosphat-sensitiven Ca^{2+} -Kanäle des ER. Diesem schließt sich ein langsamer kapazitiver Ca^{2+} -Einstrom aus dem extrazellulären Raum über die Plasmamembran an (Putney 1990; Dolor et al. 1992; Schäfer et al. 2001).

Die parazelluläre Permeabilität wird u. a. durch die kalziumabhängige Aktivierung des kontraktilen Apparates der Endothelzellen gesteigert (Curry 1992). Außerdem wird die Syntheserate vasoaktiver Substanzen wie Stickstoffmonoxid (NO), Endothelin (ET-1) und Prostazyklin (PGI₂) erhöht (Newby und Henderson 1990; Furchgott et al. 1992; Busse et al. 1993).

Darüber hinaus werden die Zellen auch nach Beendigung der Ischämie und dem Wiedereinsetzen der Reperfusion weiter geschädigt. Die Störung der Kalziumhomöostase und deren Folgen für die endotheliale Schrankenfunktion sind in der frühen Phase der Reperfusion nicht reversibel. Es kommt in der Reperfusion zu einer weiteren Erhöhung der Ca²⁺-Konzentration und zu einer weiteren Zunahme der interzellulären Lückenbildung (Schäfer et al. 2003; Gündüz et al. 2006; Kasseckert et al. 2009). Infolge der anhaltenden Ca²⁺-Überladung kann es zum nekrotischen und apoptotischen Zelltod kommen (Trump et al. 1997; Hoffmann et al. 2004; Kumar et al. 2007).

1.3 Prä- und Postkonditionierung

1.3.1 Präkonditionierung

Murry et al. fanden 1986 heraus, dass repetitive kurze Zyklen koronarer Okklusion und Reperfusion vor einer langanhaltenden Ischämie die Herzinfarktgröße deutlich verringern kann. Dieses Phänomen wurde als ischämische Präkonditionierung bezeichnet. Die ischämische Präkonditionierung wurde an zahlreichen Tierspezies in vitro und in vivo untersucht (Liu et al. 1991; Vahlhaus et al. 1996; Bernardo et al. 1999). Menschliches Herzgewebe wurde durch Deutsch et al. (1990) zum ersten Mal erfolgreich ischämisch präkonditioniert.

1.3.2 Signaltransduktionsweg der Präkonditionierung

Der protektive Effekt der ischämischen Präkonditionierung ist auf die Aktivierung bestimmter Signalkaskaden zurückzuführen. Als „Reperfusion Injury Salvage Kinases“ (**RISK**) werden u. a. die beteiligten Proteinkinasen Phosphoinositol-3-Kinase (PI3K), Proteinkinase G (PKG) und Glykogensynthasekinase-3 β (GSK-3 β) bezeichnet (Yellon und Baxter 1999; Tong et al. 2000, 2002; Hausenloy et al. 2005a,b). Bei PI3K und PKG wirkt die Aktivierung, bei GSK-3 β die Inaktivierung protektiv.

Die PI3K gehört zur Unterfamilie der Lipidkinasen. Nachgeschaltete Ziele der PI3K sind Proteinkinase B (PKB) / AKT, p70S6-Kinase (Chung et al. 1994) und mehrere Isoformen der Proteinkinase C (PKC). In früheren Untersuchungen konnte an isolierten Ratten- und Kaninchenherzen (Ytrehus et al. 1994; Speechly-Dick et al. 1994) und an Kardiomyozyten (Gray et al. 1997; Okubo et al. 1999) gezeigt werden, dass die Aktivierung der PKC an der ischämischen Präkonditionierung beteiligt ist. Weitere Versuche an isolierten Rattenherzen zeigten, dass eine Inhibition des PI3K/AKT-Signalweges den protektiven Effekt der Präkonditionierung aufhebt (Tong et al. 2000; Mocanu et al. 2002). Desweiteren konnten durch pharmakologische RISK-Aktivierung präkonditionierte Herzen über den PI3K/AKT-Signalweg geschützt werden (Krieg et al. 2002). In Untersuchungen an Endothelzellen wurde die Präkonditionierung ebenfalls erfolgreich angewendet (DeFily und Chilian 1993; Zhou et al. 1996; Zahler et al. 2000; Thors et al. 2003; Loukogeorgakis et al. 2005).

1.3.3 Ischämische Postkonditionierung

Ischämische **Post**konditionierung ist ein der ischämischen **Prä**konditionierung entlehntes Manöver, bei dem die endgültige Reperfusion zunächst durch eine oder mehrere Ischämie-Perioden unterbrochen wird.

Es konnte zum ersten Mal in einem in vivo Hundemodell gezeigt werden, dass durch die Anwendung der ischämischen Postkonditionierung die Infarktgröße reduziert werden kann (Zhao et al. 2003).

Die ischämische Präkonditionierung ist therapeutisch bedeutungslos geblieben, da sie vor einem Koronarverschluss vollzogen werden müsste. Die Anwendung der Postkonditionierung dagegen vermindert die auftretenden Folgen eines Infarktes wie myokardiale Gewebeschäden und ventrikuläre Arrhythmien (Halkos et al. 2004; Galagudza et al. 2004). Die Postkonditionierung ist klinisch vielversprechend und bereits am Menschen in kleinen klinischen Studien erfolgreich angewendet worden (Staat et al. 2005; Laskey et al. 2005; Thibault et al. 2008).

1.3.4 Signaltransduktionsweg der ischämischen Postkonditionierung

Es gibt Hinweise, dass, wie bei der Präkonditionierung, der PI3K/Akt-Signalweg auch bei der ischämischen Postkonditionierung eine Rolle spielt (Zhu et al. 2006). Die RISK werden in den ersten Minuten der Reperfusion durch die ischämische Postkonditionierung aktiviert (Kin et al. 2004; Hausenloy et al. 2005b; Yellon und Hausenloy 2007).

An einem *in vivo* Kaninchenmodell und an Rattenherzen konnte gezeigt werden, dass die Inhibition der PI3K mit Ly294002 (Tsang et al. 2004) oder Wortmannin (Tsang et al. 2004; Philipp et al. 2006) den Schutz der ischämischen Postkonditionierung aufheben kann.

In weiteren Untersuchungen wurde an isoliert perfundierten Rattenherzen (Bopassa et al. 2006) sowie an isoliert perfundierten und an *in vivo* Kaninchenherzen (Yang et al. 2005; Chiari et al. 2005) gezeigt, dass die Inhibition der NOS den protektiven Effekt der ischämischen Postkonditionierung aufhebt. Dies deutet darauf hin, dass die Aktivierung der NOS bei der Protektion durch ischämische Postkonditionierung eine wichtige Rolle spielt (Yang et al. 2004b). Die Aktivierung der RISK bewirkt dabei eine Aktivierung des PI3K/AKT-Signalweges und konsekutive eNOS-Phosphorylierung (Tsang et al. 2004); (siehe Abb. 1.3.4).

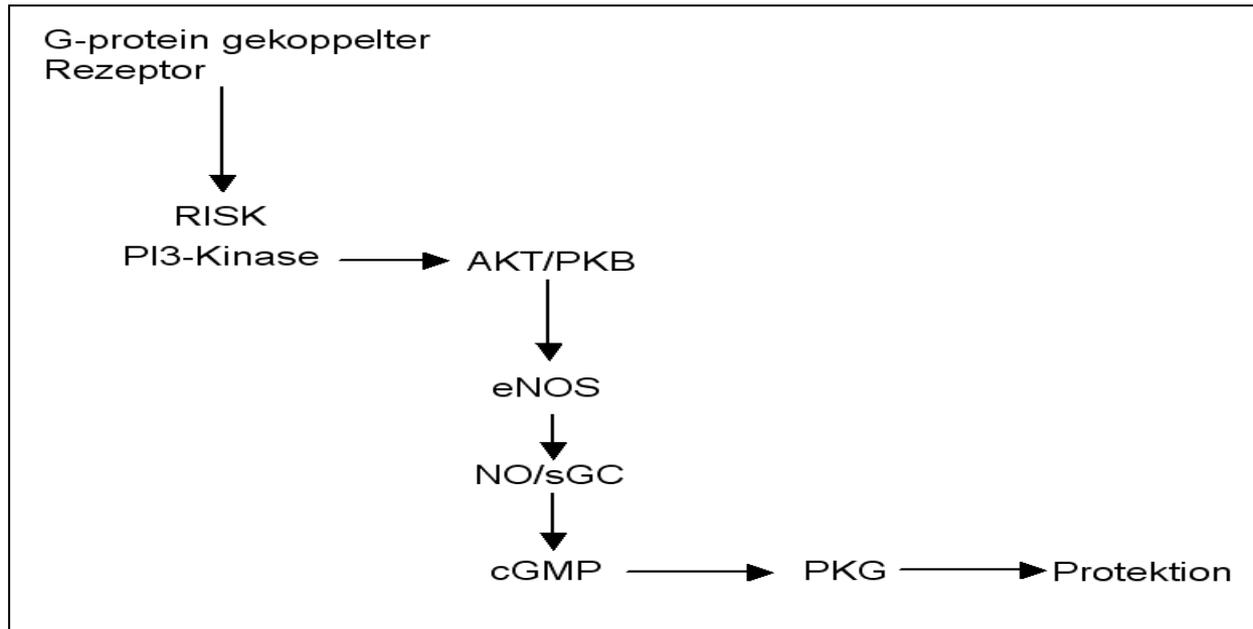


Abb.1.3.4: RISK-vermittelter Signaltransduktionsweg (RISK: Reperfusion Injury Salvage Kinases; PI3-Kinase: Phosphoinositid-3-Kinase; AKT/PKB: Proteinkinase B; eNOS: endotheliale Stickstoffmonoxidsynthase; NO: Stickstoffmonoxid, sGC: lösliche Guanylatzyklase; cGMP: zyklisches Guanosinmonophosphat; PKG: Proteinkinase G)

1.4 Pharmakologische Aktivatoren der RISK

Neben der Möglichkeit RISK durch ischämische Postkonditionierungsmanöver zu aktivieren gibt es auch pharmakologische RISK-Aktivatoren. So wirken verschiedene RISK-Aktivatoren protektiv, wenn sie zu Beginn der Reperfusion appliziert werden (Bell und Yellon 2003; Wolfrum et al. 2004; Bullard et al. 2005). Die pharmakologische Postkonditionierung mit dem Narkosegas Isofluran konnte zeigen, dass die Protektion über die Aktivierung der Proteinkinase B und Inhibition der GSK-3 β vermittelt ist (Feng et al. 2005, 2006). Desweiteren konnte an Kardiomyozyten gezeigt werden, dass die Aktivierung der PKB und nachgeschaltete eNOS-Phosphorylierung durch Insulingabe vor dem Ischämie- / Reperfusionsschaden schützen kann (Akaiwa et al. 2000; Gao et al. 2002; Abdallah et al. 2006). In Ischämie- und Reperusionsversuchen wurde festgestellt, dass eine pharmakologische Postkonditionierung zu einer Aktivierung des PI3K/AKT-Signalweges führt und sich diese Aktivierung protektiv auf Endothelzellen auswirkt (Sugiura et al. 1998; Liu et al. 2000).

1.4.1 Cannabinoide

1.4.1.1 Endogenes Cannabinoidsystem

Neben dem natürlich vorkommenden Cannabinoid (-)-Delta-9-tetrahydrocannabinol (THC) der Hanfpflanze *Cannabis sativa* werden Cannabinoide auch endogen synthetisiert und demzufolge als Endocannabinoide bezeichnet. Zu den Endocannabinoiden gehören u. a. Arachidonylethanolamin-Anandamid (AEA) (Devane et al. 1992) und 2-Arachidonylglycerol (2-AG); (Mechoulam et al. 1995). Ihre biologischen Wirkungen üben sie rezeptorvermittelt aus (Howlett 1995). Zwei Subtypen von Cannabinoidrezeptoren (CBR), CB1R und CB2R, wurden bisher identifiziert. CB1R werden vor allem im ZNS (Herkenham et al. 1990), im Fettgewebe (Bensaid et al. 2003), aber auch im Myokard (Bonz et al. 2003), in vaskulärem Endothel (Liu et al. 2000; Kunos et al. 2002) und in Synapsen gefunden. CB2 sind hauptsächlich in Lymphknoten und in Makrophagen lokalisiert (Munro et al. 1993). CBR gehören zur Familie der Gi/o-Protein-gekoppelten Rezeptoren (i/o GPCR) (Howlett et al. 1986).

Während die psychotropen Effekte der Cannabinoide seit langem bekannt sind, wurden kardiovaskuläre und metabolische Wirkungen erst in den letzten Jahren näher untersucht. Allgemein bewirken Cannabinoide im kardiovaskulären System *in vivo* eine Vasodilatation und Tachykardie mit unterschiedlichem Einfluss auf den Blutdruck (Huestis et al. 1992), mittelfristig entsteht eine CB1R-vermittelte Hypotonie und Bradykardie (Benowitz et al. 1975; Lake et al. 1997). Eine Blutdruckerniedrigung kann durch Verminderung des vaskulären Widerstandes, durch Verminderung des Herzzeitvolumens oder aus einer Kombination der beiden Variablen induziert sein. Mit R-1 Methanandamid (R1M), einem synthetischen Analogon zu Anandamid, konnte gezeigt werden, dass die blutdrucksenkende Wirkung nicht durch metabolische Abbauprodukte induziert wird, sondern auf einer direkten Aktivierung von CBR durch Anandamide beruht (Wagner et al. 2001a).

1.4.1.2 RISK-Aktivierung durch Cannabinoide

Cannabinoide können die RISK-Signalkaskade aktivieren (Gómez Del Pulgar et al. 2002; Ozaita et al. 2007). Im Gehirn führt eine Aktivierung des CB1R zur Aktivierung der PI3K (Howelett 2005). Versuche an verschiedenen Zelltypen konnten zeigen, dass Cannabinoide den PI3K/AKT-Signalweg in verschiedenen Geweben aktivieren können (Molina-Holgado et al. 2002; Sánchez et al. 2003; Ellert-Miklaszewska et al. 2005). Eine weitere Evidenz des PI3K/AKT-Signalweges konnte über Aktivierung des CB1R an Endothelzellen gezeigt werden (Sugiura et al. 1998; Liu et al. 2000), dabei ist der CB1R an die Aktivierung der AKT gekoppelt (Gómez Del Pulgar 2000). Anandamid induziert die Bildung von NO und dies führt im nachfolgenden Schritt zur cGMP-Bildung (Simmons und Murphy 1992; 1994; Fimiani et al. 1999). In Gefäßen kann Anandamid eine Vasodilatation durch einen endothelabhängigen NO-Anstieg bewirken (Deutsch et al. 1997; McCollum et al. 2007).

1.4.1.3 Einfluss von Cannabinoiden in der Ischämie und Reperfusion

Eine Beteiligung endogener Cannabinoide in der myokardialen Ischämie / Reperfusion wurde erstmals von Wagner et al. (2001b) im Ratten-Modell gezeigt. Verschiedene Studien belegten nachfolgend, dass eine RISK-Aktivierung durch Cannabinoide ischämisch-reperfundierte Herzen schützt und dieser protektive Einfluss eine bedeutende Rolle bei der ischämischen Prä- und Postkonditionierung spielt (Lagneux und Lamontagne 2001; Lépicier et al. 2003, 2006; Lamontagne et al. 2006; Hajrasouliha et al. 2008). An isolierten Rattenherzen wurde bereits gezeigt, dass eine CB1- und CB2-R-Aktivierung eine protektive Wirkung auf das ischämische präkonditionierte Herz vermittelt (Joyex et al. 2002; Bouchard et al. 2003). Eine Evidenz für die kardioprotektiven Eigenschaften von Cannabinoiden in der Reperfusion wurde ebenfalls an isolierten Rattenherzen erbracht. Cannabinoide aktivieren dabei die PKC, p38 MAP-Kinase und den ERK1 / 2-Signalweg und können dadurch die Infarktgröße in reperfundierten Herzen reduzieren (Lépicier et al. 2003).

Über den Einfluss von Cannabinoiden an koronaren Endothelzellen nach vollzogener Ischämie ist bisher noch wenig bekannt. In der vorliegenden Arbeit soll detailliert untersucht werden, ob Cannabinoid R1M einen protektiven Effekt auf ischämisch-reperfundierte koronare Endothelzellen hat.

1.5 Zelltod

1.5.1 Einfluss von Ischämie und Reperfusion auf Nekrose

Ischämie und Reperfusion führt zu nekrotischem Zelltod in den betroffenen Geweben (Gottlieb et al. 1994; Taimor et al. 1999; Holleyman et al. 2001). Zu den zellschädigenden Mechanismen gehört die Veränderung des Phosphorylierungszustandes von Proteinen und damit einhergehende Störungen der zytoskeletalen Stabilität (Noll et al. 1995; Tiruppathi et al. 2002). Bei Schädigungen an der Zellmembran kommt es zum osmotisch bedingten Wassereinstrom. Die Zellmembran schwillt an und es treten die charakteristischen Zeichen eines nekrotischen Zelltodes auf. Dazu gehören Kondensation der Kernsubstanz, Fragmentierung der DNA und die Ruptur der Zellmembran und Organellen. Dieser folgende Zellzerfall führt zum Freiwerden zytoplasmatischer Zellbestandteile, aber auch von chemotaktisch wirksamen Zellkomponenten, welche eine für die Nekrose charakteristische Entzündungsreaktion bedingt (Böcker et al. 2008).

1.5.2 Einfluss von Cannabinoiden auf reperfusionsinduzierte Nekroseentwicklung

An verschiedenen Organen wie Leber (Bátkai et al. 2007; Rajesh et al. 2007), im Gehirn (Zhang et al. 2007) und an Herzen (Joyeux et al. 2002; Hiley und Ford 2004; Underdown et al. 2005; Lamontagne et al. 2006) konnte gezeigt werden, dass Cannabinoide eine Reduktion von ischämie- und reperfusionsinduzierter Nekrose bewirken können. Auch im Zellkulturmodell konnte die Anzahl nekrotischer Kardiomyozyten nach Ischämie und Reperfusion erfolgreich durch Cannabinoide verringert werden (Defer et al. 2009).

1.6 Zielsetzung und Fragestellung

Die Erkenntnisse hinsichtlich der Wirkung ischämischer Postkonditionierung und Cannabinoiden auf koronare Endothelzellen bleiben die bisherigen Erkenntnisse vage. Deshalb sollten in der vorliegenden Arbeit die Zusammenhänge zwischen Cannabinoidrezeptor-Aktivierung und Endothelzellschädigung bei Ischämie und Reperfusion genauer charakterisiert werden.

Das Ziel der vorliegenden Arbeiten bestand darin zu untersuchen,

ob ischämische Postkonditionierung isolierte koronare Endothelzellen gegen die ischämie- und reperfusioninduzierte Lückenbildung schützen kann und

welche intrazellulären Signaltransduktionswege an der ischämischen Postkonditionierung in diesem Zellkulturmodell beteiligt sind?

In einer weiteren Versuchsreihe sollte untersucht werden, ob die protektiven Eigenschaften von Cannabinoiden am Herzen auf isolierte koronare Endothelzellen übertragen werden können. Dazu wurde weiterhin untersucht,

ob sich der Cannabinoidrezeptoragonist R1M protektiv auf die ischämie- und reperfusionsinduzierte Lückenbildung auswirkt,

welche Rezeptoren und Signaltransduktionswege an dieser Protektion beteiligt sind

und welchen Einfluss R1M auf den Zelltod ausübt.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Substanzen

AM251	Alexis Deutschland, Grünberg
AM630	Alexis Deutschland, Grünberg
BAPTA	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Calciumchlorid entwässert, gepulvert	Merck, Darmstadt
Carbogen (O ₂ 95%/CO ₂ 5%)	Messer Griesheim, Krefeld
Cystein	Fluka, Taufkirchen
DMSO	Calbiochem, Bad Soden
D-Glucose-Monohydrat	Merck, Darmstadt
EGTA	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ethanol	Roth, Karlsruhe
FCS	Gibco BRL, Eggenstein
Fura-2 AM	Invitrogen, Karlsruhe
Fungizone	Invitrogen, Karlsruhe

Material und Methoden

Glukose	Merck, Darmstadt
HEPES	Roth, Karlsruhe
Imidazol	Merck, Darmstadt
Ionomycin	Calbiochem, Bad Soden
KCl	Merck, Darmstadt
KH_2PO_4	Merck, Darmstadt
KT5823	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
L-NAME, HCl	Calbiochem, Bad Soden
LY294002	Alexis Deutschland, Grünberg
Medium199/ Earl`s Salts	Biochrom, Berlin
MgSO_4	Merck, Darmstadt
N_2	Messer Griesheim, Krefeld
NaHCO_3	Merck, Darmstadt
NCS	Invitrogen, Karlsruhe
NaCl	Merck, Darmstadt
Penicillin-Streptomycin	Invitrogen, Karlsruhe
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Resazurin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
R-1 Methanandamid	Alexis Deutschland, Grünberg
Trypsin-EDTA	Invitrogen, Karlsruhe

Die übrigen verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Calbiochem (Bad Soden), Invitrogen (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) und Sigma (Taufkirchen) in der höchsten erhältlichen Qualität bezogen.

Alle verwendeten Chemikalien wurden nach Herstellerangaben gelöst und aufbewahrt.

2.1.2 Puffer und Lösungen

2.1.2.1 Zellkulturmedien

Häufig verwendete Puffer wurden als mehrfach konzentrierte Stammlösungen mit destilliertem Wasser angesetzt.

M199/HEPES-Stammlösung

Zusammensetzung

Medium 199	9,8 g / l
HEPES	36 g / l

Der pH-Wert wurde mit 8N NaOH auf 7,4 bei 30°C eingestellt.

Material und Methoden

Medium 199/ CO₂–Medium

Zusammensetzung

Medium 199	9,8 g / l
HEPES	15 mM
NaHCO ₃	24 mM

pH 7,4 bei 5% (vol/vol) CO₂

Kultivierungsmedium

Zusammensetzung

Medium 199/CO ₂		x ml
Mixed Serum (NCS/FCS = 1/1)		20% (vol/vol)
Penicillin / Streptomycin	1.und 2.Tag	5% (vol/vol)
	ab dem 3. Tag	2% (vol/vol)
Fungizone	1. und 2.Tag	5% (vol/vol)

pH 7,4 bei 5% (vol/vol) CO₂.

Beladungsmedium

Zusammensetzung

Medium 199/HEPES- Stammlösung	x ml
FCS	3 %

Alle Medien wurden bei 4°C aufbewahrt.

2.1.2.2 Perfusionsmedien

Normoxische / anoxische HEPES-gepufferte Tyrode-Lösung:

Zusammensetzung

NaCl	140,0 mM
KCl	2,6 mM
KH ₂ PO ₄	1,2 mM
MgSO ₄	1,2 mM
CaCl ₂	1,3 mM
HEPES	25,0 mM

Die pH-Werte der normoxischen beziehungsweise anoxischen Tyrode-Lösung wurden mit 8N NaOH auf 7,4 (Normoxiemedium), beziehungsweise auf 6,4 (Anoxiemedium) bei 30°C eingestellt.

Nach der von Allshire et al. (1987) beschriebenen Methode wurde die anoxische HEPES-gepufferte Tyrode-Lösung autoklaviert. Vor dem Autoklavieren wurde dem Medium Resazurin (1% vol/vol) und Cystein (5,0 mM) zugesetzt. Die Tyrode-Lösung wurde für 40 Minuten bei 2 bar und 120°C autoklaviert um eine Farblosigkeit des Mediums zu erhalten. Die Entfärbung ist ein Indikator für einen $pO_2 < 16 \mu Pa$.

