

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Arbeit angefertigt unter der Leitung von Univ.-Prof. Dr. M. Stangassinger

Angefertigt an der Medizinischen Universitätsklinik
der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg im Breisgau

Abteilung Innere Medizin III

Schwerpunkt Kardiologie und Angiologie

(Univ.-Prof. Dr. Ch. Hehrlein)

Zum Einfluss der CO₂-Konzentrations-Erhöhung auf die
Öffnung der mitochondrialen Permeabilitäts-Transitions-pore von
ischämischen humanen Herzmuskelzellen

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde der

Tierärztlichen Fakultät

der Ludwig-Maximilians-Universität München

von Isabel Barbara Eißer

aus Villingen

München 2012

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Stangassinger

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Wanke

Tag der Promotion: 11. Februar 2012

Per aspera ad astra.

Aus Herkules fufens, Seneca

Meinen Lieben

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	1
1.	Das ischämische Myokard	1
2.	Der Reperfusionsschaden	2
2.1.	Folgen der Reperfusion	2
2.1.1.	Bildung reaktiver Sauerstoffspezies	2
2.1.2.	Zellödem	3
2.1.3.	Aktivität des Natrium-Wasserstoff-Austauschers	3
2.1.4.	Calcium-Überschuss induzierte Kontraktur des Myokards	4
2.1.5.	Lokale Entzündung	4
2.1.6.	Öffnung der mitochondrialen Permeabilitäts-Transitions-pore	4
2.1.7.	Regulation des <i>Hypoxia-inducible factor 1</i>	7
2.1.8.	Regulation der Untereinheiten der Cytochrom C Oxidase	7
2.1.9.	Vorgänge zu Beginn der Reperfusion	9
2.2.	Komponenten des Reperfusionsschaden	9
2.2.1.	Mikrovaskuläre Dysfunktion	10
2.2.2.	Letaler Reperfusionsschaden	10
2.2.3.	<i>Stunned myocardium</i>	11
3.	Die Postkonditionierung	13
3.1.	Zeitlicher Ablauf der Postkonditionierung	18
3.2.	Wirkung der Postkonditionierung	18
3.2.1.	Guaninnucleotid-bindende Protein gekoppelte Rezeptoren	19
3.2.1.1	Adenosin	19
3.2.1.2	Bradykinin	20
3.2.1.3	Opioide	20
3.2.2.	Protektive Signalwege	20
3.2.2.1	Stickoxid	20
3.2.2.2	<i>Reperfusion injury salvage kinase</i>	21
3.3.	Protein-Kinase C	21
3.4.	<i>Reactive oxygen spezies</i>	22
3.5.	ATP-abhängiger Kalium-Kanal	23
3.6.	Mitochondriale Permeabilitäts-Transitions-pore	23
3.7.	Aktiver und passiver Anteil der Postkonditionierung	24

3.8.	Pharmakologische Postkonditionierung.....	25
3.9.	Klinische Bedeutung der Postkonditionierung.....	25
4.	Die hyperbare Sauerstofftherapie.....	26
5.	Die Perfluorocarbone.....	26
5.1.	Chemische und physikalische Eigenschaften der Perfluorocarbone.....	27
5.2.	Medizinischer Einsatz der Perfluorocarbone	28
5.3.	Perfluorocarbone beim myokardialen Reperfusionsschaden	29
II.	GEGENSTAND DER ARBEIT	31
III.	MATERIAL UND METHODEN	32
1.	Material	32
1.1.	Zellen.....	32
1.2.	Zellkulturmedien	32
1.3.	Chemikalien	32
1.4.	Kits	34
1.5.	Geräte und Zubehör.....	34
1.6.	Gase.....	37
1.7.	Software	37
2.	Methoden.....	37
2.1.	Zellkultur	37
2.2.	Hypoxie und Reoxygenierung.....	38
2.3.	pH-Messung	39
2.4.	Mitochondrien-Extraktion und Calcium-Retentions-Kapazität-Messung .	40
2.4.1.	Mitochondrien-Extraktion.....	40
2.4.2.	Mitochondrialer <i>Bradford Assay</i>	40
2.4.3.	Calcium-Retentions-Kapazität	41
2.4.4.	Calcium-Retentions-Kapazität im Rahmen der Vorversuche	43
2.5.	RNA-Extraktion, cDNA-Synthese, PCR	43
2.5.1.	RNA-Extraktion	43
2.5.1.1	Phasentrennung	44
2.5.1.2	RNA-Präzipitation.....	44
2.5.1.3	Waschschritt	44
2.5.2.	DNA-Verdau	44
2.5.3.	cDNA-Synthese.....	45

2.5.4.	<i>Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction</i>	45
2.5.5.	Agarosegelelektrophorese	46
IV.	ERGEBNISSE	48
1.	Hyperoxische Reoxygenierung von Kardiomyozyten	48
1.1.	Reduktion des pH-Wert des Zellmediums nach hyperoxischer Reoxygenierung	48
1.2.	Verminderte Expression der normoxischen COX4-1 Untereinheit der Cytochrom C Oxidase nach hyperoxischer Reoxygenierung	49
1.3.	Regulation der ischämischen COX4-2 Untereinheit der Cytochrom C Oxidase nach hyperoxischer Reoxygenierung	50
1.4.	Vermehrte Expression von HIF 1 α nach hyperoxischer Reoxygenierung.	51
2.	Ischämische Reoxygenierung von Kardiomyozyten	52
2.1.	Reduktion des pH-Wert des Zellmediums nach CO ₂ -vermittelter ischämischer Reoxygenierung.....	52
2.2.	Regulation der normoxischen COX4-1 nach ischämischer Reoxygenierung	53
2.3.	Vermehrte Expression von COX4-2 nach ischämischer Reoxygenierung	54
2.4.	Verminderte Expression von HIF 1 α nach ischämischer Reoxygenierung	55
2.5.	Stabilisierung der mitochondrialen Permeabilitäts-Transitions-pore nach ischämischer Reoxygenierung.....	56
V.	DISKUSSION	58
1.	Konzentrationserhöhung der Atemgase Sauerstoff und Kohlenstoffdioxid als Therapiemöglichkeit beim Myokardinfarkt....	58
2.	Kardioprotektion durch Azidose	60
3.	Die Postkonditionierung als Therapiemöglichkeit	61
4.	Die Regulation der Untereinheiten der Cytochrom C Oxidase 4	64
5.	Die Rolle von HIF 1α und die Beeinflussung durch Postkonditionierung	66
6.	Stabilisierung der mitochondrialen Permeabilitäts-Transitions-pore durch ischämische Postkonditionierung	68

VI.	ZUSAMMENFASSUNG	71
VII.	SUMMARY.....	72
VIII.	ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS.....	73
IX.	LITERATURVERZEICHNIS.....	75
X.	DANKSAGUNG	105