2.1.3 Geräte und Laborbedarf

Zellkultur

Präparationsbesteck	Eickenmeyer, Tuttlingen
Langendorff-Apparatur	Eigenbau, Werkstatt des Physiologischen Instituts der JLU Giessen

Gewebehacker
Havard Apparatus über Hugo
Sachs Elektronik, March-
Hugstetten

Nylonnetz
NeoLab, Heidelberg

Sterilbank
Heraeus, Hanau

Brutschrank
Heraeus, Hanau

Mikroskop
TMS-F, Nikon, Japan

Fluoreszenzmessung

CCD Kamera
TillPhotonics, Gräfelfing

Computersoftware Tillvision
TillPhotonics, Gräfelfing

Dichroid-Spiegel und Emissionsfilter
Olympus, Hamburg

Inverses Mikroskop
Olympus, Hamburg

Monochromator
TillPhotonics, Gräfelfing

Xenonlampe
TillPhotonics, Gräfelfing

Anoxie-Reoxygenationsexperimente

Dampfdruckkochtopf
All American, Canada

Druckstabile Glasgefäße mit
verschließbarem Deckel
Bormioli Rocco, Italien

Gasdichte Schläuche	Kalensee, Giessen
Gasventile	Kalensee, Giessen
Edelstahlkapillaren	Alltech, Unterhaching
Perfusionshahn	Alltech, Unterhaching
Perfusionskammer	Eigenbau, Werkstatt des Physiologischen Instituts der JLU Giessen
Perfusionsheizung	Eigenbau, Werkstatt des Physiologischen Instituts der JLU Giessen
Peristaltikpumpe	Gilson-Abimed, Langenfeld
<u>Sonstige Geräte</u>	
Glasgeräte	Schott, Mainz
Inkubator	Heraeus, Hanau
Magnet-Heizrührer	Jahnke & Kunkel, Staufen
pH-Meter	WTW, Weilheim
Pipetten	Eppendorf-Nethler-Hinz, Hamburg
Wasserbad	Julabo, Seelbach

Wasserdemineralisierungsanlage

Millipore, Schwalbach

Zentrifugen

Heraeus, Hanau

Verbrauchsmaterialien

Kulturschalen

Becton Dickinson, Heidelberg

Typ: Falcon 3001 (3cm)

Typ: Falcon 3002 (5cm)

Typ: Falcon 3003 (10cm)

Pipettenspitzen

Eppendorf-Netheler-Hinz,
Hamburg

Reaktionsgefäße

Eppendorf-Netheler-Hinz,
Hamburg

Glasdeckgläser (Durchmesser 25mm)

Menzler Glas, Schwerte

2.2 Methoden

2.2.1 Versuche zur Simulation von Ischämie und Reperfusion an koronarvaskulären Endothelzellmonolayern

2.2.1.1 Versuchstiere

Für unser Modell wurden mikrovaskuläre Koronarendothelien von 200-300g schweren männlichen Wistar-Ratten verwendet. Die Tiere wurden im Tierstall des Physiologischen Institutes der Justus-Liebig-Universität gezüchtet und hatten freien Zugang zu Futter (Altromin[®]) und Wasser.

2.2.1.2 Isolierung und Kultivierung von mikrovaskulären koronaren Endothelzellen adulter Ratten

Die koronaren Endothelzellen wurden nach der von Piper et al. (1990) beschriebenen Methode isoliert.

Verwendete Lösungen:

Powell-Medium

Zusammensetzung

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

Ein konstanter pH-Wert von 7,4 bei 37°C wurde durch die kontinuierliche Begasung mit Carbogen gewährleistet.

Kollagenasepuffer

Zusammensetzung

Powell-Medium	50,0 ml
Kollagenase	x mg (chargenabhängig)
Ca ²⁺ Stammlösung (100 mM)	12,5 µl

Kultivierungsmedium

Medium 199/ CO₂

Zusammensetzung

Mixed Serum (NCS/FCS= 1/1)		20% (vol/vol)
Penicillin/ Streptomycin	1.und 2.Tag	5% (vol/vol)
	ab dem 3. Tag	2% (vol/vol)
Fungizone	1. und 2.Tag	5% (vol/vol)

Zu Beginn der Präparation der koronaren Endothelzellen wurde die Langendorff-Perfusionsanlage mit Perfusionspuffer luftblasenfrei gespült und auf 37°C erwärmt. Die Tiere wurden narkotisiert und durch Genickbruch getötet. Der Thorax wurde eröffnet, das Herz entfernt und sofort in kalte, isotonische NaCl-Lösung überführt. In dieser Lösung wurde das Herz von Geweberesten, wie anhängendem Mediastinal- und Pulmonalgewebe, freipräpariert, anschließend mit der Aorta in einer Langendorff-Perfusionsanlage eingebunden und retrograd im Langendorff-Modus perfundiert. Zunächst wurde das verbliebene Blut aus den Koronarien mit 40 ml Perfusionsmedium ausgewaschen.

Das Herz wurde anschließend mit kollagenasehaltigem Perfusionspuffer (2-3ml/min) rezirkulierend für 30 Minuten perfundiert. Während der Perfusion wurde das Medium konstant auf 37°C erwärmt und mit Carbogen begast. Nach Beendigung der Rezirkulationsphase wurde das Herz unterhalb der Vorhöfe von der Langendorff-Apparatur abgeschnitten und zunächst mechanisch mit einem Gewebehacker bei einer Schnittbreite von 0,7mm, anschließend manuell mit zwei Skalpellern zerkleinert. Danach wurde das so behandelte Gewebe 5 Minuten lang in Perfusionspuffer bei 37°C nachinkubiert, wobei die Vereinzelung der Endothelzellen durch behutsames Auf- und Absaugen mit einer 5 ml Pipette unterstützt wurde.

Darauf folgte die Filtration durch ein Nylonnetz mit 200µm Porengröße, um die verbliebenen Zellaggregate abzutrennen. Das Filtrat wurde anschließend bei 400 U/min für drei Minuten zentrifugiert um zunächst die Herzmuskelzellen von den Endothelzellen zu trennen.

Der Überstand wurde mit Trypsin und Ca^{2+} versetzt, bei 37°C 30 Minuten inkubiert und anschließend bei 2000 U/min für fünf Minuten zentrifugiert. Das erhaltene Zellpellet wurde auf Zellkulturschalen ausplattiert. Nach einer vierstündigen Inkubation im CO_2 -Brutschrank wurden die Endothelzellen gewaschen, mit 30 ml des Kultivierungsmediums überschichtet und im Brutschrank aufbewahrt. Das Kultivierungsmedium wurde in den ersten beiden Tagen alle 24, danach alle 48 Stunden gewechselt. Nach einer Woche waren die Endothelzellen konfluent und konnten trypsinisiert werden. Um tote Zellen, Zelldetritus und Verunreinigungen zu beseitigen, wurden die Zellen vorher mehrmals mit kalziumfreier HEPES-gepufferter Tyrodelösung gespült. Dies erleichterte die nachfolgende Trypsinierung, da bei diesem Vorgang Ca^{2+} aus den Zell-Zell- bzw. Zell-Umgebungskontakten gespült wird. Nun folgte eine zehnminütige Inkubation mit 5 ml Trypsin bei 37°C , um die Endothelzellen anschließend mechanisch mittels einer 10 ml Pipette durch Auf- und Absaugen voneinander zu trennen. Die Zellsuspension wurde in 37°C warmes Kultivierungsmedium gegeben und in 3 cm Falconkulturschalen, die jeweils mit einem 25 mm Glasdeckgläschen versehen waren, ausplattiert. Drei Tage nach der Ausplattierung war auf dem Glasdeckgläschen ein konfluent Monolayer gewachsen, der für die Anoxie-Reoxygenationsversuche verwendet werden konnte (siehe Abb. 2.2.1.2).

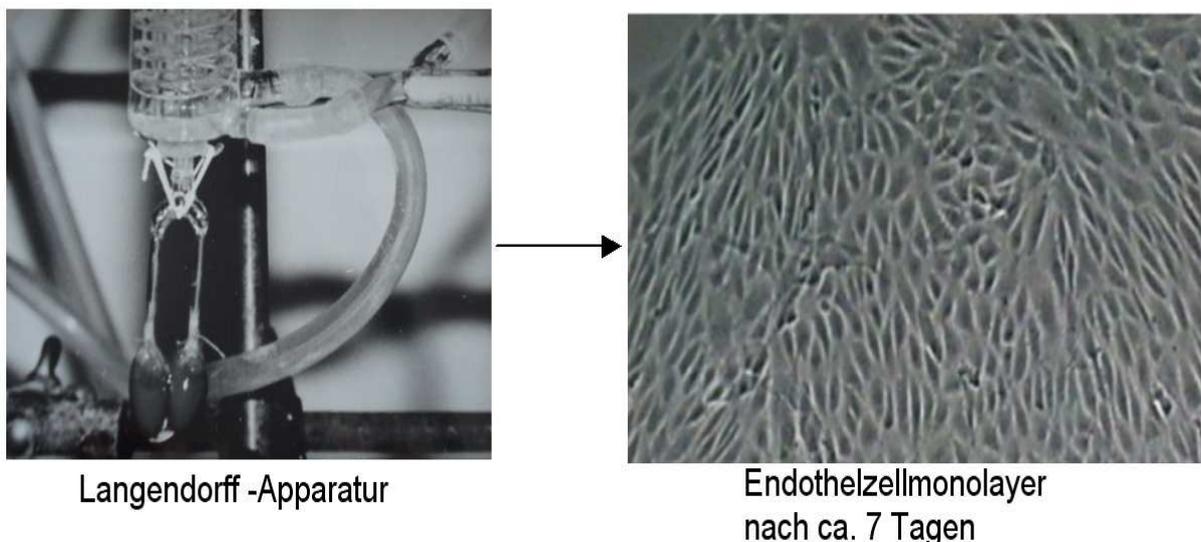


Abb. 2.2.1.2 Darstellung der Langendorff-Perfusion an isolierten Herzen. Nach der Perfusion mit kollagenasehaltigem Puffer und der darauffolgenden Trennung von anderen Bestandteilen wurden die Endothelzellen ausplattiert. Nach ca. 7 Tagen ist ein konfluent Monolayer in der Mutterschale gewachsen, der weiterverarbeitet werden kann.

2.2.2 Experimente

2.2.2.1 Anoxie- Reoxygenationsversuche

Versuchsbeschreibung

Um Ischämie- und Reperfusionsbedingungen zu simulieren wurden Anoxie- und Reoxygenationsversuche durchgeführt.

Das mit Endothelzellen behaftete Deckgläschen wurde gasdicht in eine Perfusionskammer (1ml Volumen) eingebaut. Diese Kammer war durch Edelstahlkapillaren mit zwei Gefäßen verbunden, welche anoxisches beziehungsweise normoxisches Medium enthielten. An die Kammer wurde eine Peristaltikpumpe angeschlossen, die das Perfusionssystem mit einer Geschwindigkeit von 0,5 ml/min kontinuierlich mit Medium durchspülte. Das anoxische HEPES-Medium wurde vor und während der Versuche kontinuierlich mit N₂ (100%) begast, das normoxische HEPES-Medium mit Raumtemperatur äquilibriert.

Jeder Versuch begann mit einer 5-minütigen Vorlaufphase, in der den Endothelzellen normoxisches Medium mit einem pH-Wert von 7,4 zugeführt wurde. In der 40-minütigen simulierten Ischämie wurden die Zellen mit einer anoxischen, HEPES-gepufferten Tyrode-Lösung (pH 6,4) glukosefrei perfundiert. In der folgenden 40-minütigen Reoxygenation wurden die Zellen mit einem normoxischen Medium (pH 7,4) unter Zugabe von 5 mM Glukose superfundiert. Sowohl in der Anoxie- als auch in der Reoxygenationsphase wurden verschiedene Bedingungen und Substanzen getestet.

2.2.2.2 Ermittlung der intrazellulären Ionenkonzentration von Ca²⁺ mittels Fluoreszenzmikroskopie

Zur Bestimmung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration wurden die Zellen für 60 Minuten bei Raumtemperatur mit Fura-2 AM (2,5µM) beladen. Dazu wurde dieser Fluoreszenzfarbstoff in 1ml HEPES-Medium 199 mit 3% FCS gelöst.

Fura-2 AM gelangt als Acetoxymethylester in die Endothelzellen und wird dort von intrazellulären Esterasen gespalten. Als geladenes Molekül kann es die Zellmembran nicht mehr permeieren.

Mit Hilfe eines inversen Mikroskops, welches an das Imaging-System angeschlossen war, konnten die Messungen durchgeführt werden. Das von einer Xenonlampe generierte Licht wurde mittels eines dispergierenden Prismas stufenlos aufgefächert. Mit Hilfe eines Monochromators wurden die dem Anregungsspektrum des verwendeten Fluoreszenzfarbstoffes entsprechenden Wellenlängen ausgewählt. Die selektierten Wellenlängen für Fura-2 AM für die Ca^{2+} -Bestimmung betragen 340 nm und 380 nm. Das Emissionsmaximum von Fura-2 AM liegt bei ~510 nm. Das monochromatische Licht wurde über ein Glasfaserkabel auf einen Dichroismspiegel gelenkt, welcher das Exzitationslicht auf die Perfusionskammer umlenkt. Das vom Farbstoff emittierte Licht gelangte über den Dichroismspiegel und durch einen Emissionsfilter schließlich zu einer Kamera, die das eintreffende Signal aufzeichnete (siehe Abb. 2.2.2.2). Die Daten wurden durch die zugehörige Computer-Software Tillvision ausgewertet.

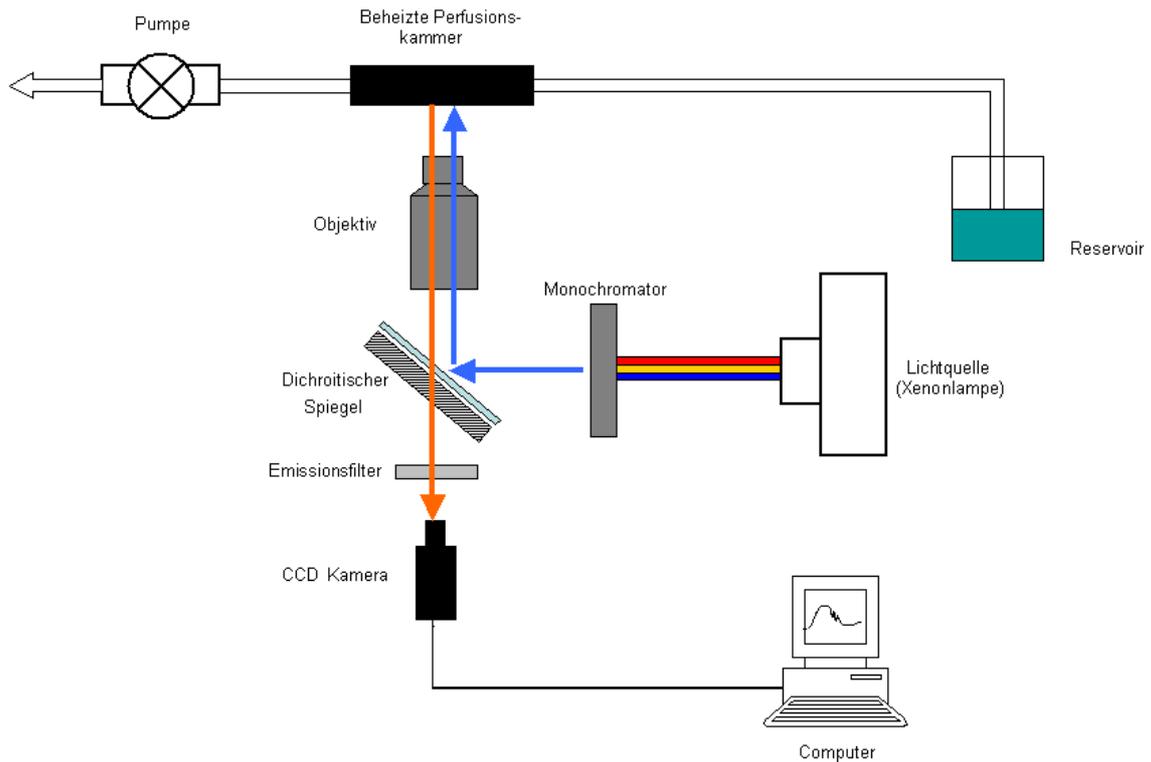


Abb. 2.2.2.2 Vereinfachte schematische Darstellung der Versuchsanordnung. Der Strahlengang des Anregungslichts ist als blauer, der Strahlengang des Fluoreszenzlichtes als orangefarbener Pfeil dargestellt.

Die Daten der Fura-2 AM Messungen wurden als Quotient (engl. Ratio) R der Emissionsintensitäten bei den Anregungswellenlängen 340 nm und 380 nm ($340\text{nm}/380\text{nm}$) angegeben.

Die freie Ca^{2+} -Konzentration wurde nach der folgenden Formel (Grynkiewicz et al. 1985) berechnet:

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

- Ca^{2+} : Zytosolische Kalziumkonzentration
- Kd-Wert: Maß für die Affinität von Fura-2 AM zu freien zytosolischen Ca^{2+} -Ionen. Dieser Wert ist abhängig vom pH-Wert. Grynkiewicz et al. (1985) bestimmten in vitro einen Kd-Wert für Fura-2 AM von 224 nmol/l. In vivo ermittelte Ladilov et al. (2000) bei pH 7,2 einen Kd-Wert von 309 ± 8 nmol/l (n=6) und bei pH 6,5 einen Kd-Wert von 347 ± 7 nmol/l (n=5). Die nach Ladilov et al. (2000) ermittelten Kd-Werte wurden zur Bestimmung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration verwendet.
- b: Quotient aus Emissionsintensität der 380nm Wellenlänge des R_{\min} -Wertes durch Emissionsintensität der 380nm Wellenlänge des R_{\max} -Wertes
- R: Fura-2-Ratio (340nm / 380nm)
- R_{\max} : Maximales Ratio (maximaler Quotient)
- R_{\min} : Minimales Ratio (minimaler Quotient)

Die Kalibrierung wurde nach dem von Li et al. (1987) beschriebenen Protokoll modifiziert durchgeführt.

Kalibrierungslösung

KCl	125 mM
NaCl	10 mM
MgSO ₄	1 mM
HEPES	25 mM
Ionomycin	5 µM
CaCl ₂ oder EGTA	3 mM oder 5 mM
BAPTA	10 µM

Der pH-Wert wurde mit 1N KOH auf 7,4 bei 30°C eingestellt.

Durch Zugabe von 3 mM CaCl_2 wurde der R_{max} -Wert, unter Zufügung von 5 mM EGTA und 10 μM BAPTA der R_{min} -Wert bestimmt.

2.2.2.3 Größenbestimmung der Interzellularspalten

Als Maß für die endotheliale Barrierenfunktion wird in diesem Modell die Interzellularspaltenbildung gemessen. Dazu war es notwendig, eine Anregungswellenlänge zu wählen, deren Emission nicht von der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration abhängig ist. Die isosbestische Wellenlänge wird als eine Wellenlänge beschrieben, bei der sich in einem System, in dem eine Reaktion stattfindet, die Lichtabsorption im Verlauf der Reaktion nicht ändert. In unserem verwendeten Modell beträgt die isosbestische Wellenlänge 360nm. Die Sequenz der einzelnen Bilder wurde binarisiert. Das bedeutet, dass die Pixel, also Bildbereiche, mit Fura-2 AM-Fluoreszenzsignal der Wert 1, Pixel ohne Fura-2 AM-Fluoreszenzsignal der Wert 0 zugeordnet wurde. Diese „0-Bereiche“ repräsentieren Lücken, also zellfreie Flächen, die „1-Bereiche“ zellbedeckte Flächen. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des Programms Tillvision, welches die 0-Pixel für jedes Einzelbild eines kompletten Versuchs zusammenzählte.

Am Versuchsbeginn (5-minütige, normoxische Vorlaufphase; pH 7,4, glukosefrei) betrug die Größe der Interzellularspalten zwischen 6000-8000 Pixel. Während einer simulierten Ischämie (pH 6,4) kommt es typischerweise zur einer deutlichen Zunahme der Interzellularspalten und somit auch der Pixel. In der sich anschließenden Reoxygenation (pH 7,4, 5mM Glukose) wird die Größenzunahme der Interzellularspalten noch weiter verstärkt (siehe Abb. 2.2.2.3). Die Anzahl der 0-Pixel während der 5-minütigen Vorlaufzeit wurde auf 0 %, die am Ende der Anoxie auf 100 % gesetzt. Die prozentuale Zunahme der interzellulären Lückenbildung konnte somit im Verhältnis zur Zellfläche ermittelt werden. Für die Auswertung wurde die Größenzunahme der Interzellularspalten während der Reperfusion prozentual auf die Änderung in der Anoxie bezogen.

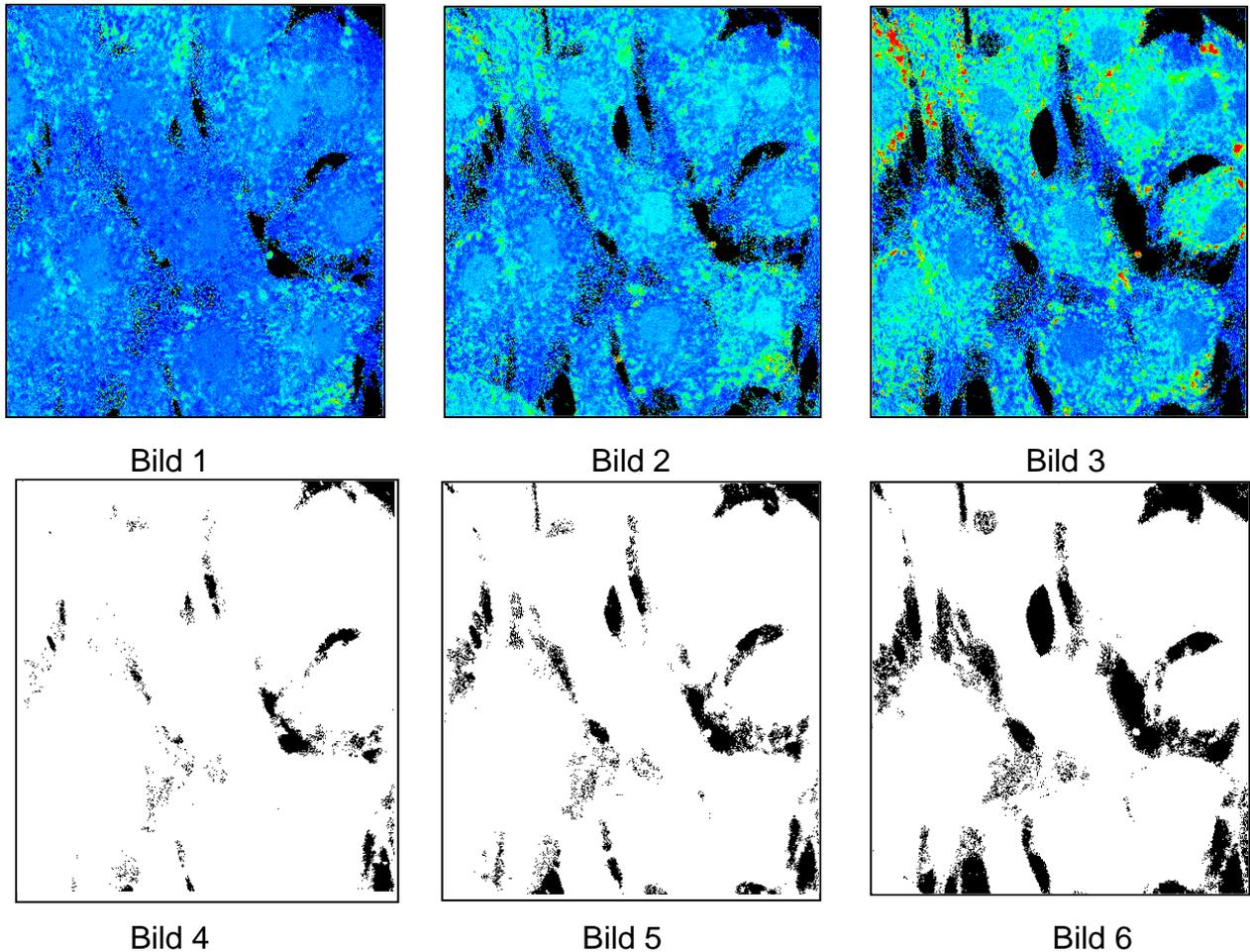


Abb. 2.2.2.3 Abbildungen der mit Fura-2-AM beladenen Endothelzellen. Bilder 1-3 zeigen Originalaufnahmen mit dazugehörigen binarisierten Bildern (4-6) in der normoxischen Vorlaufphase (1/4), nach der Anoxie (2/5) und nach der Reperfusion (3/6).

2.2.2.4 Methode zur Erfassung von Nekrose in koronaren Endothelzellen

Quantitativer Nekrose-Nachweis mittels Propidiumiodid (PI) Färbung

Propidiumiodid ist ein nicht zellmembrangängiger DNA-Farbstoff. Nur Zellkerne von Zellen, deren Zellmembran geschädigt ist, werden angefärbt. Propidiumiodid zeigt nach Anregung mit Licht von 586 nm Wellenlänge eine intensive rote Fluoreszenz (617 nm= Emissionsmaximum).

Das Glasdeckgläschen mit dem Endothelmonolayer wurde für 60 Minuten mit dem Farbstoff Fura-2 AM beladen.

Um die Anzahl nekrotischer Endothelzellen unter normoxischen Bedingungen (ohne Ischämie-/ Reperfusionsversuche) zu ermitteln, wurden die Zellen 4 Stunden bei 30°C unter Zugabe von PI (5µl/ml Normoxiemedium (pH 7,4 glukosefrei) im Dunkeln inkubiert.

Weiterhin wurden simulierte Ischämie- und Reperfusionsversuche durchgeführt und der Einfluss von R1M sowie R1M+L-NAME auf die Endothelzellnekrose untersucht. Am Versuchsende wurde das mit Endothelzellen behaftete Glasdeckgläschen in eine Falconkulturschale überführt und ebenfalls unter Zugabe von PI (5 µl/ml Reperfusionsmedium pH 7,4; 5mM Glukose) für 4 Stunden bei 30°C im Dunkeln inkubiert.

Pro Schale wurden bei den Versuchsreihen fünf zufällig ausgewählte Gesichtfelder ausgezählt und daraus die Nekroserate berechnet.