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

[]	Konzentrationsangabe
°C	Grad Celsius
·OH	Hydroxylradikal
5-HD	5-Hydroxydecantoate
ADP	Adenosindiphosphat
AKT	Proteinkinase B
AMI	<i>acute myocardial infarction</i>
AMV	Avian myoblastosis virus
ATP	Adenosintriphosphat
BAD	<i>Bcl-2-Antagonist of Cell Death</i>
Bcl-2	B-Zell-Lymphom 2
bp	Basenpaare
BSA	<i>Bovines Serum Albumin</i>
BSS	<i>buffered Balanced Salt Solution</i>
Ca	Calcium
CaCl ₂	Calciumchlorid
cDNA	<i>complementary DNA</i>
cGMP	cyclisches Guanylmonophosphat
CK	Creatinin-Kinase
CO ₂	Kohlenstoffdioxid, hier auch mit CO ₂ reoxygenierte Proben
COPD	<i>chronic obstructiv pulmonary disease</i>
COX	Cytochrom C Oxidase
CRC	<i>Calcium Retention Capacity</i>

Da, kDa	Dalton, 1000 Dalton
DEPC	Diethylpyrocarbonate
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DMOG	Dimethyloxallyl Glycine = N-(methoxyoxoacetyl)-glycine methyl ester
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure = Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglykoltetraacetat
eNOS	endotheliale Stickoxidsynthase
ERK	<i>extracellular signal regulated kinase</i>
Fe	Eisen
g	Erdbeschleunigung oder Gramm
G-Protein	Guaninnukleotid-bindendes Protein
h	Stunde
H ⁺	Proton
HBO	<i>hyperbaric oxygenation</i>
HCM	<i>Human cardiac myocytes</i>
HEP	<i>high energy phosphate</i>
Hepes	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HIF 1 α	<i>Hypoxia inducible factor 1α</i>
i.v.	intravenös
K	Kalium
K _{ATP} -Kanal	ATP-abhängiger Kaliumkanal
kb	kilobase = 1000 bp
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat

LAD	<i>left anterior descending</i>
LC	Light Cyclers
L-NAME	N ^G -Nitro-L-Arginin-Methylester
M	Molare Masse
MAC	<i>membrane attack complex</i>
MEK	<i>mitogen activated protein/extracellular signal regulated kinase</i>
Mg	Magnesium
min	Minuten
ml, µl	Milli-, Mikroliter
mmHg	Druckeinheit, 1mmHg = Druck, den 1 mm Quecksilbersäule anhebt
mol	Stoffmenge, mol = $6,02214129 \times 10^{23}$ Teilchen
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
MPG	N-2-mercaptopropionyl glycine
mPTP	<i>mitochondrial permeability transitions pore</i>
MW	<i>molecular weight</i>
N	Normoxisch reoxygenierte Proben
Na ⁺	Natrium
NADH	Nicotinamid-adenin-dinukleotid
NADPH	Nicotinamid-adenin-dinukleotid-phosphat
NHE-1	<i>Na⁺/H⁺ exchange type 1</i>
NIM811	N-methyl-4-isoleucine cyclosporin
NO	Stickoxid
NOS	<i>nitric oxid synthase</i> = Stickoxidsynthase
O ₂	Sauerstoff, hier auch mit O ₂ reoxygenierte Proben

ODQ	1H-[1,2,4]oxadiazolo-[4,3-a]quinoxaline-I-one
p70S6K	Serin/Threonin Kinase
PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PD-98059	MEK-Inhibitor
PFC	Perfluorocarbone
pH	<i>potentia Hydrogenii</i>
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PKB	Proteinkinase B
PKC	Proteinkinase C
PKG	Proteinkinase G
PMN	<i>polymorphonuclear leukocytes</i>
PTCA	perkutane transluminale coronare Angioplastie
qRT-PCR	Quantitative <i>Realtime</i> Polymerasekettenreaktion
RISK	<i>reperfusion injury salvage kinase</i>
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
SOD	Superoxiddismutase
STAT3	<i>signal transducer and activator of transcription 3</i>
STEMI	<i>ST-elevation myocardial infarction</i>
SYBR Green I	2-{2-[(3-Dimethylamino-propyl)-propylamino]-1-phenyl-1H-chinolin-4-ylidenmethyl}-3-methylbenzothiazol-3-ium-Kation
TAE	<i>Tris, acetic acid, EDTA</i>

TNS	<i>Trypsin Neutralizing Solution</i>
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	ultraviolett
V	Volt
W	Watt
ZM241385	A _{2A} -Rezeptorantagonist

I. EINLEITUNG

1. Das ischämische Myokard

In einem Hundeherz führt der Verschluss eines Hauptastes der Koronararterie innerhalb kürzester Zeit zu physiologischen und metabolischen Veränderungen. Diese Veränderungen umfassen unter anderem die Umstellung von aeroben auf anaeroben Stoffwechsel, eine Absenkung des pH-Wertes, die Freisetzung von Botenstoffen und Verschiebungen in der Ionen-Homöostase.

Die Umstellung von aerobem beziehungsweise mitochondrialem Stoffwechsel auf anaerobe Glykolyse erfolgt bereits nach nur acht Sekunden verminderten arteriellen Blutflusses (Jennings *et al.*, 1963; Jennings *et al.*, 1990). Unter ischämischen Bedingungen kann der Energiebedarf der Myozyten nicht durch die durch Glykolyse bereitgestellte Energie und die aus den *high energy phosphate* (HEP) Speichern gedeckt werden. So wird Creatin-Phosphat innerhalb der ersten 1-3 Minuten der Ischämie aufgebraucht (Jennings *et al.*, 1985 a). Die ATP-Vorräte hingegen nehmen deutlich langsamer ab, so sind am Ende der reversiblen Phase der Ischämie 75-80% des ursprünglich vorhandenen ATPs verbraucht (Jennings *et al.*, 1985 a).

Die Neusynthese der HEP erfolgt anaerob (Jennings *et al.*, 1981), dadurch wird vermehrt Laktat gebildet und als Folge dessen sinkt der intrazelluläre pH innerhalb der ersten 10 Minuten der Ischämie auf 6,0 bis 5,8 ab (Fleet *et al.*, 1985).

Die Produkte des anaeroben Stoffwechsels häufen sich an (Jennings *et al.*, 1986; Jennings *et al.*, 1990). ATP wird durch ATPasen zu ADP degradiert. Da die Rephosphorylierung von ADP aufgrund der Azidose und der Anhäufung von Laktat verlangsamt ist (Rovetto *et al.*, 1975), sammelt sich ADP an. Durch die Aktivität der Adenylatkinase entsteht AMP, das sich intrazellulär akkumuliert und zu Adenosin abgebaut wird. Adenosin wiederum diffundiert nach extrazellulär und wird dort zu Inosin und Hypoxanthin abgebaut. Diese Vorgänge haben eine deutliche Verkleinerung des Adenosinnukleotidpools zur Folge. Am Ende der reversiblen Phase der Ischämie sind nur noch 30-40% der ursprünglichen Adenosinnukleotide vorhanden (Jennings *et al.*, 1985 b).

Parallel zu den metabolischen Veränderungen werden verschiedene Substanzen freigesetzt, die als Botenstoffe agieren können. Zu diesen Substanzen zählen zum Beispiel Bradykinin (Martorana *et al.*, 1990; Noda *et al.*, 1993; Wall *et al.*, 1994 a), Opioide (Schultz *et al.*, 1995), Norepinephrin (Schömig, 1990) und Angiotensin (Martorana *et al.*, 1990).

Steenbergen *et al.* (1987) zeigten *in vitro* an isoliert perfundierten Rattenherzen einen leichten Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration in der späten reversiblen Phase der Ischämie.

2. Der Reperfusionsschaden

Die möglichst schnelle Wiederherstellung der Durchblutung in einem ischämischen Gewebe ist notwendig um die fortschreitende Gewebeerstörung aufzuhalten. Die Reperfusion selbst kann jedoch zu einer weiteren Schädigung des Gewebes, zu dem sogenannten Reperfusionsschaden, führen (Follette *et al.*, 1981; Braunwald *et al.*, 1985; Verma *et al.*, 2002). Diesen Schaden möglichst gering zu halten ist entscheidend für die Vitalität des reperfundierten Gewebes (Sobel *et al.*, 1972).

In experimentellen Studien an Hunden überlebten die Myozyten den Verschluss der proximalen Koronararterie für eine Dauer von 15 Minuten, bei längerer Ischämiedauer wurden die Myozyten irreversibel geschädigt (Kloner *et al.*, 1974). Dabei korreliert die Schwere des Reperfusionsschadens proportional mit der Länge der vorausgegangenen Ischämiephase (Bolli *et al.*, 1999).

2.1. Folgen der Reperfusion

2.1.1. Bildung reaktiver Sauerstoffspezies

Ganz zu Beginn der Reperfusion werden von aktivierten Neutrophilen, gestressten Kardiomyozyten, aktiviertem Gefäßendothel und zu einem geringen Anteil auch vom perivaskulären Gewebe reaktive Sauerstoffspezies (ROS) freigesetzt (Ambrosio *et al.*, 1991; Kevin *et al.*, 2003). Innerhalb von 4-7 Minuten nach Reperfusionbeginn erreicht die ROS-Freisetzung einen Höhepunkt (Bolli *et al.*, 1988).

Die ROS werden von verschiedenen Enzymsystemen gebildet. Neutrophile bilden ROS vor allem über das NADPH-Oxidase-System. In Gefäßendothelzellen

werden ROS vom endothelialen NAD(P)H-Oxidase-System, von der Xanthin-Oxidase und unter bestimmten Bedingungen auch von eNOS gebildet.

2.1.2. Zellödem

Die Akkumulation der Produkte des anaeroben Stoffwechsels führt zu einem erhöhten transsarkolemmalen osmotischen Gradienten (Jennings *et al.*, 1986). Zeitgleich kommt es zur intrazellulären Wasser- und Zellvolumen-Dysregulation (Steenbergen *et al.*, 1985) und als Folge des Mikrogefäßverschluss zur Wasseransammlung. Zudem wird als Folge der Lipidperoxidation, unter anderem durch ROS, das Komplementsystem und den Membranangriffskomplex, die Sarkolemm-Membran verletzlicher (Lucchesi, 1994). Schließlich führen der Anstieg des osmotischen Gradienten und die beeinträchtigte Wasserregulation zu einer Ruptur des Sarkolemm mit anschließender explosiver Zellschwellung.

2.1.3. Aktivität des Natrium-Wasserstoff-Austauschers

Die Umstellung auf anaeroben Stoffwechsel und die Erschöpfung der ATP-Speicher mit darauffolgender Abschwächung der energieabhängigen $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase führt dazu, dass sich Protonen während der Ischämie intrazellulär ansammeln. Dies hat Änderungen in der Ionenhomöostase zur Folge und führt zur Aktivierung beziehungsweise Umkehr der Ionentransportmechanismen. Durch diese Protonenakkumulation wird der $\text{Na}^+\text{-H}^+$ -Austauschers Typ 1 (NHE-1) aktiviert, der Protonen im Austausch zu Na^+ aus der Zelle befördert. Dies führt zu einer Netto-Akkumulation von intrazellulärem Na^+ . Die Zelle versucht dem Na^+ -Überschuss mit einer Umkehr des $\text{Na}^+\text{/Ca}^{2+}$ -Austauschers gegenzusteuern, dies ermöglicht den Einstrom von Ca^{2+} im Austausch zum Na^+ -Austrom. Folglich sammelt sich Ca^{2+} intrazellulär an.

Ob NHE-1 während der Ischämie oder auch während der Reperfusion aktiv ist, ist noch fraglich. Es führt sowohl die Gabe von NHE-1-Inhibitoren kurz vor der Ischämie (Gumina *et al.*, 2000; Klein *et al.*, 2000; Gross *et al.*, 2001), als auch die Gabe während der Reperfusion zu einer Reduktion der Infarktgröße (Hurtado *et al.*, 2001). Die Ergebnisse von Allen *et al.* (2003) zeigen, dass NHE-1 während der frühen Reperfusion aktiviert wird.

2.1.4. Calcium-Überschuss induzierte Kontraktur des Myokards

Der intrazelluläre Calciumüberschuss der Myozyten während der Ischämie ist ein Grund für die Hyperkontraktibilität. Die schnelle Energieauffüllung während der Reperfusion unterhält die Kontraktur und führt letztlich zum Zelltod. Es konnte ein Zusammenhang zwischen der Myokardkontraktur während der frühen Reperfusion und der Pathogenese der Nekrose gezeigt werden (Piper, 1989; Garcia-Dorado *et al.*, 1997; Piper *et al.*, 1998; Piper *et al.*, 1999). Die stärkste Ausprägung wird als *stone heart* (Cooley *et al.*, 1972) bezeichnet.

2.1.5. Lokale Entzündung

Zu Beginn der Reperfusion führen Wechselwirkungen zwischen Neutrophilen und dem Endothel zu einer lokalen Entzündungskaskade, die eine endotheliale Dysfunktion, Nekrose und vielleicht auch Apoptose zur Folge hat (Lefer *et al.*, 1991; Davenpeck *et al.*, 1994; Lefer *et al.*, 1994; Vinten-Johansen *et al.*, 2004). Endothelzellen und Kardiomyozyten produzieren Neutrophilen-abhängig und Neutrophilen-unabhängig Oxidantien (Duilio *et al.*, 2001), die zur Nekrose führen.

2.1.6. Öffnung der mitochondrialen Permeabilitäts-Transitionspore

Physiologischerweise ist die innere Mitochondrienmembran bis auf einige, wenige Metaboliten und Ionen impermeabel und die mitochondriale Permeabilitäts-Transitions-pore (mPTP) ist geschlossen.

Öffnet sich die mPTP, lässt sie alle Moleküle <1500 Da passieren (Crompton, 1999; Halestrap, 1999; Halestrap *et al.*, 2002), die Permeabilitätsbarriere der inneren Mitochondrienmembran ist gestört. Alle gelösten Stoffe (<1500 Da) können nun die innere Mitochondrienmembran überqueren. Proteine sind nicht in der Lage die mPTP zu passieren, dies hat einen Anstieg des kolloidal osmotischen Druckes zur Folge und die Mitochondrien schwellen an. Die innere Membran kann durch die Cristae erstaunliche Volumenzunahmen aushalten, die äußere Membran hingegen hat keine Möglichkeit diese Volumenzunahme auszugleichen. Wenn die äußere Mitochondrienmembran zerreißt, werden pro-apoptotische Faktoren wie zum Beispiel Cytochrom-C freigesetzt. Die innere Membran wird für Protonen frei permeabel, der Protonengradient, der für die oxidative Phosphorylierung notwendig ist, besteht nicht mehr. Dadurch kommt es zur Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung und die H⁺-ATPase ändert die

Richtung. Die H^+ -ATPase hydrolysiert nun ATP anstatt es zu synthetisieren. Als Folge der rasch abnehmenden ATP-Konzentration kommt es zum einen zu Störungen in der Homöostase der Ionen und Metaboliten und zum anderen zu einer Aktivierung abbauender Enzyme wie Phospholipasen, Nukleasen und Proteasen.