3 Protokolle

3.1 Experimentelles Protokoll

Jeder Versuch begann mit einer 5-minütigen Vorlaufphase, in der den Endothelzellen normoxisches Medium mit einem pH-Wert von 7,4 zugeführt wurde. Um Ischämie und Reperusionsbedingungen zu simulieren, wurden die Zellen 40 Minuten mit einer anoxischen HEPES-gepufferten Tyrode-Lösung (pH 6,4, glukosefrei) superfundiert und anschließend 40 Minuten mit normoxischem Medium (pH 7,4) unter Zugabe von 5mM Glukose reoxygeniert. Sowohl in der Anoxie, als auch in der Reoxygenationsphase wurden verschiedene Bedingungen und Substanzen getestet. Zu festgelegten Zeitpunkten wurden die unten aufgeführten Substanzen eingewaschen.

Die folgende Tabelle zeigt die verwendeten Substanzen mit ihren Eigenschaften und eingesetzten Konzentrationen:

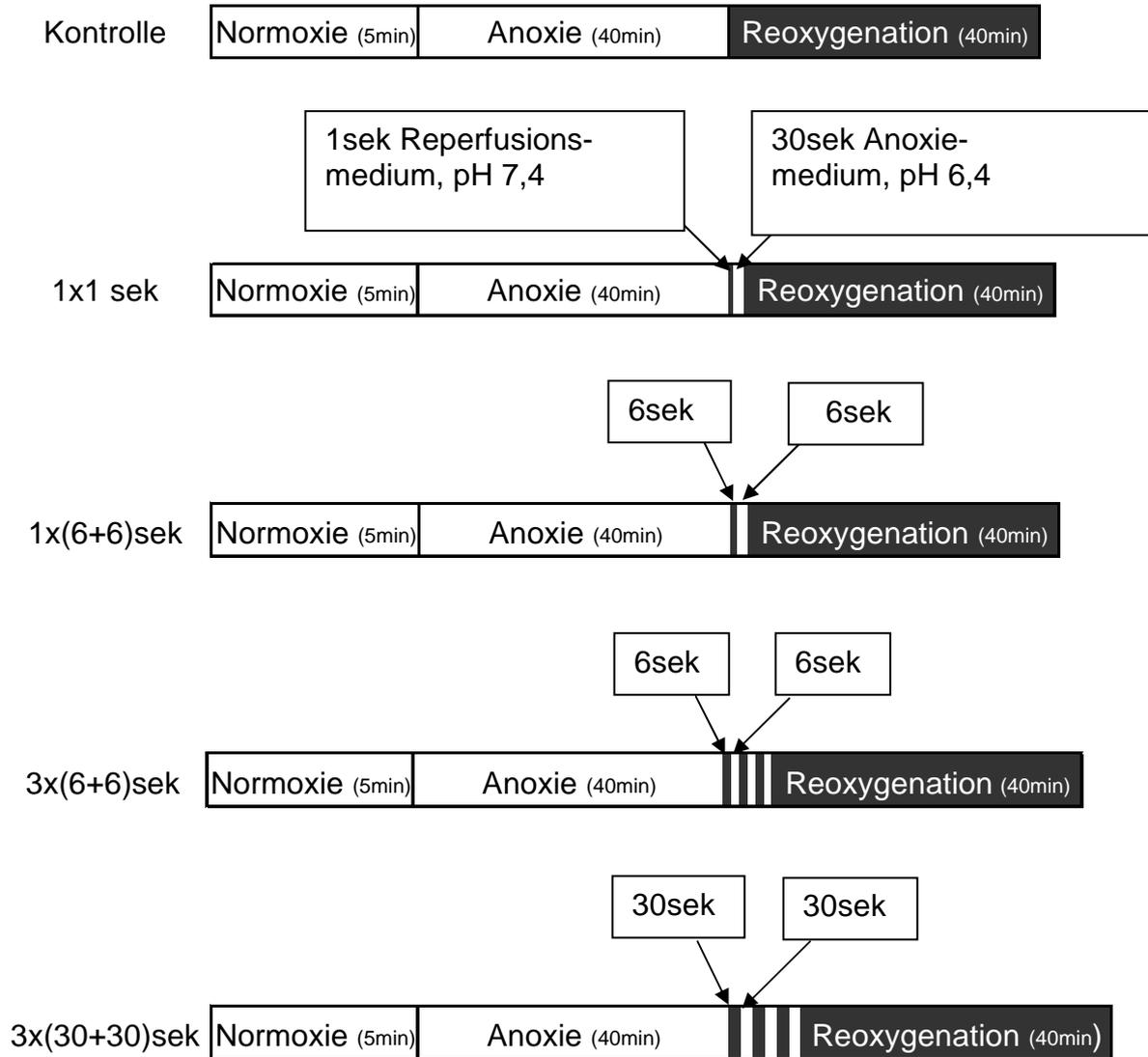
Tabelle 3.1:

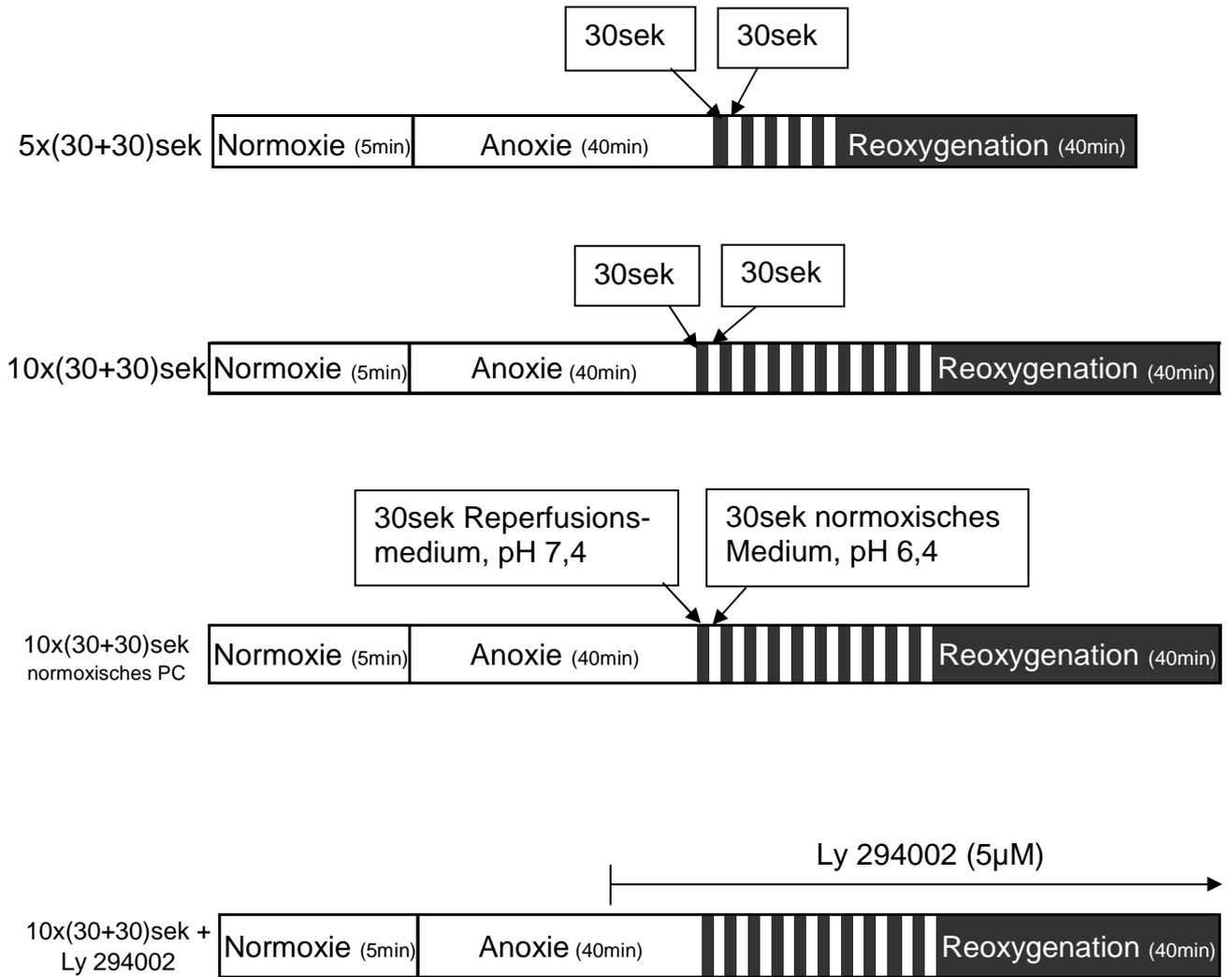
Substanz	Konzentration	Eigenschaft
Ly294002	5 μ M	spezifischer PI3-Kinase-Inhibitor
R1M	10 μ M	Cannabinoidrezeptoragonist (CB1 und CB2)
AM251	0,25 μ M	CB1-Rezeptortantagonist
AM630	0,3 μ M	CB2-Rezeptorantagonist
L-NAME, HCl	200 μ M	NOS-Inhibitor
KT5823	0,5 μ M	PKG-Inhibitor

3.2 Protokolle der Anoxie- und Reoxygenationsversuche

3.2.1 Ischämische Postkonditionierung

Protokollname:





Der PI3K-Inhibitor Ly294002 wurde 10 Minuten vor Ende der Anoxie und während der gesamten Reperfusion appliziert

In Anlehnung an das Protokoll 10x(30+30)sek+Ly294002 wurden auch Hemmstoffversuche mit 5x(30+30) Zyklen Anoxie und Reperfusion durchgeführt.

3.2.2 Pharmakologische Postkonditionierung

Tabelle 3.2.2:

Protokollname	Normoxie (pH 7,4; glukosefrei) (5 min)	Anoxie (pH 6,4; glukosefrei) (40 min)	Reperfusion (pH 7,4; 5mM Glukose) (40 min)
Kontrolle(KTR)	Hepes	Hepes	Hepes
R1M	Hepes	Hepes	Hepes +R1M (10 µM)
R1M + AM251	Hepes	Hepes	Hepes +R1M (10 µM) +AM251 (0,25 µM)
R1M + AM630	Hepes	Hepes	Hepes + R1M (10 µM) +AM630 (0,3 µM)
R1M + L-NAME	Hepes	Hepes + L-NAME (200 µM) ab Minute 30	Hepes + R1M (10 µM) +L-NAME (200 µM)
R1M + KT5823	Hepes	Hepes	Hepes + R1M (10 µM) + KT 5823 (0,5 µM)

3.3 Messparameter

Folgende Parameter wurden in den Experimenten bestimmt:

Tabelle 3.3:

Parameter	Einheit	Methode
Zytosolischer Ca ²⁺ -Gehalt	in relativen Einheiten [r.E.] des Fura-2-Quotienten	Fura-2-Quotient
Interzellulärspaltenbildung	in Prozent, bezogen auf die Lückenbildung während der Anoxie	Fura-2, planimetrische Analyse
Nekroserate	in Prozent	quantitative Zellzählung

3.4 Statistik

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

4 Ergebnisse

4.1 Veränderung der interzellulären Lückenbildung und der zytosolischen Kalziumkonzentration von koronaren Endothelzellmonolayern während simulierter Ischämie und Reperfusion

Es wurden Ischämie und Reperusionsbedingungen im Zellkulturmodell simuliert und die interzelluläre Lückenbildung und die intrazelluläre Kalziumkonzentration gemessen. In der Reoxygenationsphase wurden verschiedene ischämische und pharmakologische Postkonditionierungsversuche unternommen.

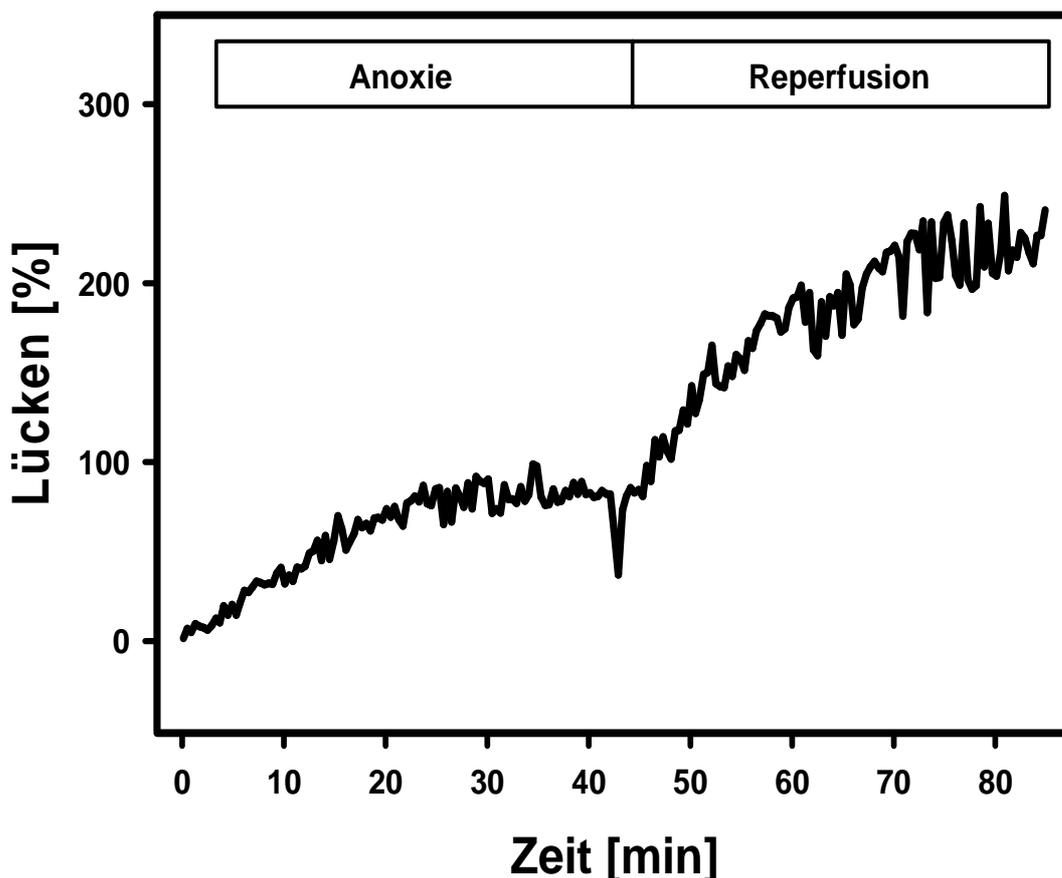


Abb. 4.1a Exemplarischer Verlauf der Lückenbildung an koronaren Endothelzellmonolayern während 5-minütiger normoxischer Vorlaufphase, simulierter Ischämie (40 min) und simulierter Reperfusion (40 min) unter Kontrollbedingungen. Dargestellt ist die Lückenbildung in Prozent bezogen auf die endanoxische Lückenbildung, die auf 100% gesetzt wurde.

In Abb. 4.1a ist ein repräsentatives Einzelexperiment im Zeitverlauf dargestellt. Während der 40 minütigen Reperfusion vervielfachte sich unter Kontrollbedingungen die Lückenbildung, verglichen mit der Lückenbildung in der anoxischen Phase, typischerweise auf 200% bis 400%.

Da die kalziumabhängige Aktivierung des endothelialen kontraktiven Apparates bei der Interzellularspaltenbildung während Ischämie und Reperfusion eine entscheidende Rolle spielt (Schäfer et al. 2003), wurde der Verlauf der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration mithilfe des Fluoreszenzfarbstoffes Fura-2 AM gemessen.

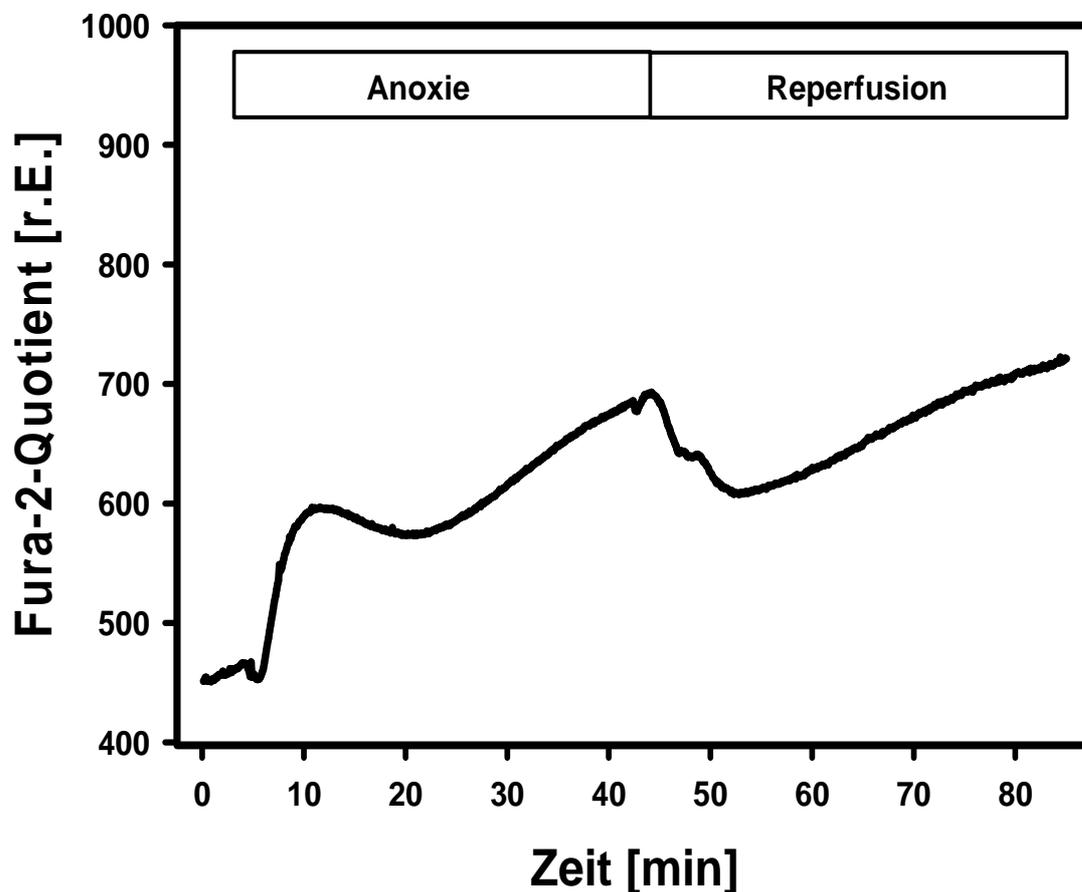


Abb. 4.1b Exemplarischer Verlauf des Fura-2-Quotienten als Maß für die Ca^{2+} -Konzentration unter Kontrollbedingungen (5 min normoxische Vorlaufphase, 40 min simulierte Ischämie, 40 min simulierte Reperfusion), dargestellt in relativen Einheiten [r. E.].

Während der anoxischen Perfusion entwickelten die Endothelzellen einen biphasischen Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration. Der initiale, transiente Kalziumanstieg zeigte sich in den ersten Minuten der Anoxie. An ihn schloss sich regelmäßig ein kontinuierlicher Kalziumanstieg an, der bis zum Ende der Anoxie andauerte und sich auch in der Reperfusion fortsetzte (Abb. 4.1b).

In der Anoxie stieg der Fura-2-Quotient in den Versuchen vom präanoxischen Ausgangswert 460 ± 12 r.E., endanoxisch auf 676 ± 31 r.E., bis auf 734 ± 42 r.E. am Reperfusionseende.

4.2 Postkonditionierung an isolierten Endothelzellmonolayern während simulierter Ischämie und Reperfusion

4.2.1 Wirkung ischämischer Postkonditionierung auf die interzelluläre Lückenbildung und die zytosolische Kalziumkonzentration

Um zu untersuchen, ob koronare Endothelzellen durch ischämische Postkonditionierung vor dem Ischämie- / Reperfusionsschaden geschützt werden können, wurden verschiedene Perfusionsprotokolle (siehe Kapitel 3.2.1) erstellt und an kultivierten Endothelzellen unter simulierten Ischämie- und Reperfluionsbedingungen angewendet.

Die Abbildung 4.2.1a zeigt exemplarisch den Einfluss eines protektiv wirkenden Postkonditionierungsprotokolls („10x30+30“) auf die Interzellulärspaltenbildung.

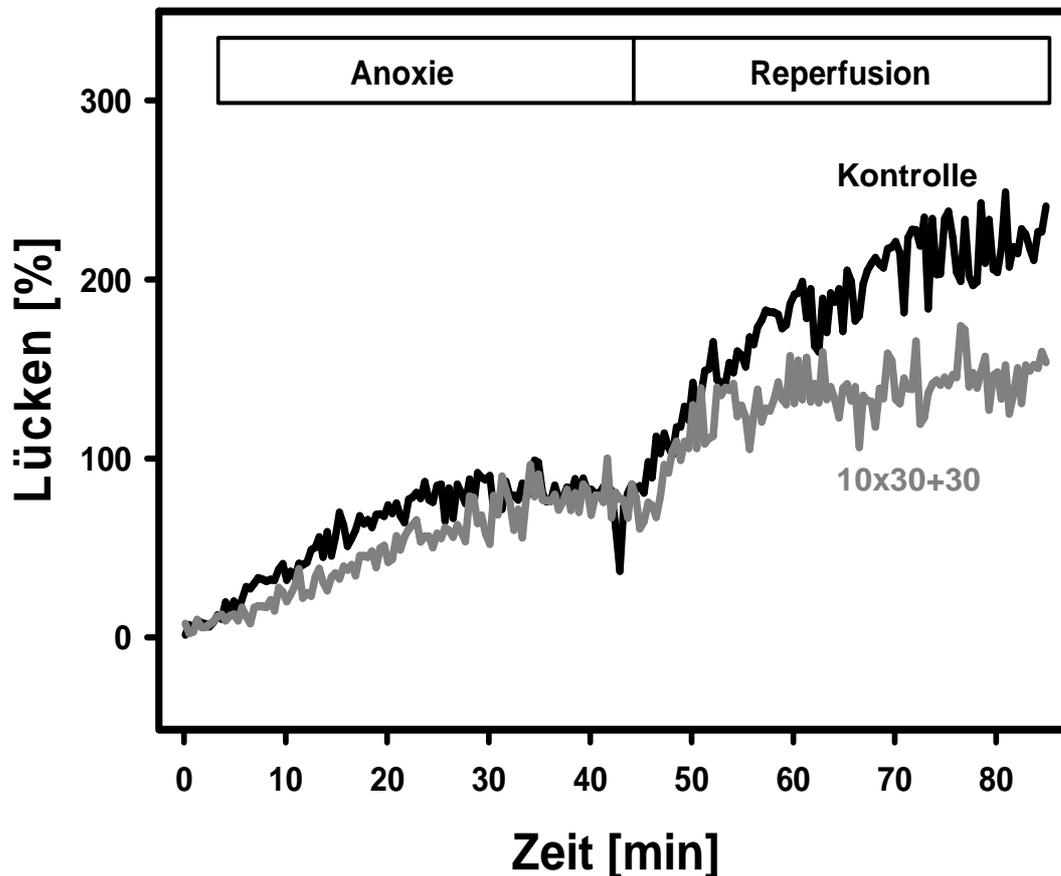


Abb. 4.2.1a zeigt exemplarisch den Verlauf der interzellulären Lückenbildung unter simulierten Ischämie- und Reperfusionsbedingungen bei Anwendung ischämischer Postkonditionierung (Protokoll „10x30+30“) und unter Kontrollbedingungen. Dargestellt sind die Mittelwerte der Lückenbildung in Prozent.

Die Durchführung des Protokolls „10x30+30sek“ führte zu einer verringerten Bildung reperfusionsinduzierter interzellulärer Lücken im Vergleich zur Kontrolle.

Den Verlauf der intrazellulären Kalziumkonzentration während ischämischer Postkonditionierung nach Protokoll „10x30+30sek“ zeigt die nächste Abbildung exemplarisch:

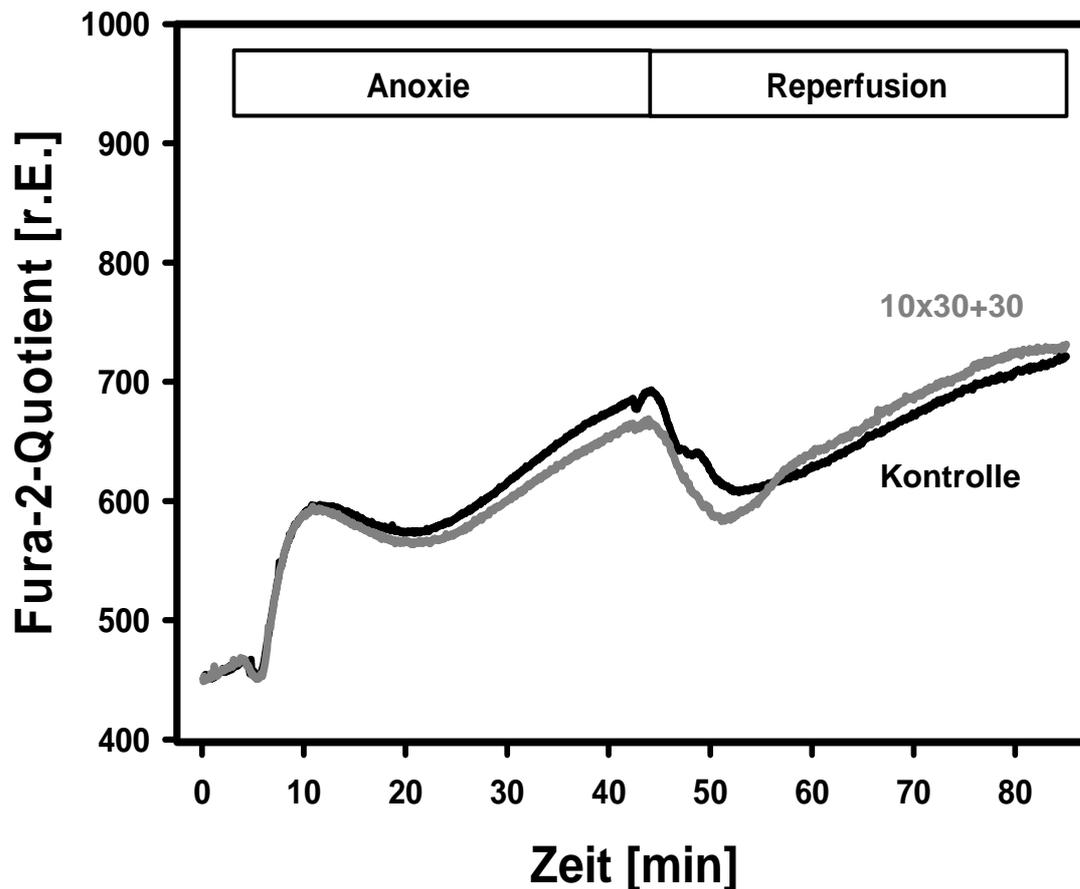


Abb. 4.2.1b Exemplarischer Verlauf des intrazellulären Fura-2-Quotienten unter simulierten Ischämie- und Reperusionsbedingungen bei Anwendung eines ischämischen Postkonditionierungsprotokolls („10x30+30“) und unter Kontrollbedingungen, dargestellt als relative Einheit [r.E.].

Die Durchführung des Postkonditionierungsprotokolls „10x30+30sek“ zeigte im Vergleich zur Kontrolle keinen signifikanten Einfluss auf die intrazelluläre Kalziumhomöostase während der Reperfusion.

4.2.1.1 Einfluss verschiedener ischämischer Postkonditionierungsprotokolle auf die interzelluläre Lückenbildung und die zytosolische Kalziumkonzentration

Die Abbildung 4.2.1.1a zeigt die statistische Auswertung der Interzellulärspaltengröße am Ende der Reperfusionphase nach Anwendung der verschiedenen untersuchten Protokolle (siehe Kapitel 3.2.1) der ischämischen Postkonditionierung.

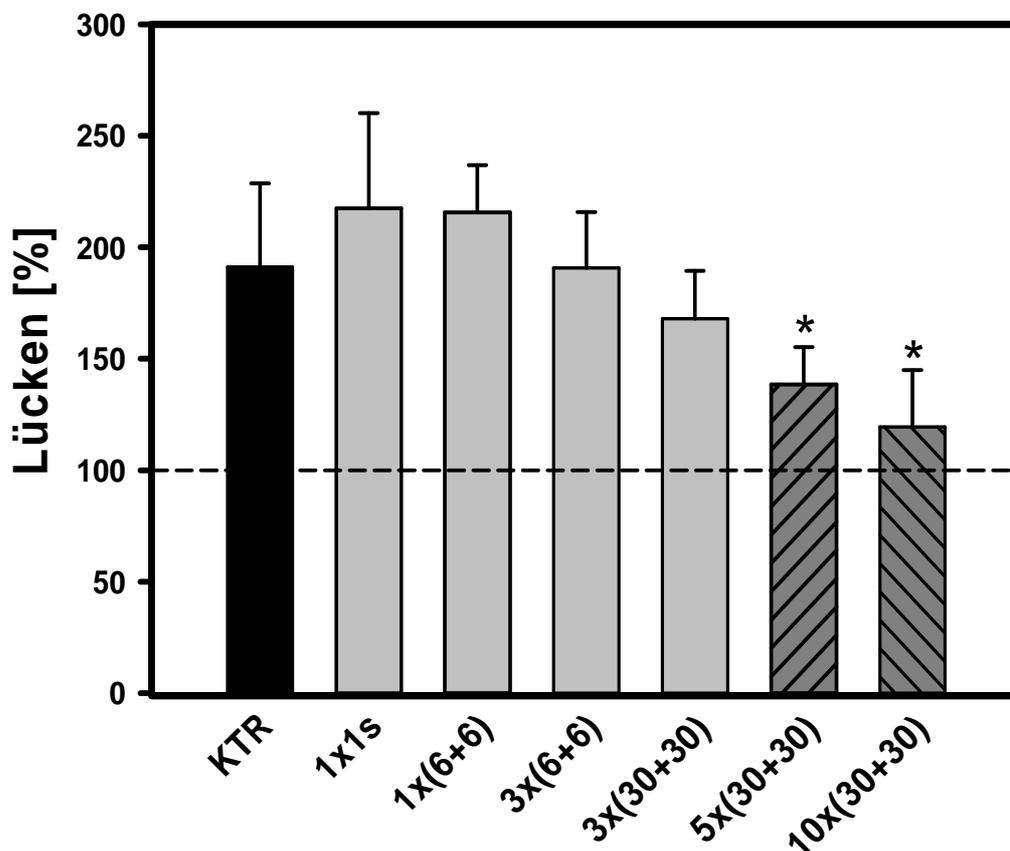


Abb. 4.2.1.1a zeigt die reperfusionsinduzierte Lückenbildung am Ende der 40-minütigen simulierten Reperfusion unter Kontrollbedingungen (KTR) und nach Anwendung verschiedener Reperusionsprotokolle. Dargestellt sind die Mittelwerte in Prozent \pm SEM (* $p < 0,05$ versus Kontrolle; $n \geq 4$). Die gestrichelte Linie markiert die endanoxische Lückenbildung, die auf 100% gesetzt wurde.

Erst bei Anwendung des Protokolls „5x(30+30)“ und „10x(30+30)“ kam es zu einer signifikanten Hemmung der interzellulären Lückenbildung.

Die Anwendung der Protokolle 1x1s, 1x(6+6), 3x(6+6) und 3x(30+30) zeigte hingegen in der Reduktion der Lückenbildung keinen signifikanten Unterschied zur Kontrolle.

Die Abbildung 4.2.1.1b zeigt die statistische Auswertung der gemessenen Kalziumkonzentrationen nach Anwendung der verschiedenen angewandten Reperfusionprotokolle.

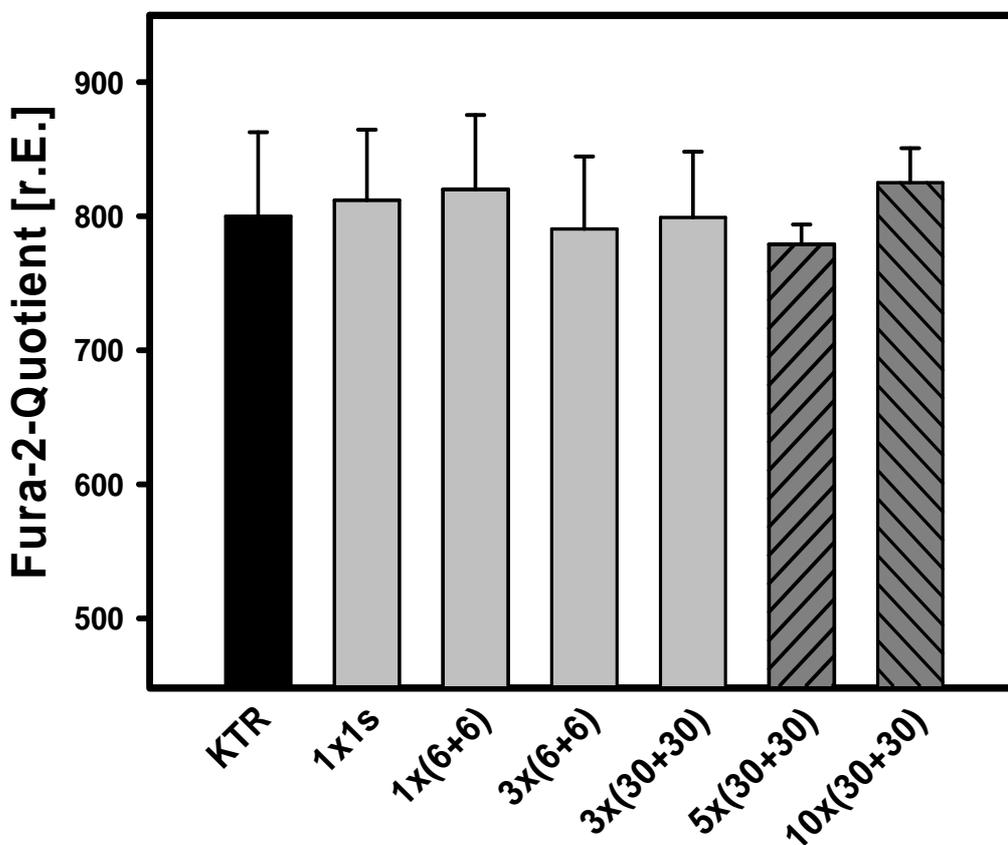


Abb. 4.2.1.1b zeigt den Fura-2-Quotienten am Ende der 40 Minuten dauernden simulierten Reperfusion nach Anwendung verschiedener Protokolle der ischämischen Postkonditionierung und unter Kontrollbedingungen (KTR). Dargestellt sind die Mittelwerte des Fura-2-Quotienten [r.E.] \pm SEM ($n \geq 4$).

Die Anwendung aller ischämischer Postkonditionierungs-Manöver zeigte am Ende der Reperfusion vergleichbare Werte für den intrazellulären Kalziumspiegel gegenüber der Kontrollgruppe.

4.2.1.2 Protektionsauslösung der ischämischen Postkonditionierung

Um zu untersuchen, ob die beobachtete Protektion des ischämischen Postkonditionierungsprotokolls „10x(30+30)“ durch den repetitiven pH-Wechsel ausgelöst wird, wurde ein weiteres Reperfusionprotokoll erstellt, bei dem die **anoxischen** azidotischen Zyklen durch **normoxische** azidotische Zyklen ersetzt wurden (siehe Kap. 3.2.1). Anzahl und Dauer der Zyklen entsprachen hierbei denen des Reperfusionprotokolls „10x(30+30)“.

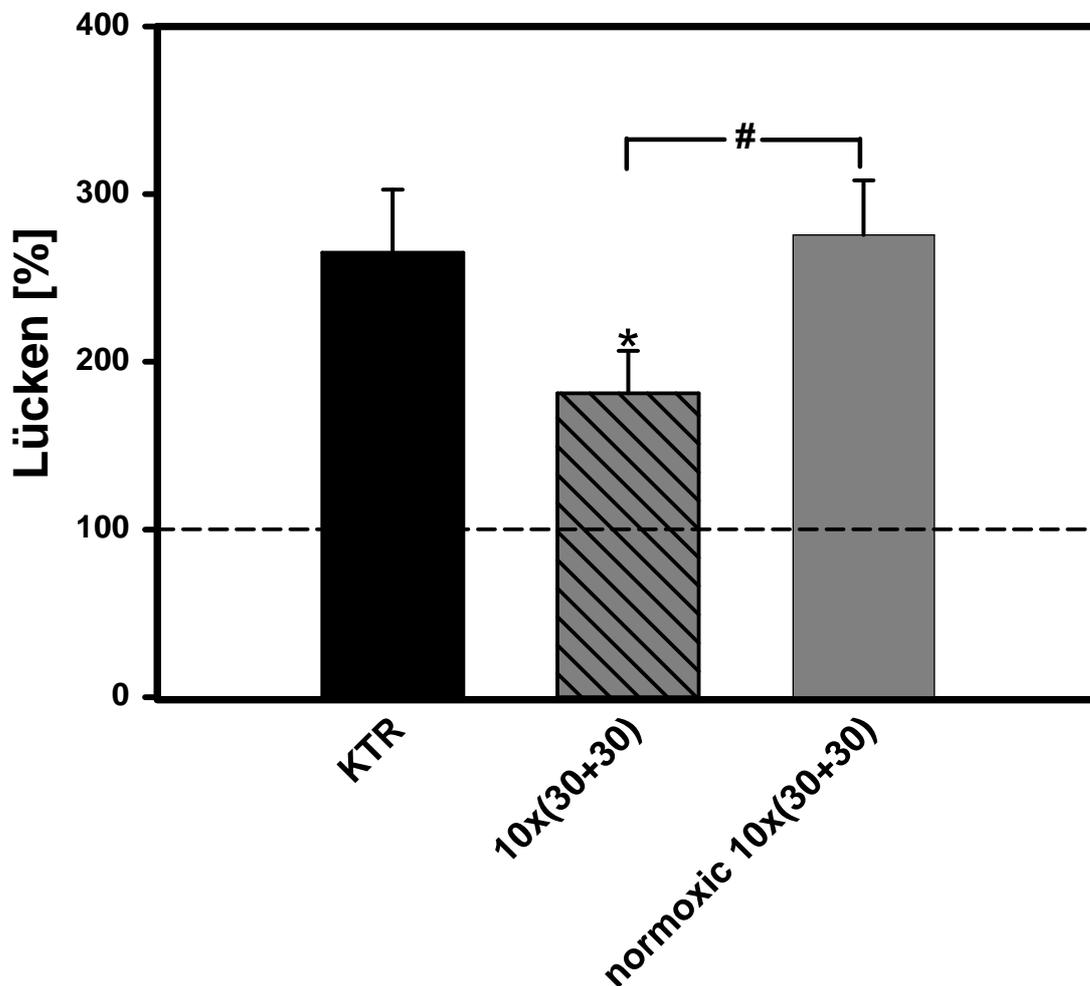


Abb. 4.2.1.2 zeigt die interzelluläre Lückenbildung am Ende der 40 Minuten dauernden simulierten Reperfusion unter Kontrollbedingungen (KTR), nach Anwendung der Reperfusionprotokolle „10x(30+30)“ oder „normoxic 10x(30+30)“. Dargestellt sind die Mittelwerte in Prozent \pm SEM bezogen auf die endanoxische Lückenbildung ($n \geq 3$; * $p < 0,05$ versus Kontrolle; # $p < 0,05$ versus 10x30+30). Die gestrichelte Linie markiert die Lückenbildung am Ende der Anoxie, die auf 100% gesetzt wurde.

Die Anwendung des Reperusionsprotokolls „10x(30+30)“ zeigte die erwartete Reduktion interzellulärer Lücken. Ein alleiniger repetitiver Wechsel des extrazellulären pH-Wertes während der **normoxischen** Postkonditionierung hatte keinen protektiven Effekt auf die reperusionsinduzierte Lückenbildung.

4.2.1.3 Wirkmechanismus der ischämischen Postkonditionierung

In früheren Untersuchungen wurde bereits gezeigt, dass der PI3K/AKT-Signalweg eine wichtige Rolle bei der Vermittlung der Postconditioning-vermittelten Protektion gegen Reperfusionsschäden spielt (Tsang et al. 2004; Philipp et al. 2006). Die PI3-Kinase kann mit dem spezifischen Inhibitor Ly294002 gehemmt werden. Dazu wurden 2 weitere Protokolle erstellt (5x(30+30)+Ly sowie 10x(30+30)+Ly) und angewendet. Ly294002 wurde in einer Konzentration von 5 μ M 10 Minuten vor Reperusionsbeginn appliziert.

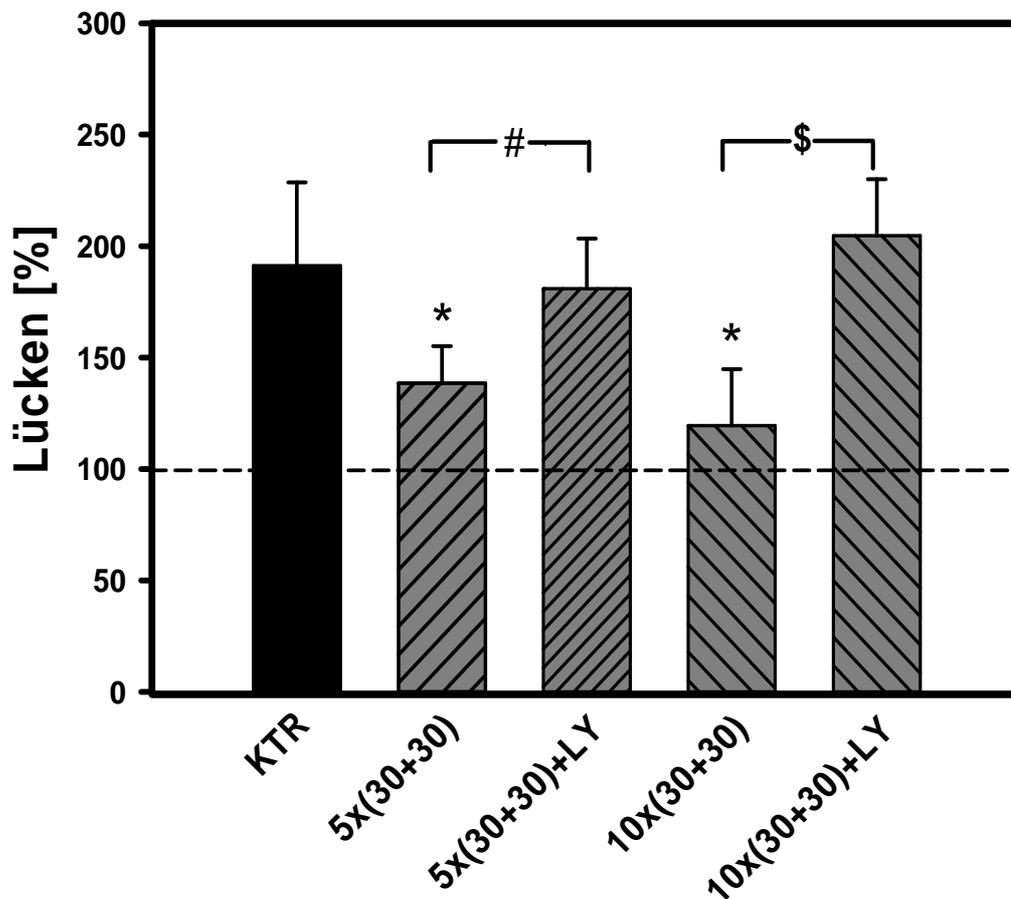


Abb. 4.2.1.3 zeigt die reperfusionsinduzierte Lückenbildung am Ende der 40 Minuten dauernden simulierten Reperfusion, bezogen auf die endoxische Lückenbildung, unter Kontrollbedingungen(KTR), nach Anwendung protektiver Postkonditionierungs-Protokolle (5x(30+30); 10x(30+30)) sowie bei zusätzlicher Anwesenheit des spezifischen PI3-Kinase Inhibitors Ly294002 (LY; 5 μ M). Dargestellt sind die Mittelwerte in Prozent \pm SEM ($n \geq 5$; * $p < 0,05$ versus Kontrolle; # $p < 0,05$ versus 5x(30+30); \$ $p < 0,05$ versus 10x(30+30)). Die gestrichelte Linie markiert die Lückenbildung nach 40 Minuten simulierter Ischämie, die auf 100% gesetzt wurde.

Wie in Abbildung 4.2.1.3 dargestellt, wurde der protektive Effekt der ausgewählten Protokolle nach Hemmung der PI3-Kinase vollständig aufgehoben.

4.2.2 Pharmakologische Postkonditionierung an koronaren Endothelzellmonolayern während simulierter Ischämie und Reperfusion

Versuche an isolierten Ratten- und Kaninchenherzen konnten zeigen, dass pharmakologische Aktivatoren der RISK-Signalkaskade protektiv auf reperfundierte Herzen wirken können (Gao et al. 2002; Chiari et al. 2005; Nishida et al. 2009).

Verschiedene Studien haben weiterhin gezeigt, dass eine RISK-Aktivierung durch Cannabinoidrezeptor-Agonisten reperfundierte Herzen schützen kann (Lépicier et al. 2003; 2006) und es gibt Hinweise, dass das endogene Cannabinoidsystem bei der ischämischen Prä- und Postkonditionierung eine entscheidende Rolle spielen könnte (Lagneux und Lamontagne 2001; Lamontagne et al. 2006; Hajrasouliha et al. 2008).

4.2.2.1 Wirkung von Cannabinoiden auf die interzelluläre Lückenbildung und die zytosolische Kalziumkonzentration

Um zu untersuchen, ob sich Cannabinoide im Zellkulturmodell protektiv auf die reperfusionsinduzierte Interzellulärspaltenbildung auswirken, wurden Ischämie- und Reperfusionsversuche in An- und Abwesenheit von R1M, einem unspezifischen Cannabinoidrezeptor-Agonisten, in der Reperfusion durchgeführt. R1M wurde während der gesamten Reperfusion in einer Konzentration von 10 μM eingesetzt. Es wurden die Versuchsprotokolle gemäß Kapitel 3.2.2 angewandt.

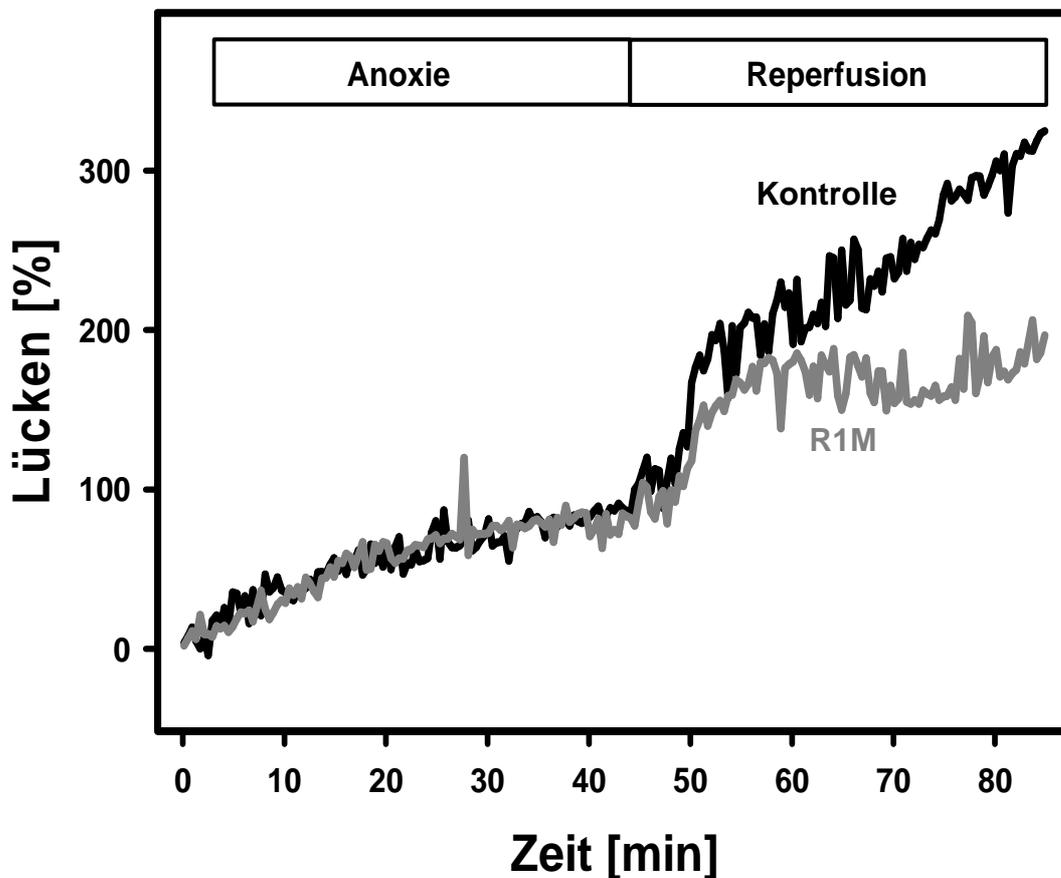


Abb. 4.2.2.1a zeigt exemplarisch den Verlauf der interzellulären Lückenbildung nach 40 Minuten simulierter Ischämie und 40 Minuten simulierter Reperfusion unter Kontrollbedingungen und bei Applikation von R1M (10 μ M) während der Reperfusion. Dargestellt sind die Mittelwerte der Lückenbildung in Prozent.

Wie in Abbildung 4.2.2.1a dargestellt, führte die Applikation von R1M in der Reperfusion zu einer deutlichen Reduktion der reperfusionsinduzierten Interzellularspaltenbildung.

Um zu untersuchen ob diese Reduktion der Interzellularspalten auf eine Veränderung der intrazellulären Kalziumhomöostase zurückgeführt werden kann, wurde die intrazelluläre Kalziumkonzentration gemessen. Die folgende Abbildung 4.2.2.1b zeigt den Verlauf der zytosolischen Ca²⁺-Konzentration unter simulierter Ischämie und Reperfusion bei Anwesenheit von R1M in der Reperfusion und unter Kontrollbedingungen.