Solange die mPTP geöffnet ist, schreiten die Veränderungen fort und verursachen einen irreversiblen Zellschaden, der letztendlich zur Nekrose führt. Selbst wenn sich die Pore schließen sollte, sind die Schäden durch die Mitochondrienschwellung und die Beschädigung der äußeren Mitochondrienmembran ausreichend um die Apoptose-Kaskade in Gang zu setzen. Das Öffnen der mPTP ist also sowohl mit der Pathogenese der Nekrose als auch der Pathogenese der Apoptose verbunden und ist vielleicht einer der Schlüsselfaktoren im Übergang vom reversiblen zum irreversiblen Zelltod (Halestrap *et al.*, 1998; Crompton *et al.*, 1999).

Als einer der Hauptfaktoren für die mPTP-Öffnung wird mitochondrialer Calcium-Überschuss angesehen, vor allem wenn er gleichzeitig mit oxidativen Stress, Adeninnukleotid-Verarmung, Phosphatkonzentrationssteigerung und mitochondrialer Depolarisation auftritt (Halestrap *et al.*, 1998; Crompton *et al.*, 1999).

Während der Reperfusion werden Schritt um Schritt genau die Bedingungen geschaffen, die die Öffnung der mPTP begünstigen (Abb. 1):

Der Sauerstoffmangel der Ischämie hat durch die gesteigerte Glykolyse einen Teufelskreis zur Folge: durch die vermehrte Laktatbildung sinkt der pH-Wert, der niedrige pH-Wert wiederum behindert den glykolytischen Fluss und damit die ATP-Synthese (Piper *et al.*, 1998; Piper *et al.*, 2003; Piper *et al.*, 2004).

Um den ursprünglichen pH-Wert wiederherzustellen wird der Na^+/H^+ -Antiporter aktiviert. Das intrazelluläre Natrium steigt an, da aufgrund des ATP-Mangels die Na/K -ATPase inhibiert ist. Dem versucht die Zelle mit einer Umkehr des Na^{2+}/Ca^{2+} -Antiporter gegenzusteuern. Neben dem Anstieg des intrazellulären Natriums, gibt es nun auch noch einen Anstieg des intrazellulären Calciums. Die Folge sind Myokardkontrakturen (Silverman *et al.*, 1994).

Durch die Umkehr der H^+ -ATPase wird weiterhin ATP abgebaut. In Folge dessen fällt die Adeninnukleotid-Konzentration ab und die des Phosphats steigt, beides Vorgänge, die die Sensitivität der mPTP gegenüber $[Ca^{2+}]$ steigert. Der niedrige pH-Wert inhibiert jedoch noch die Öffnung der mPTP.

Während der Reperfusion sind die Mitochondrien wieder in der Lage einen Protonengradienten aufzubauen und damit ATP zu synthetisieren, dies ermöglicht jedoch auch eine schnelle Calcium-Akkumulation in den Mitochondrien, die zum Calcium-Überschuss führt (Silverman *et al.*, 1994). Zusätzlich kommt es zur Bildung von ROS.

Der niedrige pH-Wert ist zu diesem Zeitpunkt der einzige Inhibitor für die Öffnung der mPTP. Jedoch normalisiert sich der pH-Wert innerhalb der ersten Minuten der Reperfusion, damit sind alle Beschränkungen der mPTP-Öffnung beseitigt und die mPTP öffnet sich zu diesem Zeitpunkt (Griffith *et al.*, 1995; Qian *et al.*, 1997). Diesen Vitalitätsverlust der Kardiomyozyten als Folge der pH-Wert Normalisierung, beschrieben Lemasters *et al.* (1996) als pH-Paradox.

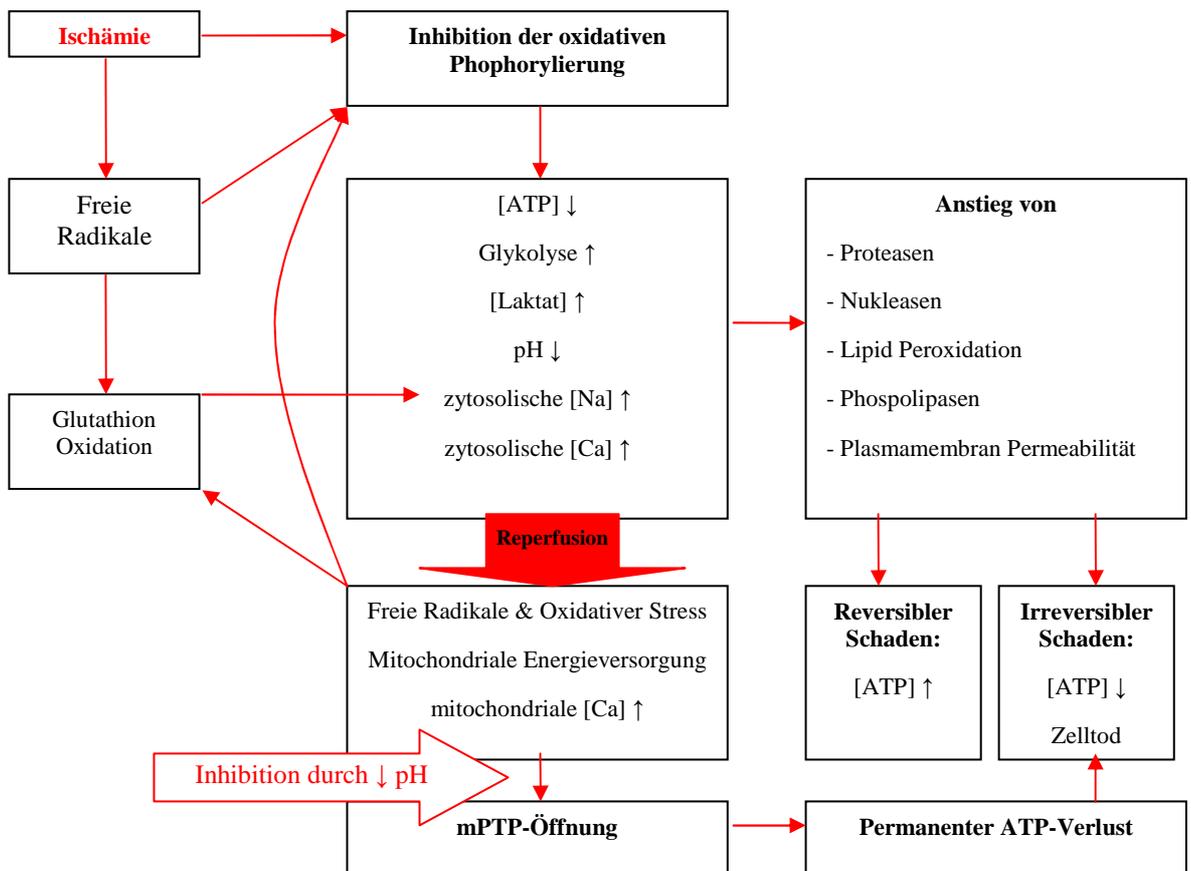


Abb. 1: Bedingungen, die zur Öffnung der mPTP unter Reperfusion führen (nach Halestrap *et al.*, 2004) Während der Ischämie werden nach und nach alle Bedingungen geschaffen, die die Öffnung der mPTP begünstigen. Die einzige Inhibition bildet der niedrige pH-Wert. Normalisiert sich dieser während der frühen Reperfusion, öffnet sich die Pore.