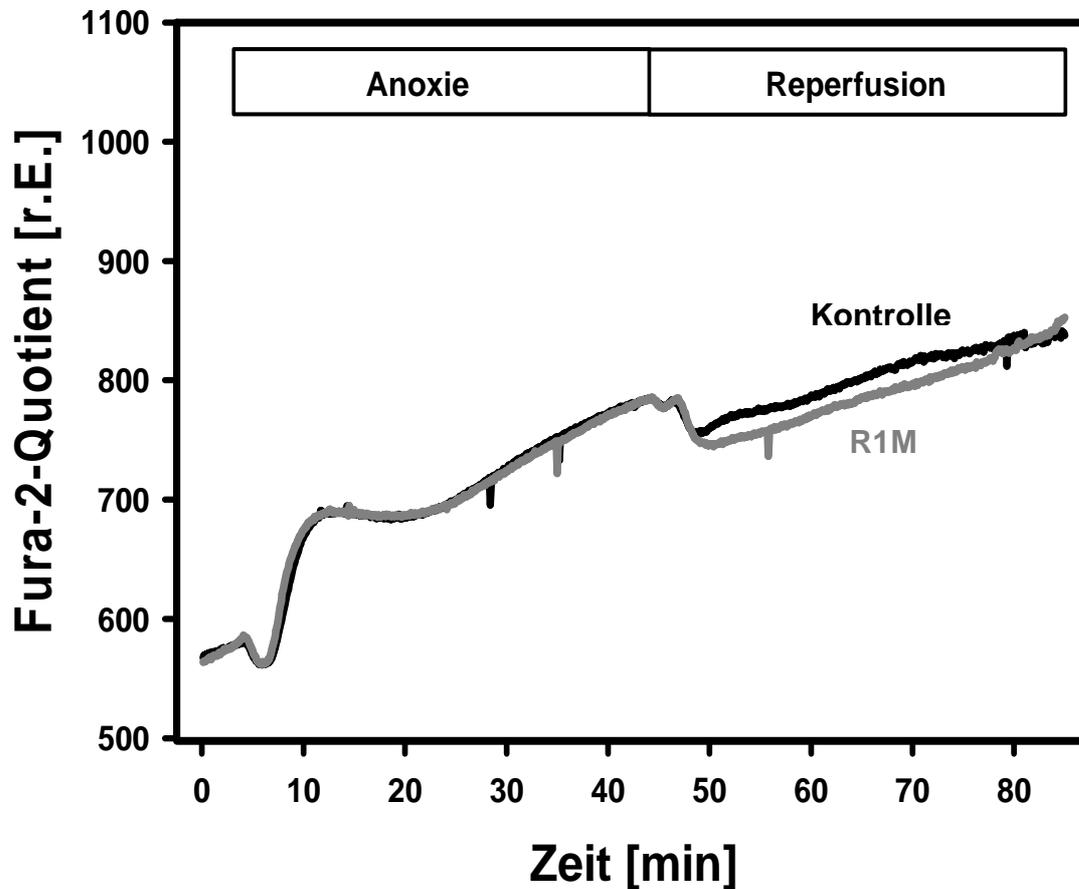


Abb. 4.2.2.1b Verlauf des intrazellulären Fura-2-Quotienten während simulierter Ischämie (40min) und Reperfusion (40min) unter Kontrollbedingungen und bei Applikation von R1M ($10\mu\text{M}$) während der 40-minütigen Reperfusion. Dargestellt ist der Fura-2-Quotient in relativen Einheiten [r.E.].

Die Applikation von R1M in einer Konzentration von $10\mu\text{M}$ während der Reperfusion hatte keine signifikanten Effekte auf die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration verglichen mit Kontrollbedingungen.

4.2.2.2 Rezeptorvermittelte Protektion gegen reperfusionsinduzierte Lückenbildung durch Cannabinoide

Da R1M die beiden bekannten CB-Rezeptoren (CB1 und CB2) aktiviert, wurden diese in weiteren Versuchen während R1M-Applikation durch je einen spezifischen Antagonisten, AM251 (0,25 μ M) gegen CB1R oder AM630 (0,3 μ M) gegen CB2R, blockiert. In den Versuchsreihen wurden die beiden Rezeptorblocker ergänzend zu R1M mit Beginn der Reperfusion appliziert.

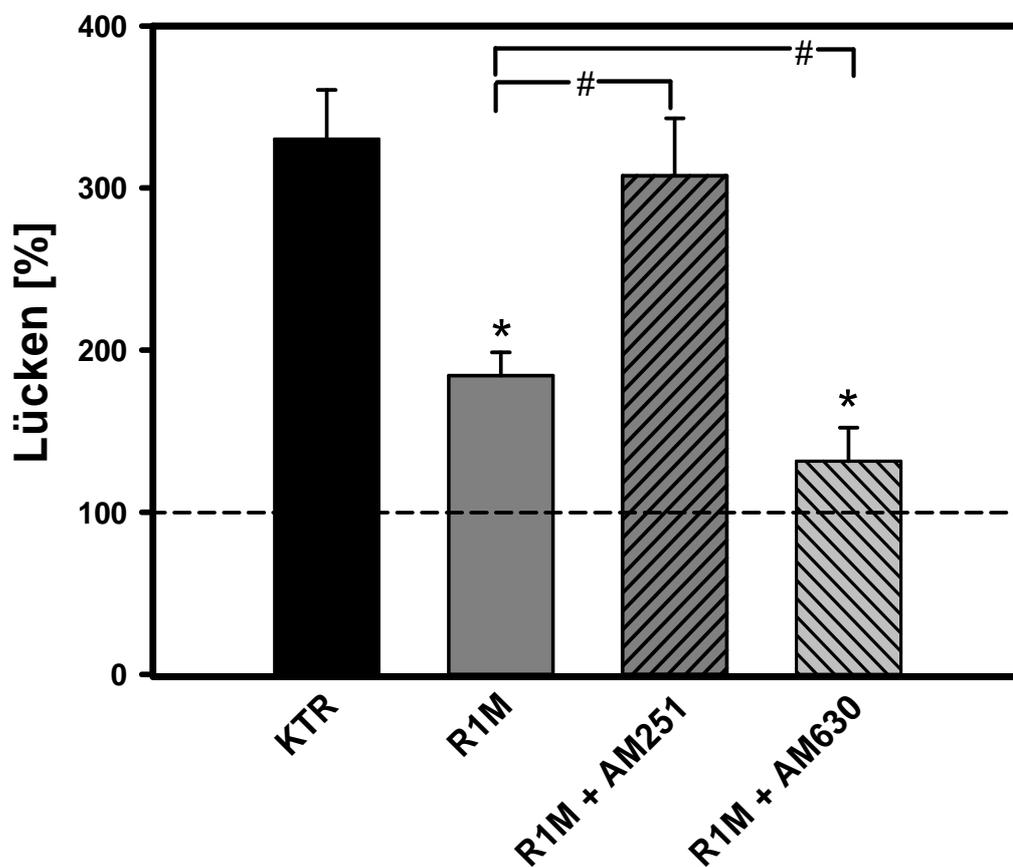


Abb. 4.2.2.2a zeigt die reperfusionsinduzierte Lückenbildung nach simulierter Anoxie (40min) und Reperfusion (40min) unter Kontrollbedingungen, bei Anwesenheit von R1M alleine in der Reperfusion und mit den spezifischen Antagonisten AM251 oder AM630 während R1M-Applikation, dargestellt als Mittelwerte in Prozent \pm SEM ($n \geq 6$; * $p < 0,05$ versus Kontrolle; # $p < 0,05$ versus R1M). Die gestrichelte Linie markiert die endanoxische Interzellularspaltenbildung, die auf 100% gesetzt wurde.

Die statistische Auswertung der Lückenbildung während simulierter Ischämie und Reperfusion zeigt, dass die Blockade des CB1-Rezeptors durch AM251 den R1M-vermittelten Schutz vor Lückenbildung vollständig aufhebt. Eine CB2-Rezeptorblockade mit AM630 während der R1M-Applikation verstärkt dagegen die R1M-vermittelte Protektion.

Die statistische Auswertung der gemessenen Kalziumkonzentrationen unter diesen Bedingungen zeigt die Abbildung 4.2.2.2b:

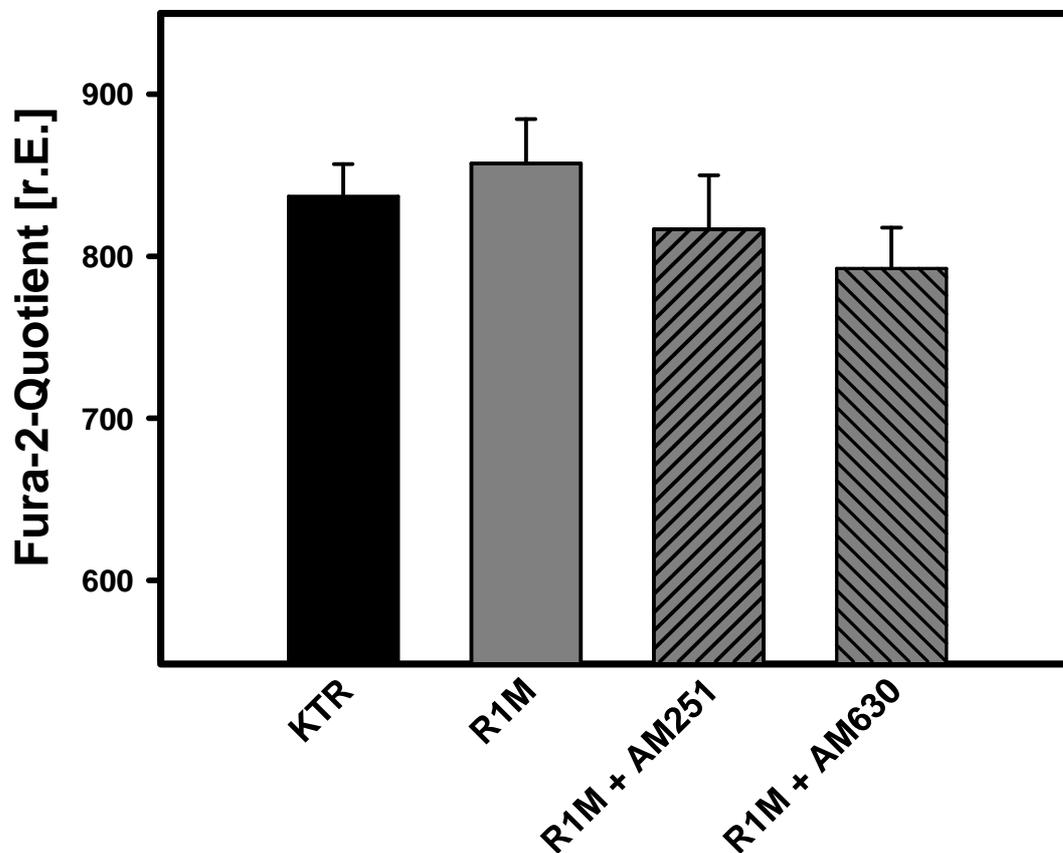


Abb. 4.2.2.2b zeigt den Fura-2-Quotienten am Ende der 40 Minuten dauernden Reperfusion unter Kontrollbedingungen, bei Anwesenheit von R1M alleine in der Reperfusion und mit den spezifischen Antagonisten AM251 oder AM630. Dargestellt sind die Mittelwerte des Fura-2-Quotienten [r.E.] \pm SEM (n \geq 6).

Eine Cannabinoidrezeptoraktivierung durch R1M, mit oder ohne selektive Rezeptorblockade, hat keine signifikanten Veränderungen der intrazellulären Kalziumkonzentration, verglichen mit Kontrollbedingungen, zur Folge.

4.2.2.3 Wirkmechanismus der CBR-vermittelten Protektion gegen reperfusionsinduzierte Lückenbildung

Da bekannt ist, dass eine CBR-Aktivierung an Gefäßendothelzellen zu einer Aktivierung der NO-Synthasen führen kann und NO protektiv auf das ischämisch-reperfundierte Herz wirkt (Deutsch et al. 1997; Bolli et al. 2001; Schulz et al. 2004), wurde in einer weiteren Versuchsreihe untersucht, ob eine Hemmung dieser Synthasen mit L-NAME (200 μ M), einem NOS-Inhibitor, die R1M-vermittelte Protektion aufheben kann. L-NAME wurde 10 Minuten vor Ende der Anoxie, R1M zu Beginn der Reperfusion ergänzend appliziert (vgl. Kapitel 3.2.2).

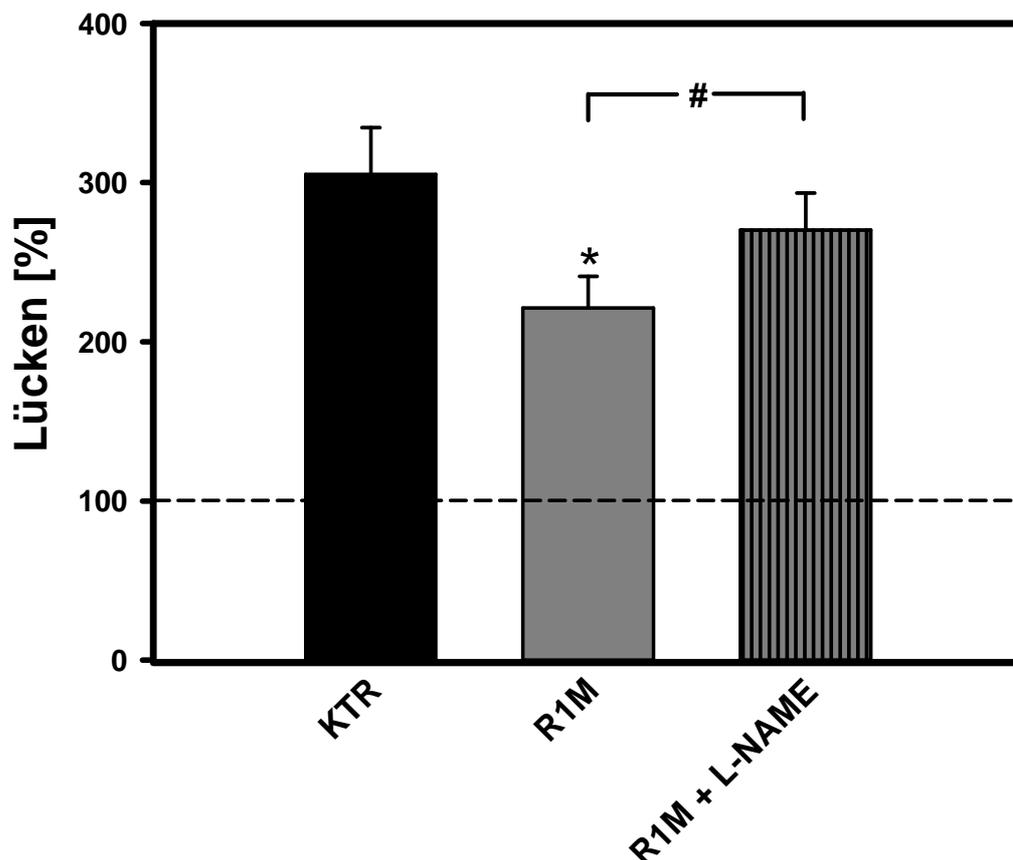


Abb. 4.2.2.3a zeigt die Lückenbildung nach simulierter Ischämie (40min) und Reperfusion (40min) bei Anwesenheit von R1M und zusätzlich mit dem NOS-Inhibitor L-NAME gegenüber Kontrollbedingungen(KTR), dargestellt als Mittelwerte in Prozent \pm SEM bezogen auf die endanoxische Lückenbildung, die auf 100% gesetzt wurde ($n \geq 10$; * $p < 0,05$ versus Kontrolle; # $p < 0,05$ versus R1M). Die gestrichelte Linie markiert die Interzellularspaltenbildung nach 40 Minuten simulierter Ischämie.

Die statistische Auswertung der Versuchsreihe in Abbildung 4.2.2.3a zeigt, dass die R1M-vermittelte Protektion gegen die reperfusionsinduzierte Lückenbildung durch eine Hemmung der NO-Synthasen zu einem großen Teil aufgehoben werden kann.

Das durch die NO-Synthasen gebildete NO kann über eine Aktivierung der löslichen Guanylatzyklen zu einer Proteinkinase-G(PKG)-Aktivierung führen. Um zu überprüfen, ob diese Kinase eine Rolle bei der Vermittlung des R1M-abhängigen protektiven Effekts spielt, wurde der spezifische PKG-Inhibitor KT5823 während der R1M-Applikation in der Reperfusion in einer Konzentration von 0,5 μ M eingesetzt.

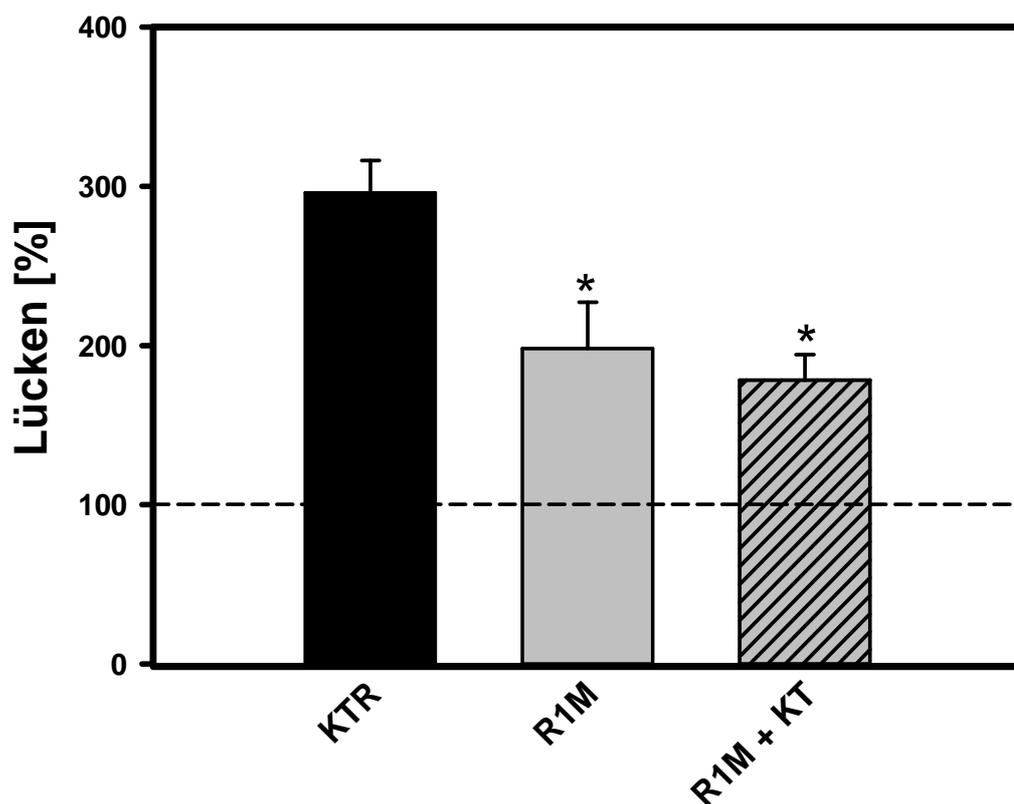


Abb 4.2.2.3b zeigt die Lückenbildung nach simulierter Ischämie (40min) und Reperfusion (40min) bei Anwesenheit von R1M und zusätzlich mit dem PKG-Inhibitor KT5823 gegenüber Kontrollbedingungen(KTR), dargestellt als Mittelwerte in Prozent \pm SEM bezogen auf die endanoxische Lückenbildung, die auf 100% gesetzt wurde ($n \geq 10$; * $p < 0,05$ versus Kontrolle). Die gestrichelte Linie markiert die Interzellularspaltenbildung nach 40 Minuten simulierter Ischämie.

Wie in Abbildung 4.2.2.3b ersichtlich zeigt die statistische Auswertung, dass eine pharmakologische Inhibierung der PKG keinen Effekt auf die R1M-vermittelte Protektion vor reperfusionsinduzierter Lückenbildung hat.

4.3 Einfluss von Cannabinoidrezeptoraktivierung auf die ischämie- und reperfusionsinduzierte Endothelzellnekrose

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass R1M koronare Endothelzellen NOS-abhängig vor reperfusionsinduzierter Lückenbildung schützt. In einer weiteren Versuchsreihe sollte deshalb untersucht werden, ob R1M die Ausbildung nekrotischer Zellen beeinflussen kann. Unter Normoxischen Bedingungen und nach Durchführung simulierter Ischämie und Reperfusionsversuchen und jeweiliger Inkubation mit Propidiumiodid wurden die Anteile vitaler und nekrotischer Zellen quantitativ bestimmt (siehe Kapitel 2.2.2.4). Die folgende Abbildung zeigt die statistische Auswertung der Zellzählung nach vier Stunden.

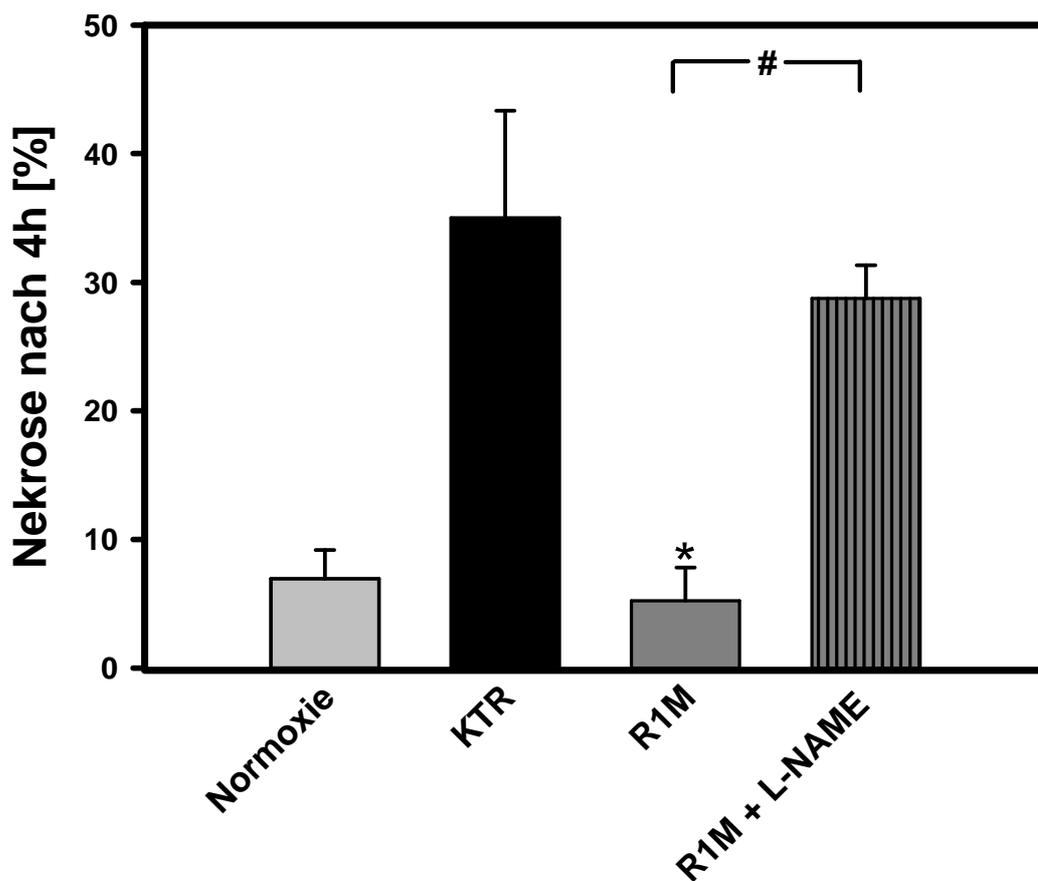


Abb. 4.3 zeigt die Nekroserate in Prozent unter normoxischen Bedingungen (Normoxie), nach simulierter Ischämie (40min) und Reperfusion (40min) unter Kontrollbedingungen(KTR), sowie in Anwesenheit von R1M oder R1M + L-NAME nach jeweils 4-stündiger Inkubation mit Propidiumiodidfärbung. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte in Prozent \pm SEM ($n \geq 6$ Experimente; * $p < 0,05$ versus Kontrolle; # $p < 0,05$ versus R1M).

Die Ergebnisse in Abbildung 4.3 zeigen, dass simulierte Ischämie und Reperfusion in der Kontrolle (KTR) zu einer signifikanten Zunahme nekrotischer Zellen führt. R1M-Applikation während der Reperfusion führte dagegen zu einer Reduktion der Nekroserate auf normoxisches Niveau (Normoxie). Durch die Applikation des NOS-Inhibitors L-NAME während R1M-Applikation konnte dieser Effekt zu einem großen Teil aufgehoben werden.