2.1.7. Regulation des *Hypoxia-inducible factor 1*

Der *Hypoxia-inducible factor 1* (HIF 1) ist entscheidend bei der Regulation der Transkription als Antwort auf ein hypoxisches Geschehen beteiligt (Semenza, 2001; Schumacker, 2005).

HIF 1 ist ein heterodimeres Protein, das aus verschiedenen Untereinheiten, HIF 1 α , HIF 2 α und HIF 1 β , besteht. HIF 1 ist ein wichtiger Bestandteil zum Erhalt der Sauerstoffhomöostase (Semenza, 2004). Die Expression der HIF 1 α - und HIF 2 α -Untereinheiten wird durch die zelluläre Sauerstoffkonzentration reguliert, wohingegen die HIF 1 β -Untereinheit konstitutiv, also unabhängig vom Sauerstoffangebot exprimiert wird. HIF 1 α wird eine entscheidende Rolle bei der HIF 1-Aktivität zugesprochen (Wang *et al.*, 1995). Unter aeroben Bedingungen werden sowohl HIF 1 α als auch HIF 2 α durch Prolylhydroxylierung schnell degradiert (Ivan *et al.*, 2001; Jaakkola *et al.*, 2001; Yu *et al.*, 2001). Die Hydroxylierung ermöglicht die Bindung des von Hippel-Lindau (VHL) Proteins (Maxwell *et al.*, 1999), dies führt zur Ubiquitinierung und zum proteasomalen Abbau von HIF 1 α und HIF 2 α (Salceda *et al.*, 1997). Unter hypoxischen Bedingungen nimmt die Hydroxylierung und damit der Abbau von HIF 1 α ab, HIF 1 α wird stabilisiert. Diese Stabilisierung der HIF 1 α -Untereinheit führt zu einer Akkumulation von HIF 1 α im Nucleus (Salceda *et al.*, 1997), was wiederum die Transkription verschiedener Gene in den Gang setzt, die Zellprotektion triggert und metabolische Veränderungen zur Folge hat (Date *et al.*, 2005). Lee *et al.* (2000) konnten an menschlichen Biopaten des linken Ventrikels mittels PCR nachweisen, dass der Anstieg von HIF 1 α einer der ersten adaptiven Antworten des menschlichen Ventrikels auf Ischämie ist. Es ist bereits bekannt, dass HIF 1 bei der Präkonditionierung eine zentrale Rolle einnimmt (Eckle *et al.*, 2008). Dies lässt vermuten, dass sowohl der Anstieg der Expression von HIF 1, als auch ein Aktivitätsanstieg zur Kardioprotektion beiträgt.

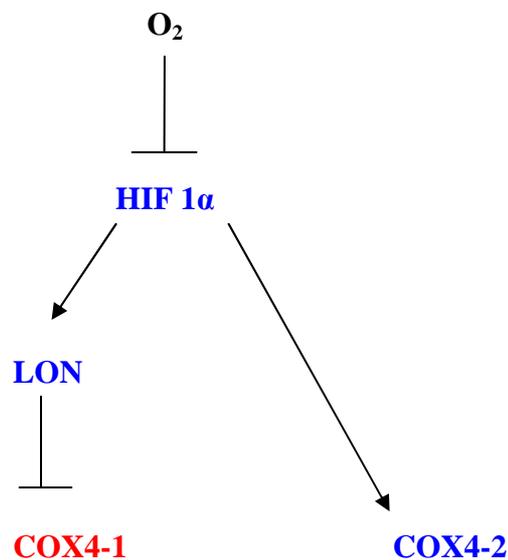
2.1.8. Regulation der Untereinheiten der Cytochrom C Oxidase

Der Komplex IV der Atmungskette, die Cytochrom C Oxidase, setzt sich aus 13 Untereinheiten (= COX) zusammen. Eine Regulationsmöglichkeit der Atmungskette besteht durch die Modifikation dieser Untereinheiten.

Zuerst konnte an Zellen der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* nachgewiesen werden, dass Sauerstoff die Expression einer COX-Untereinheit beeinflusst. Die

COX5 der Hefe mit ihren Untereinheiten COX5a und COX5b entspricht der COX4 der Säugetiere mit den Isoformen COX4-1 und COX4-2 (Burke *et al.*, 1998). Bei ausreichender Sauerstoffversorgung ist die Expression von COX5a vermehrt, die von COX5b hingegen unterdrückt. Unter Sauerstoffmangel ändert sich das Expressionsverhalten: COX5a wird weniger transkribiert und die Repression der COX5b wird aufgehoben (Lowry *et al.*, 1984; Forsburg *et al.*, 1989; Kwast *et al.*, 1998). Die vermehrte Expression von COX5b wird mit einer schnelleren Elektronentransferrate und einer damit verbundenen höheren Effizienz der Cytochrom C Oxidase und der gesamten Atmungskette in Verbindung gebracht (Waterland *et al.*, 1991; Allen *et al.*, 1995).

Fukuda *et al.* (2007) konnten an verschiedenen murinen und humanen Zellen nachweisen, dass die Expression der COX4-1 und COX4-2 sauerstoffabhängig reguliert ist. Unter aeroben Bedingungen ist COX4-1 die vorherrschende Isoform. Unter Sauerstoffmangel kommt es über eine Stabilisierung von HIF 1 α zur Aktivierung von COX4-2 und LON (Fukuda *et al.*, 2007; Abb. 2). LON ist eine Protease, die COX4-1 abbaut. Diesen Ergebnissen zur Folge ist die Verfügbarkeit von Sauerstoff für den Isoformen-*switch* entscheidend.



⇒ **Optimale Effizienz der mitochondrialen Atmung unter **aeroben** und **hypoxischen** Bedingungen.**

Abb. 2: Sauerstoffabhängige Regulation der COX-Untereinheiten nach Fukuda *et al.*, 2007. Unter Hypoxie wird in Säugetierzellen die Regulation der COX-Untereinheiten über HIF 1 α gesteuert. Es kommt zur vermehrten Expression der energieeffizienteren COX4-2. Die vermehrte Expression von LON führt zur Degradierung der COX4-1.

An ischämischen, hyperoxisch reoxygenierten humanen Kardiomyozyten konnten Arab *et al.* (2008; 2010) eine Stabilisierung von HIF 1 α und eine verminderte COX4-Expression bestätigen.

Wu *et al.* (2009) wiesen in einem Affenmodell nach, dass auch andere COX-Untereinheiten unter Ischämie reguliert werden. Sie zeigten, dass nach einem Myokardinfarkt die Expression von COX-1 um das dreifache abnimmt, die von COX-2 unverändert bleibt und die von COX-3 um das fünffache zunimmt.

2.1.9. Vorgänge zu Beginn der Reperfusion

Die oben genannten Vorgänge, die während den ersten Minuten der Reperfusion ablaufen, können später ablaufende Prozesse, wie erhöhte Kapillarpermeabilität, *no-reflow*, Nekrose und Apoptose, auslösen. Es sind nicht einzelne, voneinander unabhängige Vorgänge, sondern in ihrer Gesamtheit bilden sie die Ausgangslage zum Reperfusionsschaden. Um einen derart komplexen Vorgang wie die Reperfusion therapeutisch zu erreichen, ist ein breites Spektrum an Interventionen nötig (Vinten-Johansen, 2004). Je früher die obigen Ereignisse im Ablauf des Reperfusionsschadens auftreten, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit, dass man dort therapeutisch eingreifen kann. Piper (2004) sagte, dass man das zu erst behandeln müsse, was zu erst kommt, sonst sei die Möglichkeit für eine spezifische Behandlung verstrichen.

2.2. Komponenten des Reperfusionsschaden

Der Reperfusionsschaden ist das Ergebnis vieler unabhängiger Prozesse, die zu Beginn der Reperfusion ablaufen. Zu diesen Prozessen gehört die Bildung von freien Sauerstoffradikalen, ein Calcium-Überschuss, Veränderungen im Myokardstoffwechsel, endotheliale, mikrovaskuläre Dysfunktion und die Aktivierung von Thrombozyten, Leukozyten und Komplement. Eine Manifestation des Reperfusionsschadens ist als *stunned* Myokard, mikrovaskuläre Dysfunktion und/oder als letaler Reperfusionsschaden möglich (Abb. 3; Verma *et al.*, 2002).

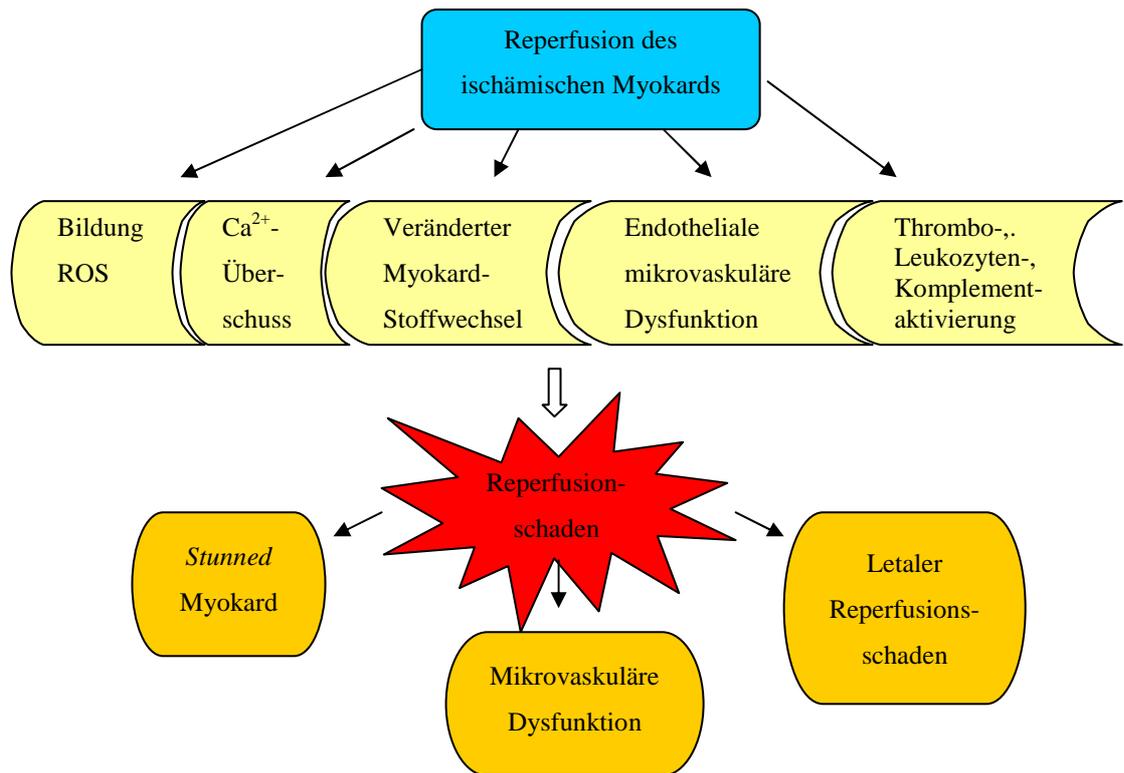


Abb. 3: Mechanismen und Mediatoren des Reperfusionsschaden nach Verma *et al.*, 2002. Der Reperfusionsschaden ist das Ergebnis vieler unabhängiger Prozesse, die die Bildung von freien Sauerstoffradikalen, einen Calcium-Überschuss, Veränderungen im Myokardstoffwechsel, endotheliale, mikrovaskuläre Dysfunktion und Aktivierung von Thrombozyten, Leukozyten und Komplement umfasst. Der Reperfusionsschaden kann sich als *stunned* Myokard, mikrovaskuläre Dysfunktion und/oder als letaler Reperfusionsschaden manifestieren.

2.2.1. Mikrovaskuläre Dysfunktion

In den Arteriolen, Kapillaren und Venolen kommt es zum Funktionsverlust der Endothelzellen. Diese mikrovaskuläre Dysfunktion schließt eine verminderte Fähigkeit zur Vasodilatation, eine Vasokonstriktion, eine gesteigerte Flüssigkeits- und Proteininfiltration in die Venolen und eine gesteigerte Thrombo- und Leukozytenaktivität und eine gesteigerte Oxidantienproduktion ein. Als Folge kommt es zu einer verminderten Perfusion, die als *no-reflow* bezeichnet wird (Agati, 1999; Granger, 1999; Park *et al.*, 1999; Carden *et al.*, 2000).

2.2.2. Letaler Reperfusionsschaden

Der letale Reperfusionsschaden ist die irreversible Form und stärkste Ausprägung des Reperfusionsschadens (Verma *et al.*, 2002). Er kommt in Arealen vor, die unter Reperfusion in Nekrose und Apoptose gehen, paradoxerweise aber auch in reversibel geschädigten Zellen.

Die Existenz des letalen Reperfusionsschaden ist jedoch nicht unumstritten. Unter anderem hängt dies mit der Schwierigkeit den Verlauf des Zelluntergangs von Ischämie zu Reperfusion zu beurteilen zusammen. Ein Hinweis auf das Vorhandensein dieses Phänomens ist, dass man während der Reperfusion durch kardioprotektive Mechanismen Einfluss auf das Ausmaß der Infarktgröße nehmen kann (Piper *et al.*, 1998; Yellon *et al.*, 1999).

2.2.3. *Stunned myocardium*

Die Tatsache, dass reversibel geschädigtes Myokard nach Ischämie und erfolgter Reperfusion nicht kontrahiert, wurde von Heyndrickx *et al.* (1975) beschrieben. Braunwald und Kloner (1982) führten dafür den Begriff *stunned myocardium*, das betäubte Myokard ein und beschrieben es als „verlängerte, postischämische Dysfunktion des lebensfähigen Gewebes nach Reperfusion“.