5 Diskussion

Hauptbefund dieser Arbeit war, dass koronare Endothelzellen sowohl durch ischämische als auch durch pharmakologische Postkonditionierung gegen die reperfusioninduzierte interzelluläre Lückenbildung geschützt werden können. Weitere Ziele bestanden darin zu untersuchen, über welche Signalwege diese Protektion vermittelt wird. Die Ergebnisse zeigten, dass der protektive Effekt der ischämischen Postkonditionierung auf die Aktivierung der PI3-Kinase zurückzuführen ist. Die pharmakologische Postkonditionierung mit Cannabinoid R1M wird über die Aktivierung des CB1-Rezeptors vermittelt und reduziert die Anzahl nekrotischer Endothelzellen. Die NOS-Inhibition hebt den R1M-vermittelten Schutz vor reperfusioninduzierter Lückenbildung weitgehend auf.

5.1 Zellkultur

Zahlreiche vorangegangene Studien an isolierten Herzen und Kardiomyozyten konnten zeigen, dass ischämische und pharmakologische Postkonditionierung vor dem Ischämie-/ Reperfusionsschaden schützen kann. Um die Bedeutung koronarer Endothelzellen, als ein weiterer wichtiger funktioneller Teil des Herzens, beim Ischämie- Reperfusionsschaden besser zu verstehen, wurde in der vorliegenden Arbeit die Untersuchungen an kultivierten koronaren Endothelzellen der Ratte durchgeführt. Die verwendeten Endothelien wurden nach der von Piper et al. (1990) beschriebenen Methode isoliert und in definierten Medien und Wirkstoffkonzentrationen kultiviert. Der Einfluss ischämischer und pharmakologischer Postkonditionierung und die zu untersuchenden Signalwege konnten unbeeinflusst von nichtendothelialen Zellen (z. B. glatte Muskelzellen, Thrombozyten), die *in vivo* ebenfalls eine Rolle spielen, bestimmt werden. Die Verwendung von Endothelzellkulturen bietet die Möglichkeit die Protektion vor dem Ischämie-Reperfusionsschaden unter verschiedenen Bedingungen näher zu untersuchen. In meinen Untersuchungen konnten die interzelluläre Lückenbildung sowie die intrazelluläre Kalziumkonzentration als charakteristische Schädigungskriterien nach jeweiliger 40 minütiger simulierter Ischämie und Reperfusion unter Kontrollbedingungen identifiziert werden (Abb. 4.1a; 4.1b).

Weiterhin wurde der Verlauf der Ca^{2+} -Konzentration sowie die Zunahme der interzellulären Lücken während der Ischämie und Reperfusion phasenweise beurteilt, so dass dieses Modell für den Nachweis der Kinetik und der Quantifizierung am geeignetsten erschien.

5.2 Ischämische Postkonditionierung an koronaren Endothelmonolayer

In der hier vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass durch ischämische Postkonditionierung koronare Endothelzellen vor ischämie- und reperfusionsinduzierter interzellulärer Lückenbildung geschützt werden.

Vorangegangene Arbeiten haben gezeigt, dass ischämische Postkonditionierung protektiv auf ischämisch-reperfundierte Herzen wirkt (Zhao et al. 2003; Galagudza et al. 2004). Um die Übertragbarkeit der Ergebnisse aus Versuchen mit isolierten Herzen auf Endothelzellen zu analysieren, wurden koronare Endothelzellen aus Rattenherzen isoliert und verschiedene Protokolle der ischämischen Postkonditionierung erstellt und untersucht. Mit kurzer ischämischer Postkonditionierung („1x1s“, „1x(6+6)“, „3x(6+6)“ und „3x(30+30)“) konnte keine signifikante Reduktion der interzellulären Lückenbildung erzielt werden. In der vorliegenden Arbeit wurden die auf einem Glasdeckgläschen behafteten Endothelzellen in eine Perfusionskammer mit 1ml Volumen eingebaut. Mithilfe einer Peristaltikpumpe wurde die Kammer mit einer Geschwindigkeit von 0,5ml/min mit Perfusionsmedium gespült. In den „kurzen“ Postkonditionierungsprotokollen wurde vermutlich ein zu geringer Teil des Perfusionsmediums ausgetauscht um die protektiven zellulären Mechanismen der Postkonditionierung in Gang zu setzen. Eine Erhöhung und Verlängerung der Zyklen Anoxie und Reperfusion in den ischämischen Postkonditionierungsprotokollen „5x(30+30)“ und „10x(30+30)“ führte zu einer signifikanten Reduktion der reperfusionsinduzierten Lückenbildung. Eine Begründung für diese Befunde könnte in der verzögerten Wiederherstellung des neutralen pH-Wertes durch die ischämische Postkonditionierung liegen (Fujita et al. 2007; Cohen et al. 2007).

Während einer myokardialen Ischämie sinkt der intrazelluläre pH-Wert $<7,0$ durch die Bildung von Laktat, die durch die Akkumulation von Natrium und Kalzium in dieser Zeit noch verstärkt wird. In den ersten Minuten der Reperfusion wird durch den Abbau von Laktat, dem Na^+ - H^+ -Austauscher und dem Na^+ - HCO_3^- -Co-Transporter ein neutraler pH-Wert innerhalb der Zelle hergestellt. Weiterhin ist bekannt, dass eine vorübergehende Azidose in den ersten Minuten der Reperfusion ausreichen kann, um eine Aktivierung der RISK zuzulassen (Fujita et al. 2007). Es konnte in einer Studie an Kardiomyozyten gezeigt werden, dass AKT, als nachgeschaltetes Signal der PI3K, hemmend auf den Na^+ - H^+ -Austauscher wirkt (Snabaitis et al. 2008). Möglicherweise ist es an den Endothelzellen durch Aktivierung der RISK-Signalkaskade zu einer Hemmung des Na^+ - H^+ -Austauschers und somit zu einer verzögerten Wiederherstellung des neutralen pH-Wertes gekommen, welches sich positiv auf die interzelluläre Lückenbildung ausgewirkt hat. Um dieses Phänomen auch auf koronare Endothelzellen zu übertragen, müssten weiterführende Untersuchungen durchgeführt werden.

In früheren Untersuchungen an koronaren Endothelzellen wurde gezeigt, dass die Ausbildung endothelialer Lücken von der Kalziumüberladung während der Reperfusion abhängig ist (Schäfer et al. 2003). Um zu überprüfen, ob der protektive Effekt der ischämischen Postkonditionierung auch zu einer Erniedrigung des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels führt, wurde die intrazelluläre Kalziumkonzentration bestimmt. In den vorliegenden Experimenten konnte gezeigt werden, dass es bei Anwendung verschiedener Protokolle der ischämischen Postkonditionierung zu keiner signifikanten Änderung in der intrazellulären Kalziumkonzentration kommt. Der Effekt der ischämischen Postkonditionierung an koronaren Endothelzellen scheint demnach kalziumunabhängig zu sein. In einer vorangegangenen Studie wurde gezeigt, dass die intrazelluläre Kalziumkonzentration eine Aktivierung des endothelialen kontraktilen Apparates bewirkt und damit die endotheliale Barrierenfunktion beeinflusst (Noll et al. 1995).

Eine Kontraktion kommt durch die Formation des Ca^{2+} -Calmodulin-Komplexes zustande. Anschließend wird die Myosin-Leicht-Ketten-Kinase (MLKK) durch Phosphorylierung der leichten Ketten von Myosin aktiviert, wodurch eine Interaktion mit Aktin ermöglicht wird. Die Hydrolyse von ATP bewirkt die Ablösung des Myosinköpfchens von Aktin. Durch die Myosin-Leicht-Ketten-Phosphatase (MLKP) kommt es zur Dephosphorylierung und somit zur Inaktivierung der MLKK. Eine erhöhte MLKP-Aktivität führt dementsprechend zur Relaxation. Studien belegen, dass die kontraktilen Elemente der Endothelzelle durch den Phosphorylierungsgrad der Myosinleichtkette (MLK) kontrolliert werden (Schnittler et al. 1990; Wysolmerski et al. 1991). Ist die Aktivität der MLKP erhöht, so könnte theoretisch ein Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration auftreten, ohne dass es dabei zu einer Kontraktion der Endothelzellen kommt. Dieser Mechanismus konnte in einer Studie an Glattmuskelzellen gezeigt werden, bei der eine Abnahme der Myosin-Leichtkettenphosphorylierung zu einer verminderten Kontraktion und damit zu einer Kalziumdesensitivierung des kontraktilen Apparates führt (Lee et al. 1997).

Dies könnte möglicherweise die in der vorliegenden Arbeit festgestellte Reduktion der interzellulären Lückenbildung trotz eines weiteren Kalziumanstieges in der Reperfusion erklären.

Die Änderung des extrazellulären pH-Wertes bei Durchführung des Postkonditionierungsprotokolls „normoxic10x(30+30)“ zeigte keinen Einfluss auf die Protektion vor interzellulärer Lückenbildung (Abb. 4.2.1.2). Dies lässt darauf schließen, dass der protektive Effekt der ischämischen Postkonditionierung tatsächlich durch repetitive Zyklen Anoxie / Reperfusion und nicht alleine auf Schwankungen des pH-Wertes in der Reperfusion zurückzuführen ist. Dies bestätigt die pH-Hypothese in Ischämie- und Reperfusionsexperimenten von Schäfer et al. (2003), in denen eine Änderung des extrazellulären pH-Wertes während der Reperfusion keinen Einfluss auf reperfusionsbedingte interzelluläre Lückenbildung in Endothelzellen bewirkte.

Die Bedeutung der PI3K, als eine der beteiligten RISK, für die Kardioprotektion der Postkonditionierung wurde in früheren Untersuchungen am Modell isoliert perfundierter Rattenherzen gezeigt (Tsang et al. 2004; Zhu et al. 2006). In Hemmstoffversuchen mit Ly294002, einem spezifischen Inhibitor der PI3K, wurde überprüft, ob die PI3K die Protektionswirkung auf Ebene der koronaren Endothelzellen vermittelt. Ly294002 wurde 10 Minuten vor Reperfusionbeginn appliziert. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass der protektive Effekt der ischämischen Postkonditionierung in den Protokollen „5x(30+30)“ und „10x(30+30)“ gegen die reperfusionsinduzierte Lückenbildung bei Hemmung der PI3K ausblieb (Abb.4.2.1.3). In vorangehenden Arbeiten wurde weiterhin festgestellt, dass der Applikationszeitpunkt eines PI3-Kinase-Inhibitors Einfluss auf die Infarktgrößenreduktion hat. Tsang et. al (2004) konnten an Rattenherzen mit Ly 294002, welcher kurz vor Reperfusionbeginn verabreicht wurde, die Protektion der Postkonditionierung blockieren. In einer Untersuchung von Darling et. al (2005) konnte die PI3-Kinase nicht als Signalelement der Postkonditionierung nachgewiesen werden. Ly 294002 wurde dabei 25 Minuten vor Reperfusionbeginn appliziert. In der vorliegenden Arbeit wurde der Inhibitor 10 Minuten vor Reperfusionbeginn appliziert. Dies zeigt, dass die PI3K, um protektiv wirksam zu werden, zu Beginn der Reperfusion aktiviert sein müsste. Eine zu frühe Applikation des PI3-Hemmstoffes könnte bis zur Reperfusion metabolisiert sein.

Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt, ist die Aktivierung der PI3K als Schritt der Signaltransduktion bei der ischämischen Postkonditionierung an koronaren Endothelien beteiligt.

5.3 Pharmakologische Postkonditionierung an koronaren Endothelmonolayern

Nachdem die Anwendung ischämischer Postkonditionierung effektiv die Interzellulärspaltenbildung an koronaren Rattenendothelzellen reduziert hat, wurde untersucht, ob koronare Endothelien durch pharmakologische Postkonditionierung geschützt werden können. In der Literatur wurde die pharmakologische Präkonditionierung an Herzen mit Cannabinoiden bereits erfolgreich beschrieben (Lagneux und Lamontagne 2001). In dieser Studie wurden Rattenherzen im Langendorffmodell entweder mit Lipopolysacchariden (LPS) oder physiologischer Kochsalzlösung vorbehandelt, da bekannt war, dass LPS eine erhöhte Endocannabinoid-Produktion bewirken können (Maccarrone et al. 2001; Liu J. et al. 2003). LPS ist ein Glykolipid, das in der äußeren Zellmembran gram-negativer Bakterien vorkommt. Es wurde die Wirkung von LPS gegenüber der Kontrollgruppe, sowie der Einfluss von Cannabinoidrezeptorantagonisten nach 90 Minuten Ischämie und 60-minütiger Reperfusion verglichen. Die LPS-Vorbehandlung reduzierte die Infarktgröße und verbesserte eine funktionelle Erholung nach Reperfusion im Vergleich zur Kontrollgruppe. Durch die Zugabe eines Cannabinoidrezeptorblockers fünf Minuten vor Beginn der Ischämie wurde gezeigt, dass die durch LPS induzierte Infarktgrößenreduktion aufgehoben werden konnte.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit konnten in diesem Zusammenhang zeigen, dass die Protektion mit R1M, einem Cannabinoidrezeptorantagonisten, die reperfusionsinduzierte endotheliale Lückenbildung nach durchgeführter Ischämie und Reperfusion signifikant reduzieren kann.

Die Anwendung pharmakologischer Postkonditionierung hatte im Vergleich zur Kontrollgruppe jedoch keinen signifikanten Einfluss auf die intrazelluläre Kalziumkonzentration (Abb 4.2.2.1.b). Die Ausbildung endothelialer Lücken kann durch den Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration während Ischämie und Reperfusion beeinflusst werden. In einigen Studien an Zelllinien aus dem ZNS oder Fibroblasten konnte eine Kopplung von CB1-R an Kalziumkanäle nachgewiesen werden (Felder et al. 1995).

Die Aktivierung eines CB-Rezeptors kann aber auch eine Hemmung von verschiedenen Kalziumkanaltypen nach sich ziehen (Caulfield und Brown 1992; Mackie et al. 1993). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen jedoch, dass der protektive Effekt an koronaren Endothelzellen kalziumunabhängig zu sein scheint. Somit zeigen die Ergebnisse, dass bei Applikation von R1M in der Reperfusion, trotz des Anstieges der intrazellulären Kalziumkonzentration, eine signifikante Reduktion der interzellulären Lückenbildung nachgewiesen werden konnte.

Eine Aktivierung sowohl eines CB1- als auch eines CB2-Rezeptor kann protektiv auf ischämisch präkonditionierte Herzen und auf die endotheliale Funktion an isolierten Rattenherzen wirken (Joyeux et al. 2002; Bouchard et al. 2003). Der Cannabinoidrezeptoragonist R1M aktiviert sowohl den CB1- als auch den CB2-Rezeptor. Aus diesem Grund wurden zwei unterschiedliche CB-R-Antagonisten eingesetzt. Der verwendete Antagonist am CB1-R (AM251) zeigte in der vorliegenden Arbeit eine vollständige Aufhebung der R1M-vermittelten Protektion. Die Applikation des CB2R-Antagonisten (AM630) verstärkt dagegen sogar den R1M-vermittelten Schutz (Abb. 4.2.2.2a). Der protektive Effekt des Cannabinoidagonisten scheint folglich über die Aktivierung des CB1-Rezeptors an koronaren Endothelzellen vermittelt zu sein.

Stickstoffmonoxid (NO) spielt bei der Regulation des Gefäßtonus eine zentrale Rolle. NO ist ein Vasodilatator, der von den Endothelzellen produziert und in die Gefäßstrombahn abgegeben wird. An Gefäßendothelzellen wurde bereits gezeigt, dass Cannabinoide die NO-Synthasen aktivieren können (Deutsch et al. 1997; Fimiani et al. 1999; Maccarrone et al. 2000). Weiterhin konnte in zahlreichen Studien in verschiedenen Geweben festgestellt werden, dass die Aktivierung der NOS und damit die Bildung von NO nicht vom Endothel selbst, sondern durch Cannabinoide induziert wird (Randall et al. 1996; Deutsch et al. 1997). In einer Studie von Stefano et al. (2003) konnte gezeigt werden, dass Anandamid die konstitutiv exprimierten NOS (eNOS und nNOS) über den CB1R aktivieren können.

In einer weiteren Versuchsreihe im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass der protektive Effekt des Anandamids R1M durch die Verwendung eines nicht-selektiven Hemmstoffs der NOS-Synthase (L-NAME) weitestgehend aufgehoben werden konnte (Abb.4.2.2.3a). Dieses Ergebnis zeigt, dass die Aktivierung der NOS durch R1M an der Reduktion der reperfusionsinduzierten Lückenbildung an koronaren Endothelzellen beteiligt ist.

In der glatten Gefäßmuskulatur fungiert die Proteinkinase G (PKG) als Vermittler vasorelaxierender Effekte. Eine Aktivierung der NO-Synthasen führt zu einer NO-vermittelten Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase und zu einem Anstieg des zellulären cGMP-Spiegels. Dadurch wird die PKG aktiviert, die anschließend die NO-Wirkung über verschiedene Mechanismen vermittelt (Cohen und Vanhoutte 1995). Um die Beteiligung der PKG am Signaltransduktionsweg zu prüfen, wurde der PKG-Antagonist KT5823 eingesetzt. In den Ergebnissen zeigt sich, dass der R1M-vermittelte Schutz nicht aufgehoben wurde (Abb. 4.2.2.3b). Daraus lässt sich ableiten, dass der intrazelluläre Signalmechanismus der PKG nicht an der protektiven Wirkung von R1M an koronaren Endothelzellen der Ratte beteiligt ist. Über welchen weiteren Schritt der Signalkaskade die Reduktion der interzellulären Lückenbildung durch R1M letztendlich erfolgt, bedarf weiterer Studien.

Ein wichtiges Merkmal der Ischämie stellt die verminderte Versorgung des Gewebes mit Nährstoffen und Sauerstoff dar. Versuche an isolierten Herzen und Endothelzellen konnten zeigen, dass Nekrose durch Ischämie und Reperfusion induziert werden kann (García-Dorado et al. 1992; Ruiz-Meana et al. 2009; Wang et al. 2009).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit belegen, dass Ischämie und Reperfusion koronare Endothelzellen schädigen und es zur Ausbildung nekrotischer Zellen kommt. In Anwesenheit von R1M kam es zu einer signifikanten Reduktion nekrotischer Endothelzellen. Durch den NOS-Hemmstoff (L-NAME) stieg die Nekroserate wieder auf Kontrollniveau an (Abb. 4.3). Als mögliche Ursache für die Ausbildung nekrotischer Zellen während Ischämie und Reperfusion wird die Beteiligung der mPTP (mitochondriale Permeabilitäts-Transitions-Pore) diskutiert.

Durch die Öffnung der mPTP wird die innere mitochondriale Membran permeabel für Wasser, das mitochondriale Membranpotenzial bricht zusammen und es kommt zum nekrotischen Zelltod (Hausenloy et al. 2003). In vorangegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass die Inhibition der Öffnung der mPTP zu Beginn der Reperfusion protektiv auf Herzen wirkt (Hausenloy et al. 2002; 2003) und dass eine Aktivierung der RISK-Signalkaskade vermutlich an der Inhibition der mPTP beteiligt ist (Bopassa et al. 2006). Die Reduktion nekrotischer Zellen in den hier durchgeführten Untersuchungen lässt sich möglicherweise auf eine cannabinoidinduzierte NO-Bildung zurückführen, da Kim et al. (2004) zeigen konnte, dass NO die Öffnung der mPTP unterdrücken kann.

Die exakten Mechanismen der cannabinoid-vermittelten Effekte in Endothelzellen sowie die Übertragbarkeit der Ergebnisse in ein intaktes Koronarsystem bedürfen jedoch weiterer Untersuchungen.

5.4 Klinischer Ausblick

5.4.1 Ischämische Postkonditionierung

Akute myokardiale Infarkte gehören zu den häufigsten Todesursachen. Um den Schaden durch Sauer- und Nährstoffmangel möglichst gering zu halten, wird nach neuen Behandlungsmethoden und pharmakologischen Therapien gesucht.

Das Phänomen der ischämischen Postkonditionierung wurde 2003 zum ersten Mal an einem in vivo Hundemodell beschrieben (Zhao et al. 2003). Zahlreiche erfolgreich angewendete Postkonditionierungsprotokolle an verschiedenen Tierspezies wie beispielsweise an Schweinen und Kaninchen folgten (Yang et al. 2004a; Argaud et al. 2005; Iliodromitis et al. 2006; Zhao et al. 2007).

Seit der Entdeckung der Postkonditionierung hat sich auch das humanmedizinische Forschungsinteresse auf dieses Gebiet fokussiert, da somit neue Therapiemöglichkeiten für Patienten mit akutem Myokardinfarkt bestehen. Die Anwendung ischämischer Postkonditionierung erfolgte bereits in kleinen klinischen Studien.

Staat et al. (2005) und Darling et al. (2007) konnten an Patienten mit Myokardinfarkt die ischämische Postkonditionierung erfolgreich anwenden. Die Postkonditionierung wurde mit Hilfe eines Ballonkatheters für 4 Zyklen à 1 Minute Ischämie und Reperfusion durchgeführt (Staat et al. 2005). Die Patienten wiesen nach der erfolgreichen Behandlung niedrigere CK-Werte durch eine Reduktion der Infarktgröße auf. In einer Folgeuntersuchung von Thibault et al. (2008) konnte die Infarktgrößenreduktion sowie eine verbesserte kontraktile Funktion des Myokards sechs Monate nach Anwendung der Postkonditionierung an den von Staat et al. (2005) behandelten Patienten gezeigt werden.

5.4.2 Therapeutischer Einsatz von Cannabis

Erste Aufzeichnungen zu den medizinischen und psychotropen Eigenschaften der Cannabis sativa Pflanze wurden bereits vor 3000 Jahren beschrieben. In den letzten Jahren haben Cannabinoide und das Endocannabinoidsystem großes Interesse in der Forschung geweckt.

Einige klinische Studien belegten beispielsweise die analgetische Wirkung von Cannabis bei Patienten mit Tumorschmerzen, postoperativem Schmerz oder bei Patienten mit Phantomschmerzen (Dunn und Davis 1974; Noyes et al. 1975; Jain et al. 1981). Ein vollsynthetisches Analogon zu THC ist Nabilone (Cesamet[®]), welches in den USA zur Behandlung von Übelkeit und Erbrechen bei Krebspatienten, sowie bei AIDS-Patienten zur Behandlung von Anorexie aufgrund seiner appetitanregenden Eigenschaften eingesetzt wird (Mendizábal und Adler-Graschinsky 2007).

In Deutschland ist die Verwendung von Cannabis und Abkömmlingen von THC im Betäubungsmittelgesetz (BtMG), insbesondere in den Anlagen I bis III, geregelt. Hierzulande ist Dronabinol (Marinol[®]), ein teil-synthetisches Derivat von THC, für bestimmte Behandlungen, wie Schmerzzustände bei Multipler Sklerose und als Antiemetikum innerhalb einer Chemotherapie, bei Vorliegen eines „Notstandes“ zugelassen.

Mehr und mehr Studien zeigen jedoch, dass Cannabinoide auch weitere wichtige Rollen wie beispielsweise die Kontrolle der pathophysiologischen Funktionen im kardiovaskulären System besitzen. In den letzten Jahren haben viele Autoren die komplexe Interaktion von synthetischen als auch von endogenen Cannabinoiden und ihre Bedeutung für die Regulation des Blutdrucks und der Herzfrequenz verdeutlicht (Hillard 2000; Pacher et al. 2005, 2006). Weitere Untersuchungen zeigen, dass Cannabinoide positive Auswirkungen, wie eine protektive Rolle in der Progression der Atherosklerose und nach Myokardinfarkt besitzen (Mendizábal und Adler-Graschinsky 2007). Eine Erhöhung des Endocannabinoidtonus durch Aktivierung des CB1-R bei Hypertonie kann den Blutdruckanstieg verringern und die kardiale Kontraktionskraft stärken (Pacher et al. 2006). Die pharmakologische Manipulation des Endocannabinoid-Systems bietet somit neuartige therapeutische Ansätze in einer Vielzahl von kardiovaskulären Erkrankungen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit und die bereits gewonnenen Resultate aus bestehenden Studien zeigen demzufolge vielversprechende Ansatzpunkte auf, die noch weiter zu verfolgen sind. Weiterhin lassen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit vermuten, dass das koronare Endothel, als nicht zu vernachlässigbarer funktioneller Teil des Herzens, in den *in vivo* Versuchen von Staat et al. (2005) und Darling et al. (2007) durch ischämische Postkonditionierung mitprotektioniert worden ist. Koronare Endothelzellen könnten demzufolge dazu beigetragen haben, dass in diesen Studien die kardiale Funktion verbessert wurde.

6 Zusammenfassung

Die Hauptaufgabe der vorliegenden Arbeit war es zu untersuchen, ob die Anwendung ischämischer und pharmakologischer Postkonditionierung isolierte koronare Rattenendothelien vor reperfusionsinduzierter interzellulärer Lückenbildung schützen kann.

Es wurden simulierte Ischämie- und Reperfusionsversuche durchgeführt. Nach einer 5-minütigen normoxischen Vorlaufphase wurden Endothelzellen 40 Minuten lang mit einer anoxischen HEPES-gepufferten Tyrodelösung (pH 6,4, glukosefrei) perfundiert. In der anschließenden 40-minütigen Reoxygenation wurden die Zellen mit einem normoxischen Medium (pH 7,4) unter Zugabe von 5mM Glukose superfundiert.