Bis die Funktion des postischämischen, lebensfähigen Gewebes wieder vollständig hergestellt ist, können Stunden bis Tage vergehen. Die Dauer, die das Gewebe benötigt, bis die Funktionen wiederhergestellt sind, sind von verschiedenen Parametern abhängig. Dazu gehören die Dauer und das Ausmaß der Ischämie, sowie die Adäquatheit des wiederhergestellten arteriellen Blutflusses (Kloner *et al.*, 1983).

Die Mechanismen des *myocardial stunnings* wurden in verschiedenen Tiermodellen untersucht. In der Regel wurde mit Ischämiedauern von ≤ 15 Minuten gearbeitet (Triana *et al.*, 1991), da bei dieser Dauer davon ausgegangen wird, dass das Gewebe nur reversibel geschädigt und frei von Nekrose ist.

Zunächst war umstritten, ob das *stunning* ein protektiver Mechanismus ist und ob sich die Verhinderung negativ auf die langfristige Erholung auswirkt. Wäre dies der Fall, müsste ein durch positiv inotrope Substanzen zur Kontraktur gebrachtes *stunned* Myokardium (Ellis *et al.*, 1984; Arnold *et al.*, 1985; Becker *et al.*, 1986; Ito *et al.*, 1987; Patel *et al.*, 1988; Ambrosio *et al.*, 1989; Kloner *et al.*, 1989) sich schlechter erholen als ein unbehandeltes. Darüber hinaus müsste eine Nachahmung des *stunnings* durch negativ inotrope Substanzen zur schnelleren Erholung beitragen. Es konnte zum einen gezeigt werden, dass die Erholung nach der Entfernung des inotropen Stimulans gleich fortschreitet wie bei einem unbehandelten Myokard (Arnold *et al.*, 1985) und zum anderen widerlegt werden, dass das durch Betablocker nachgeahmte *stunning* ein protektiver Effekt ist.

Als ursächlich für die Entstehung des *stunnings* werden zum einen die massive Bildung und Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und zum anderen der Überschuss an Calcium diskutiert.

Die Hypothese der ROS unterstützend, konnten Bolli *et al.* (1985 a) zeigen, dass die Hälfte bis dreiviertel des *stunning* Effekts auf einem Anstieg der freien Sauerstoffradikale während der ersten Minuten der Reperfusion beruht. Durch die intravenöse Gabe von enzymatischen Radikalfängern konnte der Effekt des *stunnings* reduziert werden (Myers *et al.*, 1985; Gross *et al.*, 1986; Przylenk *et al.*, 1986; Bolli *et al.*, 1989 a; Jeroudi *et al.*, 1990; Murry *et al.*, 1991). Weiter minimieren werden ließ sich der Effekt durch die Gabe des Radikalfängers N-2-mercaptopropionyl Glycine (MPG) (Bolli *et al.*, 1988). Bis jetzt sind die genauen Mechanismen, die zur ROS vermittelten Fehlfunktion des Mykords führen unbekannt. Grundsätzlich sind die Sauerstoffradikale in der Lage alle zellulären Komponenten anzugreifen. Als mögliche Reaktionspartner könnten vor allem Proteine und Lipide dienen. Dies hätte die Denaturierung der Proteine und deren Funktionsverlust beziehungsweise die Peroxidation der mehrfach ungesättigten Fettsäuren und damit den Verlust der selektiven Membranpermeabilität zur Folge (Bolli *et al.*, 1999). Obwohl freie Sauerstoffradikale eine Rolle in dem Mechanismus des *stunnings* spielen und Radikalfänger im Tiermodell mit kurzer Ischämie die Wiederherstellung der Kontraktilität verbessern, ist der durchschlagende Erfolg in Studien des menschlichen Herzinfarkts ausgeblieben. Rekombinante Superoxiddismutase wurde ohne Ergebnis im Vergleich zum Placebo bei Herzinfarktpatienten untersucht, die einer Reperfusion unterzogen wurden (Flaherty *et al.*, 1994), es hatte lediglich in der frühen Phase der Reperfusion einen leicht arrhythmogenen Effekt. In anderen Studien wurden Radikalfänger, wie Vitamin E, Langzeitpatienten mit koronarer Herzkrankheit beziehungsweise welchen mit Risikofaktoren für die koronare Herzkrankheit verabreicht, die Ergebnisse waren jedoch ähnlich enttäuschend (Yusuf *et al.*, 2000).

Der Hypothese des Calcium-Überschusses folgend, führt dieser zu einer Zerstörung der kontraktilen Strukturen. Durch Ca^{2+} werden calciumabhängige Proteasen wie Calpain I aktiviert, die den Kontraktilitätsapparat, vor allem Troponin I, schädigen. Zusätzlich führt die hohe Calciumkonzentration zu einer verminderten Sensitivität der Myofilamente gegenüber Calcium und zu einer

verminderten Kontraktionsfähigkeit (Bolli *et al.*, 1999; Kloner *et al.*, 2001; Verma *et al.*, 2002). Durch die veränderte Calciumhomöostase wird auch die Fähigkeit der Mitochondrien ATP zu synthetisieren und sich auf metabolischem Wege zu erholen, beeinträchtigt.

3. Die Postkonditionierung

Die Möglichkeit das Ausmaß des Myokardinfarkts durch vor- beziehungsweise nachgeschaltete Ischämie-Reperfusionen-Zyklen zu beeinflussen wird als Prä- beziehungsweise Postkonditionierung bezeichnet. Die initialen Versuche zur Postkonditionierung führten Zhao *et al.* (2003) an narkotisierten Hunden durch. Die ersten Versuche zur Präkonditionierung wurden bereits vor 25 Jahren von Murry *et al.* (1986), ebenfalls an Hunden, durchgeführt.

Die Postkonditionierung ist als eine Reihe von kurzen Unterbrechungen der Reperfusion ganz zu Beginn der Reperfusion definiert (Zhao *et al.*, 2003).

Bei den Untersuchungen von Zhao *et al.* (2003) an narkotisierten Hunden gab es drei Gruppen (Abb. 4): Eine Gruppe wurde präkonditioniert (5 Minuten LAD-Koronararterien-Verschluss, 10 Minuten Reperfusion, 1 Stunde LAD-Koronararterien-Verschluss, 3 Stunden Reperfusion), eine weitere Gruppe wurde postkonditioniert, das heißt zu Beginn der 3-stündigen Reperfusion wurde die Durchblutung dreimal für je 30 Sekunden unterbrochen, die letzte Gruppe war die Kontrolle, bei der auf die 1 Stunde LAD-Koronararterienverschluss direkt 3 Stunden Reperfusion folgten.