Es wurden verschiedene Protokolle der ischämischen Postkonditionierung entwickelt, um ihre Auswirkungen auf die reperfusionsinduzierte Lückenbildung und die intrazelluläre Kalziumkonzentration zu untersuchen. Die Anwendung der ischämischen Postkonditionierungsprotokolle „5x(30+30)“ und „10x(30+30)“ schützen Endothelzellen signifikant vor reperfusionsinduzierter Lückenbildung. Dieser protektive Effekt hat keine Auswirkungen auf die intrazelluläre Kalziumkonzentration und lässt sich auch nicht durch extrazelluläre pH-Wert-Schwankungen in der Reperfusion erzielen. Durch den Einsatz des spezifischen PI3-Kinase-Inhibitors Ly294002, als eine der beteiligten RISK bei der Postkonditionierung, konnte der Schutz vor reperfusionsinduzierter interzellulärer Lückenbildung in den protektiven Protokollen „5x(30+30)+Ly“ und „10x(30+30)+Ly“ aufgehoben werden. Die Aktivierung der PI3K, als ein Schritt der RISK-Signalkaskade, ist bei der Postkonditionierung an koronaren Rattenendothelien essentiell beteiligt.

In einer weiteren Versuchsreihe wurde der Einfluss von Cannabinoiden auf die reperfusionsinduzierte Lückenbildung und die intrazelluläre Kalziumkonzentration an koronaren Endothelzellmonolayern untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass der Einsatz von R1M, einem Cannabinoidrezeptoragonisten, die reperfusionsinduzierte Lückenbildung an Endothelzellen signifikant reduziert. Dieser protektive Effekt beruhte auf der Aktivierung des CB1R und hat keinen Einfluss auf die intrazelluläre Kalziumkonzentration.

Die Inhibition der NOS führte weitestgehend zu einer Aufhebung der R1M-vermittelten Protektion vor reperfusionsinduzierter Lückenbildung. Die Applikation des PKG-Inhibitors KT5823 hatte keinen blockierenden Effekt auf den R1M-vermittelten Schutz vor endothelialer Permeabilitätserhöhung.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Anzahl nekrotischer Zellen in den Versuchen mit R1M signifikant reduziert werden konnte. Diese Schutzwirkung wird über eine NOS-Aktivierung vermittelt, da gezeigt werden konnte, dass die Protektion gegen den endothelialen Reperfusionsschaden durch den NOS-Inhibitor L-NAME aufgehoben wurde. Somit lässt sich feststellen, dass die Aktivierung der NOS durch R1M bei der pharmakologischen Postkonditionierung an koronaren Endothelmonolayern ein essentieller Faktor ist.

7 Summary

The aim of the present study was to investigate whether the application of ischemic and pharmacological postconditioning protects isolated coronary endothelial cells from rats against the formation of intercellular gaps.

Therefore, simulated ischemia and reperfusion experiments were performed. After a five minute normoxic phase, the endothelial cells were perfused with an anoxic HEPES-buffered-Solution (pH 6.4, glucose-free) for 40 minutes. During the following 40 minutes the cells were reoxygenated with a normoxic medium (pH 7.4 + 5 mM glucose).

Several experimental protocols of ischemic postconditioning were developed to investigate the influence on the reperfusion induced gap formation and the intracellular Ca^{2+} -concentration. The ischemic postconditioning protocols "5x(30+30)" and "10x(30+30)" protect endothelial cells significantly against the formation of intercellular gaps. This protective effect does not influence the intracellular Ca^{2+} -concentration and cannot be achieved by extracellular pH variations during reperfusion. Application of the specific PI3-kinase inhibitor Ly294002, as one of the participating RISK in postconditioning, abrogated the protective effect against intercellular gaps in the protocols "5x(30+30)+Ly" and "10x(30+30)+Ly". The activation of PI3K, as a step of RISK signaling cascade, is of essential interest in postconditioning of coronary endothelium

In another series of experiments, the influence of cannabinoids on the reperfusion induced formation of intercellular gaps and the intracellular Ca^{2+} -concentration in coronary endothelial monolayer was investigated. It was shown that the application of R1M, a cannabinoid receptor agonist, significantly reduced intercellular gaps between endothelial cells. This protective effect of R1M is based upon the activation of CB1R and has no effect on the intracellular Ca^{2+} -concentration. The inhibition of NOS abrogated almost completely the protective effect of R1M-mediated protection against reperfusion induced gap formation. The application of the PKG-Inhibitor KT5823 had no blocking effect on the R1M-mediated protection against the increase of endothelial permeability.

Furthermore, R1M significantly reduced the number of necrotic cells. This protective effect is mediated through NOS-activation since the protection against endothelial reperfusion injury could be abrogated by inhibition of NOS with the inhibitor L-NAME. Thus, it can be concluded that the activation of NOS by R1M for pharmacological postconditioning on coronary endothelial monolayers is a necessary factor.

8 Literaturverzeichnis

Abdallah Y., Gkatzoflia A., Gligorievski D., Kasseckert S., Euler G., Schluter K.D., Schafer M., Piper H.M., Schafer C.:

Insulin protects cardiomyocytes against reoxygenation-induced hypercontracture by a survival pathway targeting SR Ca²⁺ storage. *Cardiovasc Res* 2006; 70: 346-353.

Aikawa R., Nawano M., Gu Y., Katagiri H., Asano T., Zhu W., Nagai R., Komuro I.:

Insulin prevents cardiomyocytes from oxidative stress-induced apoptosis through activation of PI3 kinase/Akt. *Circulation* 2000; 102: 2873-2879.

Allshire A., Piper H.M., Cuthbertson K.S., Cobbold PH.:

Cytosolic free Ca²⁺ in single rat heart during ischemia and reoxygenation. *Biochem J* 1987; 244: 382-395.

Argaud L., Gateau-Roesch O., Raisky O., Loufouat J., Robert D., Ovize M.:

Postconditioning inhibits mitochondrial permeability transition. *Circulation* 2005; 111: 194-197.

Bátkai S., Osei-Hyiaman D., Pan H., El-Assal O., Rajesh M., Mukhopadhyay P., Hong F., Harvey-White J., Jafri A., Haskó G., Huffman J.W., Gao B., Kunos G., Pacher P.:

Cannabinoid-2 receptor mediates protection against hepatic ischemia/ reperfusion injury. *FASEB J.* 2007; 21(8): 1788-1800.

Bell R.M., Yellon DM.:

Atorvastatin, administered at the onset of reperfusion, and independent of lipid lowering, protects the myocardium by up-regulating a pro-survival pathway. *J Am Coll Cardiol* 2003; 41: 508-515.

Benowitz N.L. and Jones R.T.:

Cardiovascular effects of prolonged delta-9- tetrahydrocannabinol ingestion. Clin Pharmacol Ther 1975; 18: 287-297.

Bensaid M., Gary-Bobo M., Esclangon A., Maffrand J.P., Le Fur G., Oury-Donat F., Soubrié P.:

The cannabinoid CB1 receptor antagonist SR141716 increases Acrp30 mRNA expression in adipose tissue of obese fa/fa rats and in cultured adipocyte cells. Mol Pharmacol 2003; 63(4): 908-914.

Bernardo N.L., D'Angelo M., Okubo S., Joy A., Kukreja RC.:

Delayed ischemic preconditioning is mediated by opening of ATP-sensitive potassium channels in the rabbit heart. Am J Physiol 1999; 276: H1323-H1330.

Bolli R.:

Cardioprotective function of inducible nitric oxide synthase and role of nitric oxide in myocardial ischemia and preconditioning: an overview of a decade of research. J Mol Cell Cardiol 2001; 11:1897-918.

Bonz A., Laser M., Küllmer S., Kniesch S., Babin-Ebell J., Popp V., Ertl G., Wagner J.A.:

Cannabinoids acting on CB1 receptors decrease contractile performance in human atrial muscle. J Cardiovasc Pharmacol 2003; 41(4): 657-664.

Bopassa J.C., Ferrera R., Gateau-Roesch O., Couture-Lepetit E., Ovize M.:

PI3-kinase regulates the mitochondrial transition pore in controlled reperfusion and postconditioning. Cardiovasc Res 2006; 69: 178-185.

Bouchard J.F., Lépicier P., Lamontagne D. :

Contribution of endocannabinoids in the endothelial protection afforded by Ischemic preconditioning in the isolated rat heart. Life Sci 2003; 72(16): 1859-1870.

Böcker W., Denk H., Heitz P.U., Moch H.:

Pathologie. Urban und Fischer Verlag 2008; 4. Auflage; S.62.

Brunner F., Maier R., Andrew P., Wölkart G., Zechner R., Mayer B.:

Attenuation of myocardial ischemia/reperfusion injury in mice with myocyte-specific overexpression of endothelial nitric oxide synthase. *Cardiovasc Res* 2003; 57: 55-62.

Bullard A.J., Govewalla P., Yellon DM.:

Erythropoietin protects the myocardium against reperfusion injury in vitro and in vivo. *Basic Res Cardiol* 2005; 100: 397-403.

Busse R., Mülsch A., Fleming I. and Hecker M.:

Mechanisms of nitric oxide release from the vascular endothelium. *Circulation* 1993; 87, Suppl. V: V18-V25.

Cardillo C., Kilcoyne C.M., Quyyumi A.A., Cannon R.O. 3rd, Panza J.A.:

Selective defect in nitric oxide synthesis may explain the impaired endothelium-dependent vasodilatation in patients with essential hypertension. *Circulation* 1998; 97(9): 851-856.

Caulfield M.P., Brown D.A.:

Cannabinoid receptor agonists inhibit Ca current in NG108-15 neuroblastoma cells via a pertussis toxin-sensitive mechanism. *Br J Pharmacol.* 1992; 106 (2): 231-2.

Chiari P.C., Bienengraeber M.W., Pagel P.S., Krolikowski J.G., Kersten J.R., Warltier D.C.:

Isoflurane protects against myocardial infarction during early reperfusion by activation of phosphatidylinositol-3-kinase signaltransduction: evidence for anesthetic-induced postconditioning in rabbits. *Anesthesiology* 2005; 102: 102-109.

Chung J., Grammer T.C., Lemon K.P., Kazlauskas A., Blenis J.:

PDGF- and insulin-dependent pp70S6k activation mediated by phosphatidylinositol-3-OH kinase. *Nature* 1994; 370: 71-75.

Cohen R.A., Vanhoutte P.M.:

Endothelium-dependent hyperpolarization. Beyond nitric oxide and cyclic GMP. *Circulation*. 1995; 92(11): 3337-49. Review.

Cohen M.V., Yang X.M., Downey J.M.:

The pH hypothesis of postconditioning: staccato reperfusion reintroduces oxygen and perpetuates myocardial acidosis. *Circulation* 2007; 115: 1895–1903.

Cooke, J.P., Rossitch, E., Andon, N.A., Loscalzo, J., Dzau, V.J.:

Flow activates an endothelial potassium channel to release an endogenous nitrovasodilator. *J Clin Invest* 1991; 88: 1663-1671.

Cotran R. S.:

New role for the endothelium in inflammatory and immunity. *Am J Pathol* 1987; 129: 407-413.

Curry F. E.:

Modulation of venular microvessels permeability by calcium influx into endothelial cells. *FASEB J* 1992; 6: 2456-2466.

Darling C.E., Solari P.B., Smith C.S., Furman M.I., Przyklenk K.:

Postconditioning' the human heart: multiple balloon inflations during primaryangioplasty may confer cardioprotection. *Basic Res Cardiol* 2007; 102 (3): 274-278.

Defer N., Wan J., Souktani R., Escoubet B., Perier M., Caramelle P., Manin S., Deveaux V., Bourin M.C., Zimmer A., Lotersztajn S., Pecker F., Pavoine C.:

The cannabinoid receptor type 2 promotes cardiac myocyte and fibroblast survival and protects against ischemia/reperfusion-induced cardiomyopathy. *FASEB J* 2009; 23: 2120-2130.

DeFily D.V. and Chilian W.M.:

Preconditioning protects coronary arteriolar endothelium from ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol* 1993; 265: H700-H706.

Deutsch D.G., Goligorsky M.S., Schmid P.C., Krebsbach R.J., Schmid H.H., Das S.K., Dey S.K., Arreaza G., Thorup C., Stefano G., Moore LC.:

Production and physiological actions of anandamide in the vasculature of the rat kidney. *J Clin Invest* 1997; 100(6): 1538-1546.

Deutsch E., Berger M., Kussmaul W.G., Hirshfeld J.W. Jr., Herrmann H.C., Laskey W.K.:

Adaptation to ischemia during percutaneous transluminal coronary angioplasty. Clinical, hemodynamic, and metabolic features. *Circulation* 1990; 82: 2044-2051.

Devane W.A., Hanus L., Breuer A., Pertwee R.G., Stevenson L.A., Griffin G., Gibson D., Mandelbaum A., Etinger A., Mechoulam R.:

Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* 1992; 258(5090): 1946-1949.

Diaz M.N., Frei B., Vita J.A., Keaney J.F. Jr.:

Antioxidants and atherosclerotic heart disease. *N Engl J Med* 1997; 337(6): 408-416. Review.

Dolor R.J., Hurwitz L.M., Mirza Z., Strauss H.C., Whorton A.R.:

Regulation of extracellular calcium entry in endothelial cells: role of intracellular calcium pool. *Am J Physiol* 1992; 262: C171-C181.

Dunn M., Davis R.:

The perceived effects of marijuana on spinal cord injured males. *Paraplegia*. 1974; 12(3): 175.

Ellert-Miklaszewska A., Kaminska B., Konarska L.:

Cannabinoids down-regulate PI3K/AKT and Erk signalling pathways and activate proapoptotic function of Bad protein. *Cell Signal* 2005; 17(1): 25-37.

Felder C.C., Joyce K.E., Briley E.M., Mansouri J., Mackie K., Blond O., Lai Y., Ma A.L., Mitchell R.L.:

Comparison of the pharmacology and signal transduction of the human cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Mol Pharmacol*. 1995; 48(3): 443-50.

Feng J., Lucchinetti E., Ahuja P., Pasch T., Perriard J.C., Zaugg M.:

Isoflurane postconditioning prevents opening of the mitochondrial permeability transition pore through inhibition of glycogen synthase kinase 3beta. *Anesthesiology* 2005; 103: 987-995.

Feng J., Fischer G., Lucchinetti E., Zhu M., Bestmann L., Jegger D., Arras M., Pasch T., Perriard J.C., Schaub M.C., Zaugg M.:

Infarct-remodeled myocardium is receptive to protection by isoflurane postconditioning: role of protein kinase B/Akt signaling. *Anesthesiology* 2006; 104: 1004-1014.

Fimiani C., Mattocks D., Cavani F., Salzet M., Deutsch D.G., Pryor S., Bilfinger T.V., Stefano G.B.:

Morphine and anandamide stimulate intracellular calcium transients in human arterial endothelial cells: coupling to nitric oxide release. *Cell Signal* 1999; 11(3): 189-193.

Foster D.C., Wedel B.J., Robinson S.W., Garbers D.L.:

Mechanisms of regulation and functions of guanylyl cyclases. *Rev PhysiolBiochem Pharmacol* 1999;135: 1-39. Review.

Fujita M., Asanuma H., Hirata A., Wakeno M., Takahama H., Sasaki H., Kim J., Takashima S., Tsukamoto O., Minamino T., Shinozaki Y., Tomoike H., Hori M., Kitakaze M.:

Prolonged transient acidosis during early reperfusion contributes to the cardioprotective effects of postconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007; 292: H2004-H2008.

Furchgott R. F. and Zawadzki J.V.:

The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of atrial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; 288: 373-376.

Furchgott R.F., Jothianandan D., Khan M.T.:

Comparison of nitric oxide, S-nitrosocysteine and EDRF as relaxants of rabbit aorta. *Jpn J Pharmacol* 1992; 58 Suppl 2: P185 -P191.

Gabbiani G., Gabbiani F., Lombardi D., Schwartz S.M.:

Organization of actin cytoskeleton in normal and regenerating arterial endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; 80: 2361-2374.

Galagudza M.M., Kurapeev D.I., Minasian S., Valen G., Vaage J.:

Ischemic postconditioning: brief ischemia during reperfusion converts persistent ventricular fibrillation into regular rhythm. *Eur J Card Thorac Surg* 2004; 25: 1006-1010.

Gao F., Gao E., Yue T.L., Ohlstein E.H., Lopez B.L., Christopher T.A., Ma X.L.:

Nitric oxide mediates the antiapoptotic effect of insulin in myocardial ischemia-reperfusion: the roles of PI3-kinase, Akt, and endothelial nitric oxide synthase phosphorylation. *Circulation* 2002; 105(12): 1497-1502.

Garcia J.G., Davis H.W., Patterson C.E. :

Regulation of endothelial cell gap formation and barrier dysfunction: role of myosin light chain phosphorylation. *J Cell Physiol* 1995; 163: 510-522.

Garcia J.G., Schaphorst K.L.:

Regulation of endothelial cell gap formation and paracellular permeability. *J Investig Med* 1995; 43: 117-126.

Garcia-Dorado D., Th eroux P., Munoz R., Alonso J., Elizaga J., Fernandez-Avil es F., Botas J., Solares J., Soriano J., Duran J.M.:

Favorable effects of hyperosmotic reperfusion on myocardial edema and infarct size. *Am J Physiol* 1992; 262 (1 Pt 2): H17-22.

Garcia-Dorado D., Oliveras J.:

Myocardial oedema: a preventable cause of reperfusion injury? *Cardiovasc Res* 1993; 27 (9): 1555-1563. Review.

Geissler H.J, and Allen S.J.:

Myocardial fluid balance: pathophysiology and clinical implications. *Thorac Cardiovasc Surg* 1998; 46 Suppl 2: 242-245; discussion 246-247. Review.

Goeckeler Z.M., Wysolmerski R.B.:

Myosin light chain kinase-regulated endothelial cell contraction: the relationship between isometric tension, actin polymerization, and myosin phosphorylation. *J Cell Biol* 1995; 130: 613-627.

G mez Del Pulgar T., Velasco G., Guzm n M.:

The CB1 cannabinoid receptor is coupled to the activation of protein kinase B/Akt. *Biochem J* 2000; 347 (Pt 2): 369-373.

Gómez Del Pulgar T., De Ceballos M.L., Guzmán M., Velasco G.:

Cannabinoids protect astrocytes from ceramid-induced apoptosis through the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway. *J Biol Chem* 2002; 277 (39): 36527-36533.

Gottlieb R.A., Burleson K.O., Kloner R.A., Babior B.M., Engler R.L.:

Reperfusion injury induces apoptosis in rabbit cardiomyocytes. *J Clin Invest* 1994; 94 (4): 1621-1628.

Gray M.O., Karliner J.S., Mochly-Rosen D.:

A selective epsilon-protein kinase C antagonist inhibits protection of cardiac myocytes from hypoxia-induced cell death. *J Biol Chem* 1997; 272 (49): 30945-30951.

Grynkiewicz G., Poenie M., Tsien RY.:

A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 1985; 260: 3340-3350.

Gündüz D., Hirche F., Härtel F.V., Rodewald C.W., Schäfer M., Pfitzer G., Piper

H.M., Noll T.:

ATP antagonism of thrombin-induced endothelial barrier permeability. *Cardiovasc Res* 2003; 59: 470-478.

Gündüz D., Kasseckert S.A., Härtel F.V., Aslam M., Abdallah Y., Schäfer M.,

Piper H.M., Noll T., Schäfer C.:

Accumulation of extracellular ATP protects against acute reperfusion injury in rat heart endothelial cells. *Cardiovasc Res* 2006; 71: 764-773.

Hajrasouliha A.R., Tavakoli S., Ghasemi M., Jabehdar-Maralani P., Sadeghipour

H., Ebrahimi F., Dehpour A.R.:

Endogenous cannabinoids contribute to remote ischemic preconditioning via cannabinoid CB₂ receptors in the rat heart. *Eur J Pharmacol* 2008; 579 (1-3): 246-252.

Halkos M.E., Kerendi F., Corvera J.S., Wang N.P., Kin H., Payne C.S., Sun H.Y., Guyton R.A., Vinten-Johansen J., Zhao ZQ. :

Myocardial protection with postconditioning is not enhanced by ischemic preconditioning. *Ann Thorac Surg* 2004; 78: 961-969.

Hausenloy D.J., Maddock H.L., Baxter G.F., Yellon D.M.:

Inhibiting mitochondrial permeability transition pore opening: a new paradigm for myocardial preconditioning? *Cardiovasc Res.* 2002; 55(3): 534-43.

Hausenloy D.J., Yellon D.M.:

The mitochondrial permeability transition pore: its fundamental role in mediating cell death during ischaemia and reperfusion. *J Mol Cell Cardiol.* 2003; 35(4): 339-41.

Hausenloy D.J., Tsang A., Mocanu M.M., Yellon D.M.:

Ischemic preconditioning protects by activating prosurvival kinases at reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005a; 288: H971-H976.

Hausenloy D.J., Tsang A., Yellon D.M.:

The reperfusion injury salvage kinase pathway: a common target for both ischemic preconditioning and postconditioning. *Trends Cardiovasc Med* 2005b; 15: 69-75

Helisch A., Ware J.A.:

Therapeutic angiogenesis in ischemic heart disease. *Thromb Haemost* 1999; 82: 772-780.

Herkenham M., Lynn A.B., Little M.D., Johnson M.R., Melvin L.S., de Costa B.R., Rice K.C.:

Cannabinoid receptor localization in brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87 (5): 1932-1936.

Hiley C.R., Ford W.R.:

Cannabinoid pharmacology in the cardiovascular system: potential protective mechanisms through lipid signalling. *Biol Rev Camb Philos Soc* 2004; 79 (1): 187-205. Review.

Hillard C.J.:

Endocannabinoids and vascular function. *J Pharmacol Exp Ther.* 2000; 294 (1): 27-32. Review.

Hoffman J.W. Jr., Gilbert T.B., Poston R.S., Silldorff E.P.:

Myocardial reperfusion injury: etiology, mechanisms, and therapies. *J Extra Corpor Technol* 2004; 36 (4): 391-411.

Holleyman C., Larson D., Hunter K.:

Simulation of ischemic reperfusion in endothelial cell culture increases apoptosis. *J Extra Corpor Technol* 2001; 33 (3): 175-180.

Howlett A.C., Qualy J.M. and Khachatryan L.L.:

Involvement of Gi in the inhibition of adenylate cyclase by cannabimimetic drugs. *Mol Pharmacol* 1986; 29: 307-313.

Howlett A.C.:

Pharmacology of cannabinoid receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1995; 35: 607-634.

Howlett A.C.:

Cannabinoid receptor signaling. *Handb Exp Pharmacol Review* 2005; 168: 53-79.

Huestis M.A., Sampson A.H., Holicky B.J., Henningfield J.E., Cone E.J.:

Characterization of the absorption phase of marijuana smoking. *Clin Pharmacol Ther* 1992; 52: 31-41.

Iliodromitis E.K., Georgiadis M., Cohen M.V., Downey J.M., Bofilis E., Kremastinos D.T.:

Protection from postconditioning depends on the number of short ischemic insults in anesthetized pigs. *Basic Res Cardiol* 2006; 101: 502-507.

Jaffe E. A., Nachmann R.L., Becker C.G., Minick C. R.:

Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins, Identification by morphologic and immunologic criteria. *J Clin Invest* 1973; 52: 2745-2750.

Jain A.K., Ryan J.R., McMahon F.G., Smith G.:

Evaluation of intramuscular levonantradol and placebo in acute postoperative pain. *J Clin Pharmacol.* 1981; 21(8-9 Suppl): 320S - 326S.

Jin R.C., Voetsch B., Loscalzo J.:

Endogenous mechanisms of inhibition of platelet function. *Microcirculation* 2005; 12 (3): 247-258. Review.

Joyeux M., Arnaud C., Godin-Ribuot D., Demenge P., Lamontagne D., Ribuot C.:

Endocannabinoids are implicated in the infarct size-reducing effect conferred by heat stress preconditioning in isolated rat hearts. *Cardiovasc Res* 2002; 55 (3): 619-625.

Kasseckert S.A., Schäfer C., Kluger A., Gligorievski D., Tillmann J., Schlüter K.D., Noll T., Sauer H., Piper H.M., Abdallah Y.:

Stimulation of cGMP signalling protects coronary endothelium against reperfusion-induced intercellular gap formation. *Cardiovasc Res* 2009; 83 (2): 381-387.

Kim J.S., Ohshima S., Pediaditakis P., Lemasters J.J.:

Nitric oxide: a signaling molecule against mitochondrial permeability transition and pH-dependent cell death after reperfusion. *Free Radic Biol Med* 2004; 37 (12): 1943-1950. Review.

Kin H., Zhao Z.-Q., Sun H.-Y., Wang N.-P., Corvera J.S., Halkos M.E., Kerendi F., Guyton R.A., Vinten-Johansen J.:

Postconditioning attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by inhibiting events in the early minutes of reperfusion. *Cardiovasc Res* 2004; 62: 74-85.

Krieg T., Qin Q., McIntosh E.C., Cohen M.V., Downey J.M.:

ACh and adenosine activate PI3-kinase in rabbit hearts through transactivation of receptor tyrosine kinases. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002; 283: H2322-H2330.

Kumar S., Kasseckert S., Kostin S., Abdallah Y., Schafer C., Kaminski A., Reusch H.P., Piper H.M., Steinhoff G., Ladilov Y.:

Ischemic acidosis causes apoptosis in coronary endothelial cells through activation of caspase-12. *Cardiovasc Res* 2007; 73 (1): 172-180.

Kunos G., Bátkai S., Offertáler L., Mo F., Liu J., Karcher J., Harvey-White J.:

The quest for a vascular endothelial cannabinoid receptor. *Chem Phys Lipids Review* 2002; 121 (1-2): 45-56.

Ladilov Y., Schäfer C., Held A., Schäfer M., Noll T., Piper H.M.:

Mechanism of Ca²⁺ overload in endothelial cells exposed to simulated ischemia. *Cardiovasc Res* 2000; 47: 394-403.

Lagneux C., Lamontagne D.:

Involvement of cannabinoids in the cardioprotection induced by lipopolysaccharide. *Br J Pharmacol* 2001; 132 (4): 793-796.

Lake K.D., Compton D.R., Varga K., Martin B.R., Kunos G.:

Cannabinoid-induced hypotension and bradycardia in rats mediated by CB₁-like cannabinoid receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 1997; 281: 1030-1037.

Lamontagne D., Lépicier P., Lagneux C., Bouchard J.F.:

The endogenous cardiac cannabinoid system: a new protective mechanism against myocardial ischemia. *Arch Mal Coeur Vaiss* 2006; 99 (3): 242-246. Review.

Laskey W.K.:

Brief repetitive balloon occlusions enhance reperfusion during percutaneous coronary intervention for acute myocardial infarction: a pilot study. *Catheter Cardiovasc Interv* 2005; 65: 361-367.

Lee M.R., Li L., Kitazawa T.:

Cyclic GMP causes Ca²⁺ desensitization in vascular smooth muscle by activating the myosin light chain phosphatase. *J Biol Chem.* 1997; 272 (8): 5063-8.

Lemarchand P., Jaffe H.A., Danel C., Cid M.C., Kleinman H.K., Stratford-Perricaudet L.D., Perricaudet M., Pavirani A., Lecocq J.P., Crystal R.G.:

Adenovirus-mediated transfer of a recombinant human alpha 1-antitrypsin cDNA to human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci* 1992; 89: 6482-6486.

Lépicier P., Bouchard J.F., Lagneux C., Lamontagne D.:

Endocannabinoids protect the rat isolated heart against ischaemia. *Br J Pharmacol* 2003; 139 (4): 805-815.

Lépicier P., Bibeau-Poirier A., Lagneux C., Servant M.J., Lamontagne D.:

Signaling pathways involved in the cardioprotective effects of cannabinoids. *J Pharmacol Sci* 2006; 102 (2): 155-166. Review.

Li Q., Altschuld A., Stokes B.T.:

Quantification of intracellular free calcium in single adult cardiomyocytes by fura-2 fluorescence microscopy: calibration of fura-2 ratios. *Biochem Biophys Res Commun* 1987; 47: 120-126.

Liebich H.-G., Böck P., Budras K.-D.:

Funktionelle Histologie der Haussäugetiere. Schattauer Verlag 2004; 4. Auflage; S: 130-131.

Lin M.I., Fulton D., Babbitt R., Fleming I., Busse R., Pritchard K.A. Jr., Sessa W.C.:

Phosphorylation of threonine 497 in endothelial nitric-oxide synthase coordinates the coupling of L-arginine metabolism to efficient nitric oxide production. *J Biol Chem* 2003; 278 (45): 44719-44726.

Liu G.S., Thornton J., Van Winkle D.M., Stanley A.W., Olsson R.A., Downey J.M.:

Protection against infarction afforded by preconditioning is mediated by A1 adenosine receptors in rabbit heart. *Circulation* 1991; 84: 350-356.

Liu J., Gao B., Mirshahi F., Sanyal A.J., Khanolkar A.D., Makriyannis A., Kunos G.:

Functional CB1 cannabinoid receptors in human vascular endothelial cells. *Biochem J* 2000; 346 (Pt 3): 835-840.

Liu J., Batkai S., Pacher P., Harvey-White J., Wagner J.A., Cravatt B.F., Gao B., Kunos G.:

Lipopolysaccharide induces anandamide synthesis in macrophages via CD14/MAPK/phosphoinositide 3-kinase/NF-kappaB independently of platelet-activating factor. *J Biol Chem.* 2003; 278 (45): 45034-9.

Loscalzo J.:

Nitric oxide insufficiency, platelet activation, and arterial thrombosis. *Circ Res* 2001; 88 (8): 756-762. Review.

Loukogeorgakis S.P., Panagiotidou A.T., Broadhead M.W., Donald A., Deanfield J.E., MacAllister R.J.:

Remote ischemic preconditioning provides early and late protection against endothelial ischemia-reperfusion injury in humans: role of the autonomic nervous system. *J Am Coll Cardiol* 2005; 46 (3): 450-456.

Ludbrook J.:

Repeated measurements and multiple comparisons in cardiovascular research. Cardiovasc Res 1994; 28: 303-311.

Maccarrone M., Bari M., Lorenzon T., Bisogno T., Di Marzo V., Finazzi-Agrò A.:

Anandamide uptake by human endothelial cells and its regulation by nitric oxide. J Biol Chem. 2000; 275 (18): 13484-92.

Maccarrone M., De Petrocellis L., Bari M., Fezza F., Salvati S., Di Marzo V., Finazzi-Agrò A.:

Lipopolysaccharide downregulates fatty acid amide hydrolase expression and increases anandamide levels in human peripheral lymphocytes. Arch Biochem Biophys. 2001; 393(2): 321-8.

Mackie K., Devane W.A., Hille B.:

Anandamide, an endogenous cannabinoid, inhibits calcium currents as a partial agonist in N18 neuroblastoma cells. Mol Pharmacol. 1993; 44 (3): 498-503.

McCollum L., Howlett A.C., Mukhopadhyay S.:

Anandamide-mediated CB1/CB2 cannabinoid receptor--independent nitric oxide production in rabbit aortic endothelial cells. J Pharmacol Exp Ther 2007; 321 (3):930-937.

Mechoulam R., Ben-Shabat S., Hanus L., Ligumsky M., Kaminski N.E., Schatz A.R., Gopher A., Almog S., Martin B.R., Compton D.R.:

Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. Biochem Pharmacol 1995; 50 (1):83-90.

Mehlhorn U., Geissler H.J., Laine G.A., Allen S.J.:

Myocardial fluid balance. Eur J Cardiothorac Surg 2001; 20 (6):1220-1230. Review.

Mendizábal V.E., Adler-Graschinsky E.:

Cannabinoids as therapeutic agents in cardiovascular disease: a tale of passions and illusions. *Br J Pharmacol.* 2007; 151(4): 427-40.

Mocanu M.M., Bell R.M., Yellon D.M.:

PI3 kinase and not p42/p44 appears to be implicated in the protection conferred by ischemic preconditioning. *J Mol Cell Cardiol* 2002; 34: 661-668.

Molina-Holgado E., Vela J.M., Arévalo-Martín A., Almazán G., Molina-Holgado F., Borrell J., Guaza C.:

Cannabinoids promote oligodendrocyte progenitor survival: involvement of cannabinoid receptors and phosphatidylinositol-3-kinase/Akt signalling. *J Neurosci* 2002; 22 (22): 9742-9753.

Moncada S., Higgs E.A.:

Molecular mechanisms and therapeutic strategies related to nitric oxide. *FASEB J* 1995; 9 (13): 1319-1330.

Muhs A., Noll T., und Piper H.M.:

Vinculin phosphorylation and barrier failure of coronary endothelial monolayers under energy depletion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1997; 273: H608-H617.

Munro S., Thomas K.L., Abu-Shaar M.:

Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* 1993; 365 (6441): 61-65.

Murry C.E., Jennings R.B., Reimer K.A.:

Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 1986; 74: 1124-1136.

Nathan C. und Q.W. Xie.:

Nitric oxide synthases: Roles, tolls and controls. *Cell* 1994; 78: 915-918.

Newby A. C., Henderson A. H.:

Stimulus-secretion coupling in vascular endothelial cells. *Ann Rev Physiol* 1990; 52: 661-674.

Nishida H., Sato T., Nomura M., Miyazaki M., Nakaya H.:

Glimepiride treatment upon reperfusion limits infarct size via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in rabbit hearts. *J Pharmacol Sci* 2009; 109 (2): 251-256.

Noll T., Muhs A., Besselmann M., Watanabe H., und Piper H.M.:

Initiation of hyperpermeability in energy-depleted coronary endothelial monolayers. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1995; 268: H1462-H1470.

Noyes R. Jr., Brunk S.F., Avery D.A., Canter A.C.:

The analgesic properties of delta-9-tetrahydrocannabinol and codeine. *Clin Pharmacol Ther.* 1975; 18 (1): 84-9.

Okubo S., Xi L., Bernardo N.L. Yoshida K., Kukreja R.C.:

Myocardial preconditioning : basic concepts and potential . *Mol Cell Biochem* 1999; 196 (1-2): 3-12. Review.

Ozaita A., Puighermanal E., Maldonado R.:

Regulation of PI3K/Akt/GSK-3 pathway by cannabinoids in the brain. *J Neurochem* 2007; 102 (4): 1105-1114.

Pacher P., Bátkai S., Kunos G.:

Blood pressure regulation by endocannabinoids and their receptors. *Neuropharmacology.* 2005; 48:1130–1138.

Pacher P., Bátkai S., Kunos G.:

The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy. *Pharmacol Rev.* 2006; 58 (3): 389-462. Review.

Palmer R.M., Ferrige A.G., Moncada S.:

Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987; 327: 524-536.

Philipp S., Yang X.M., Cui L., Davis A.M., Downey J.M., Cohen M.V.:

Postconditioning protects rabbit hearts through a protein kinase C-adenosine A2b receptor cascade. *Cardiovasc Res* 2006; 70: 308-314.

Piper H.M., Spahr R., Mertens S., Krütfeld A., Watanabe H.:

Microvascular endothelial cells from heart. In: Piper HM, ed. *Cell Culture Techniques in Heart and Vessel Research*. Heidelberg: Springer 1990: 158-177.

Putney J.W. Jr.:

The integration of receptor-regulated intracellular calcium release and calcium entry across the plasma membrane. *Curr Top Cell Regul* 1990; 31: 111-127.

Radomski M.W., Palmer R.M., Moncada S.:

Characterization of the L-arginine:nitric oxide pathway in human platelets. *Br J Pharmacol* 1990; 101 (2): 325-328.

Radomski M.W., Moncada S.:

The biological and pharmacological role of nitric oxide in platelet function. *Adv Exp Med Biol* 1993; 344: 251-264. Review.

Rajesh M., Pan H., Mukhopadhyay P., Bátkai S., Osei-Hyiaman D., Haskó G., Liaudet L., Gao B., Pacher P.:

Cannabinoid-2 receptor agonist HU-308 protects hepatic ischemia/reperfusion injury attenuating oxidative stress, inflammatory response, and apoptosis. *J Leukoc Biol* 2007; 82 (6): 1382-1389.

Randall M.D., Alexander S.P., Bennett T., Boyd E.A., Fry J.R., Gardiner S.M., Kemp P.A., McCulloch A.I., Kendall D.A.:

An endogenous cannabinoid as an endothelium-derived vasorelaxant. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996; 229 (1): 114-20.

Ruiz-Meana M., García-Dorado D.:

Translational cardiovascular medicine (II). Pathophysiology of ischemia-reperfusion injury: new therapeutic options for acute myocardial infarction. *Rev Esp Cardiol* 2009; 62 (2): 199-209. Review.

Sánchez M.G., Ruiz-Llorente L., Sánchez A.M., Díaz-Laviada I.:

Activation of phosphoinositide 3-kinase/PKB pathway by CB(1) and CB(2) cannabinoid receptors expressed in prostate PC-3 cells. Involvement in Raf-1 stimulation and NGF induction. *Cell Signal* 2003; 15 (9): 851-859.

Saxenhofer H., Fitzgibbon W.R., Paul R.V.:

Urodilatin: binding properties and stimulation of cGMP generation in rat kidney cells. *Am J Physiol* 1993; 264: F267-F273.

Schäfer C., Walther S., Schäfer M., Dietrich L., Kasseckert S., Abdallah Y., Piper H.M.:

Inhibition of contractile activation reduces reoxygenation-induced endothelial gap formation. *Cardiovasc Res* 2003; 58: 149-155.

Schäfer M., Bahde D., Bosche B., Ladilov Y., Schäfer C., Piper H.M., and Noll T.:

Modulation of early $[Ca^{2+}]_i$ rise in metabolically inhibited endothelial cells by xestospongine C. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; 280 (3): H1002-H1010.

Schnittler H.J., Wilke A., Gress T., Suttrop N., Drenckhahn D.:

Role of actin and myosin in the control of paracellular permeability in pig, rat and human vascular endothelium. *J Physiol* 1990; 431: 379-401.

Schulz R., Kelm M., Heusch G.:

Nitric oxide in myocardial ischemia/reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 2004; 61 (3): 402-413.

Sheldon R., Moy A., Lindsley K., Shasby S., Shasby D.M.:

Role of myosin light-chain phosphorylation in endothelial cell retraction. *Am J Physiol* 1993; 265: L606-L612.

Simmons M.L., Murphy S.:

Induction of nitric oxide synthase in glial cells. *J Neurochem* 1992; 59 (3):897-905.

Simmons M.L., Murphy S.:

Roles for protein kinases in the induction of nitric oxide synthase in astrocytes. *Glia* 1994; 11 (3): 227-234.

Snabaitis A.K., Cuello F., Avkiran M. :

Protein kinase B/Akt phosphorylates and inhibits the cardiac Na⁺/H⁺ exchanger NHE1. *Circ Res* 2008; 103: 881–890.

Sneddon J.M., Vane JR.:

Endothelium-derived relaxing factor reduces platelet adhesion to bovine endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; 85 (8): 2800-2804.

Speechly-Dick M.E., Baxter G.F., Yellon D.M.:

Ischaemic preconditioning protects hypertrophied myocardium. *Cardiovasc Res* 1994; 28: 1025-1029.

Staat P., Rioufol G., Piot C., Cottin Y., Cung T.T., L'Huillier I., Aupetit J.F., Bonnefoy E., Finet G., Andre-Fouet X., Ovize M.:

Postconditioning the human heart. *Circulation* 2005; 112: 2143-2148.

Stefano G.B., Esch T., Cadet P., Zhu W., Mantione K., Benson H.:

Endocannabinoids as autoregulatory signaling molecules: coupling to nitric oxide and a possible association with the relaxation response. *Med Sci Monit.* 2003; RA 63-75. Review.

Sugiura T., Kodaka T., Nakane S., Kishimoto S., Kondo S., Waku K.:

Detection of an endogenous cannabimimetic molecule, 2-arachidonoylglycerol, and cannabinoid CB1 receptor mRNA in human vascular cells: is 2-arachidonoylglycerol a possible vasomodulator? *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 243 (3): 838-843.

Taimor G., Lorenz H., Hofstaetter B., Schlüter K.D., Piper H.M.:

Induction of necrosis but not apoptosis after anoxia and reoxygenation in isolated adult cardiomyocytes of rat. *Cardiovasc Res* 1999; 41 (1):147-156.

Thibault H., Piot C., Staat P., Bontemps L., Sportouch C., Rioufol G., Cung T.T., Bonnefoy E., Angoulvant D., Aupetit J.F., Finet G., André-Fouët X., Macia J.C., Raczka F., Rossi R., Itti R., Kirkorian G., Derumeaux G., Ovize M.:
Long-term benefit of postconditioning. *Circulation* 2008; 117: 1037-1044.

Thors B., Halldórsson H., Clarke G.D., Thorgeirsson G.:

Inhibition of Akt phosphorylation by thrombin, histamin and lysophosphatidylcholin in endothelial cells. Different role of protein kinase C. *Atherosclerosis* 2003; 168 (2): 245-253.

Tiruppathi C., Minshall R.D., Paria B.C., Vogel S.M., Malik A.B.:

Role of Ca²⁺ signaling in the regulation of endothelial permeability. *Vascul Pharmacol* 2002; 39 (4-5): 173-185.

Tong H., Chen W., Steenbergen C., Murphy E.:

Ischemic preconditioning activates phosphatidylinositol-3-kinase upstream of protein kinase C. *Circ Res* 2000; 87: 309-315.

Tong H., Imahashi K., Steenbergen C., Murphy E.:

Phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 β during preconditioning through a phosphatidylinositol-3-kinase-dependent pathway is cardioprotective. *Circ Res* 2002; 90: 377-379.

Trump B.F., Berezsky I.K., Chang S.H., Phelps P.C.:

The pathways of cell death: oncosis, apoptosis, and necrosis. *Toxicol Pathol* 1997; 25 (1): 82-88.

Tsang A., Hausenloy D.J., Mocanu M.M., Yellon D.M.:

Postconditioning: a form of „modified reperfusion“ protects the myocardium by activating the phosphatidylinositol-3-kinase-Akt pathway. *Circ Res* 2004; 95: 230-232.

Underdown N.J., Hiley C.R., Ford W.R.:

Anandamide reduces infarct size in rat isolated hearts subjected to ischaemia-reperfusion by a novel cannabinoid mechanism. *Br J Pharmacol* 2005; 146 (6): 809-816.

Vahlhaus C., Schulz R., Post H., Onallah R., Heusch G.:

No prevention of ischemic preconditioning by the protein kinase C inhibitor staurosporine in swine. *Circ Res* 1996; 79 (3): 407-414.

Vale R.D.:

Getting a grip on myosin. *Cell* 1994; 78(5): 733-737.

van Hinsbergh W.M.:

Endothelial permeability for macromolecules. Mechanistic aspects of pathophysiological modulation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17 (6): 1018-1023.

Wagner J.A., J arai Z., B atkai S., Kunos G.:

Hemodynamic effects of cannabinoids: coronary and cerebral vasodilation mediated by cannabinoid CB(1) receptors. *Eur J Pharmacol* 2001a; 423 (2-3): 203-210.

Wagner J.A., Hu K., Bauersachs J., Karcher J., Wiesler M., Goparaju S.K., Kunos G., Ertl G.:

Endogenous cannabinoids mediate hypotension after experimental myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2001b; 38 (7): 2048-2054.

Wang W.Z., Fang X.H., Stephenson L.L., Khiabani K.T., Zamboni W.A.:

Ischemia-reperfusion-induced apoptotic endothelial cells isolated from rat skeletal muscle. *Plast Reconstr Surg* 2009; 123 (2 Suppl): 131S-138S.

Watanabe H., Kuhne W., Spahr R., Schwartz P., und Piper H.M.:

Macromolecule permeability of coronary and aortic endothelial cells under energy depletion. *Am J Physiol* 1991; 260: H1344-H1352.

Wolfrum S., Dendorfer A., Schutt M., Weidtmann B., Heep A., Tempel K., Klein H.H., Dominiak P., Richardt G.:

Simvastatin acutely reduces myocardial reperfusion injury in vivo by activating the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *J Cardiovasc Pharmacol* 2004; 44 (3): 348-355.

Wong A.J., Pollard T.D., Herman I.M.:

Actin filament stress fibers in vascular endothelial cells in vivo. *Science* 1983; 219: 867-879.

Wyllie A.H., Kerr J.F.R., Currie A.R.:

Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 1980; 68: 251-306.

Wysolmerski R.B., Lagunoff D.:

Regulation of permeabilized endothelial cell retraction by myosin phosphorylation. *Am J Physiol.* 1991; 261(1 Pt 1): C32-40.

Yang X.-M., Proctor B., Cui L., Krieg T., Downey J.M., Cohen M.V.:

Multiple, brief coronary occlusions during early reperfusion protect rabbit hearts by targeting cell signaling pathways. *J Am Coll Cardiol* 2004a; 44: 1103-1110.

Yang X.-M, Krieg T., Cui L., Downey J.M., Cohen M.V.:

NECA and bradykinin at reperfusion reduce infarction in rabbit hearts by signaling through PI3K, ERK and NO. *J Mol Cell Cardiol* 2004b; 36: 411-421.

Yang X.-M., Philipp S., Downey J.M., Cohen M.V.:

Postconditioning's protection is not dependent on circulating blood factors or cells but involves adenosine receptors and requires PI3-kinase and guanylyl cyclase activation. *Basic Res Cardiol* 2005; 100: 57-63.

Yellon D.M., Baxter G.F.:

Reperfusion injury revisited: is there a role for growth factor signaling in limiting lethal reperfusion injury? *Trends Cardiovasc Med* 1999; 9: 245-249.

Yellon D.M., Hausenloy D.J.:

Myocardial reperfusion injury. *N Engl J Med* 2007; 357 (11):1121-1135. Review.

Ytrehus K., Liu Y., Downey J.M.:

Preconditioning protects ischemic rabbit heart by protein kinase C activation. *Am J Physiol* 1994; 266 (3 Pt 2): H1145-H1152.

Zahler S., Kupatt C., Becker B.F.:

Endothelial preconditioning by transient oxidative stress reduces inflammatory responses of cultured endothelial cells to TNF-alpha. *FASEB J* 2000; 14 (3): 555-564.

Zhang M., Martin B.R., Adler M.W., Razdan R.K., Jallo J.I., Tuma R.F.:

Cannabinoid CB(2) receptor activation decreases cerebral infarction in a mouse focal ischemia/reperfusion model. *J Cereb Blood Flow Metab* 2007; (7): 1387-1396.

Zhao J.L., Yang Y.J., You S.J., Cui C.J., Gao R.L.:

Different effects of postconditioning on myocardial no-reflow in the normal and hypercholesterolemic mini-swines. *Microvasc Res* 2007; 73: 137-142.

Zhao Z.Q., Corvera J.S., Halkos M.E., Kerendi F., Wang N.P., Guyton R.A., Vinten-Johanson J.:

Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003; 285: H579-H588.

Zhu M., Feng J., Lucchinetti E., Fischer G., Xu L., Pedrazzini T., Schaub M.C., Zaugg M.:

Ischemic postconditioning protects remodeled myocardium via the PI3K-PKB/Akt reperfusion injury salvage kinase pathway. *Cardiovasc Res* 2006; 72 (1): 152-162.

Zhou X., Zhai X., Ashraf M.:

Preconditioning of bovine endothelial cells. The protective effect is mediated by an adenosine A2 receptor through a protein kinase C signaling pathway. *Circ Res* 1996; 78 (1): 73-81.

9 Kongressbeiträge

V. C. Kratz, T. Shazad, C. Schäfer, H. M. Piper, Y. Abdallah, S. A. Kasseckert:

Ischemic postconditioning of coronary endothelial cells protects against acute barrier failure in a cellular model of ischemia and reperfusion

87. Jahrestagung der deutschen physiologischen Gesellschaft, Köln 2008, PT 11-02

S. A. Kasseckert, **V. C. Kratz**, C. Schäfer, W. Iraqi; Y. Abdallah, H. M. Piper:

Stimulation of endogenous cannabinoid receptor pathway protects coronary endothelium against reperfusion injury

87. Jahrestagung der deutschen physiologischen Gesellschaft, Köln 2008, PT 11-01

V. C. Kratz, S. Kasseckert, T. Shazad, C. Schäfer, H. M. Piper, Y. Abdallah:

Ischemic postconditioning protects coronary endothelial cells against acute barrier failure in a cellular model of ischemia and reperfusion

Deutsche Gesellschaft für Kardiologie – Herz- und Kreislaufforschung e. V. , 74. Jahrestagung, Congress Centrum Mannheim 2008; V 1353

10 Erklärung

Ich erkläre:

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

Verena Christiane Kratz

11 Danksagung

Herrn Prof. Dr. H. M. Piper danke ich für die Bereitstellung und Finanzierung dieser Doktorarbeit.

Herrn Prof. K-D. Schlüter möchte ich sehr dafür Danken, dass er sich der weiteren Betreuung dieser Doktorarbeit angenommen hat.

Herrn Prof. J. Roth danke ich für die freundliche Betreuung dieser Arbeit im Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität.

Ich danke Herrn Dr. Yaser Abdallah und Herrn Dr. Kasseckert für die freundliche Unterstützung und die Betreuung und Beratung bei der Ausarbeitung des Themas.

Danke, den MTA's Frau G. Pfeiffer und D. Schreiber für die freundschaftliche und fachliche Unterstützung sowie Einarbeitung.

Hiermit danke ich meinen engsten Freunden, die immer an mich geglaubt haben: Frau A. Arens, Frau A. Höfner, Frau A.-K. Kratz, Frau B. Grauel und Familie Rothe für die moralische Unterstützung während dieser Zeit.

Meinen Eltern danke ich für die finanzielle Unterstützung während des Studiums und der Doktorarbeit.

Meinen Geschwistern, Geva, Michael und Christian danke ich sehr dafür, dass sie immer ein offenes Ohr für mich hatten.



édition scientifique

VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

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

ISBN: 978-3-8359-5731-2



9 783835 957312