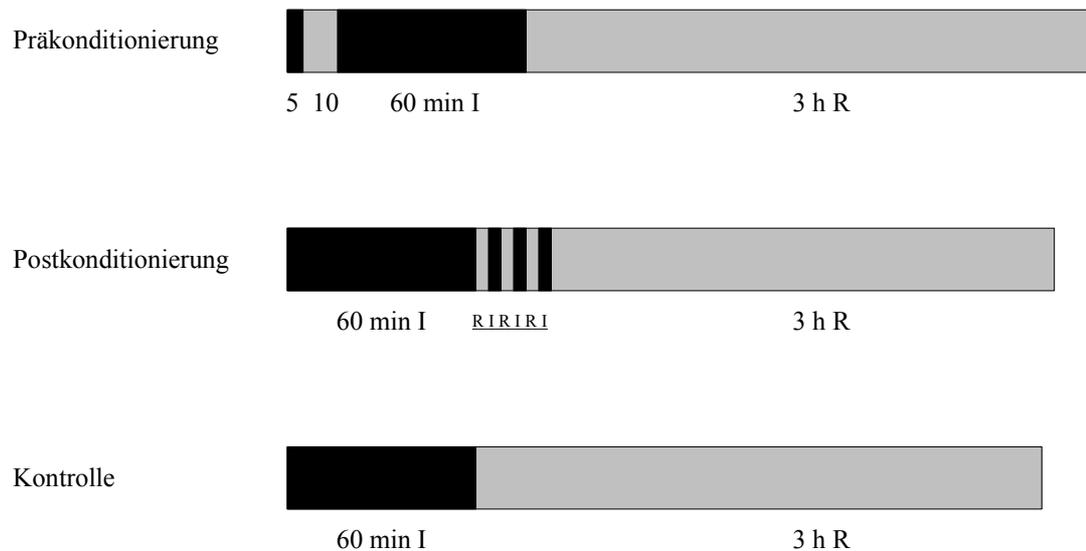


Abb. 4: Protokoll zur Prä- und Postkonditionierung nach Zhao *et al.*, 2003. Bei der Präkonditionierung erfolgten nach 5 min Ischämie 10 min Reperfusion, danach 1 h Ischämie, 3 h Reperfusion. Bei der Postkonditionierung folgten auf 3h Ischämie 3 Mal 30 s Reperfusion/Ischämie und anschließend 3h Reperfusion. Bei der Kontrolle folgte auf 1h Ischämie, 3h Reperfusion. I = Ischämie, R = Reperfusion

In den Gruppen mit prä- und postkonditionierten Hunden kam es zu folgenden, übereinstimmenden Ergebnissen (Zhao *et al.*, 2003):

1. Reduzierte Infarktgröße
2. Geringere Neutrophilenakkumulation
3. Verbesserte endotheliale Funktion
4. Weniger Gewebeödem
5. Geringere Bildung von Sauerstoffradikalen

Es konnte von weiteren Arbeitsgruppen bestätigt werden, dass die durch Postkonditionierung hervorgerufene Kardioprotektion ähnlich der durch Präkonditionierung ist (Halkos *et al.*, 2004, Tsang *et al.*, 2004). Durch eine Kombination von Prä- und Postkonditionierung lässt sich jedoch kein additiver, protektiver Effekt erzielen (Halkos *et al.*, 2004, Tsang *et al.*, 2004).

Der Effekt der Postkonditionierung wurde inzwischen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* im Tiermodell und in einer Studie an 30 Patienten (Staat *et al.*, 2005) nachgewiesen. Tabelle 1 gibt einen Überblick über die zur Postkonditionierung eingesetzten Tiermodelle und die damit erzielten protektiven Effekte aus den Jahren 2003-2007 (nach Yellon und Hausenloy, 2005).

Tab. 1: Ein Überblick über verschiedene Tiermodelle zur Postkonditionierung aus den Jahren 2003-2007 (nach Yellon und Hausenloy, 2005)

Studie	Tiermodell	Protektiver Effekt
Zhao <i>et al.</i> (2003)	<i>In vivo</i> Hunderherz	↓ Infarktgröße ↓ Neutrophilenakkumulation ↓ Oxidativer Streß ↑ Endotheliale Funktion
Kin <i>et al.</i> (2004 a)	<i>In vivo</i> Rattenherz	↓ Infarktgröße ↓ Neutrophilenakkumulation ↓ Oxidativer Streß Keine Protektion, wenn Postkonditionierung nach erster Minute der Reperfusion erfolgt.
Galagudza <i>et al.</i> (2004)	Isoliertes Rattenherz	↓ Kammerflimmern
Tsang <i>et al.</i> (2004)	Isolierte Rattenherzen	↓ Infarktgröße Kardioprotektion ist von der PI3K-AKT Phosphorylierung abhängig. <i>Downstream target</i> von AKT, eNOS und p70S6 Kinase sind aktiviert. Protektion von Prä- und Postkonditionierung ist nicht kumulativ.
Halkos <i>et al.</i> (2004)	<i>In vivo</i> Hundeherz	↓ Infarktgröße ↓ Oxidativer Streß ↓ Kammerflimmern Protektion von Prä- und Postkonditionierung ist nicht kumulativ.
Yang <i>et al.</i> (2004 a)	<i>In vivo</i> Kaninchenherz	↓ Infarktgröße Kardioprotektion wird durch ERK-, NOS- und mitochondrialem K _{ATP} -Kanal-Inhibitoren verhindert. Keine Kardioprotektion, wenn Postkonditionierung 10 min nach Beginn der Reperfusion beginnt. Protektion von Prä- und Postkonditionierung ist nicht kumulativ.
Yang <i>et al.</i> (2005)	Isoliertes Kaninchenherz	↓ Infarktgröße Kardioprotektion wird durch PI3K-AKT- und Guanylatcyclase-Inhibitoren und Adenosin-Rezeptor-Blockern verhindert.

Argaud <i>et al.</i> (2005 a)	<i>In vivo</i> Kaninchenherz	↓ Infarktgröße Inhibiert Calcium-induziertes Öffnen der mPTP.
Chiari <i>et al.</i> (2005)	<i>In vivo</i> Kaninchenherz	↓ Infarktgröße Kardioprotektion von PI3K-AKT abhängig. Isofluran induzierte Protektion und ischämische Postkonditionierung kumulativ.
Serviddio <i>et al.</i> (2005)	Isoliertes Rattenherz	↑ Funktion ↓ mitochondrialer oxidativer Streß
Sun <i>et al.</i> (2005)	Neonatale Rattenkardiomyozyten	↑ Zellviabilität ↓ oxidativer Streß ↓ Calcium-Akkumulation
Darling <i>et al.</i> (2005)	Isoliertes Kaninchenherz	↓ Infarktgröße Kardioprotektion über ERK1/2 und nicht über PI3K-AKT.
Kin <i>et al.</i> (2005 a)	Isoliertes Ratten/Mäuseherz	↓ Infarktgröße, abhängig von der verzögerten Auswaschung von Adenosin und der Aktivierung des Adenosinrezeptors A2a und A3, aber nicht A1.
Yang <i>et al.</i> (2005)	Isoliertes Kaninchenherz	↓ Infarktgröße Kardioprotektion nicht von zirkulierenden Blutfaktoren, -zellen abhängig, sondern von PI3-K- und Guanylcyclase-Aktivierung und Beteiligung von Adenosinrezeptoren.
Heusch <i>et al.</i> (2006)	<i>In vivo</i> Mäuseherz	↓ Infarktgröße Connexin 43 ist keine Voraussetzung für Kardioprotektion durch Postkonditionierung.
Kaljusto <i>et al.</i> (2006)	Isolierte Rattenherzen	Keine Postkonditionierung nachweisbar
	<i>in vivo</i> Rattenherz	↓ Infarktgröße
	isoliertes Mäuseherz <i>in vivo</i> Mäuseherz	Rattenherzen für Studien der Postkonditionierung ungeeignet; genetisch veränderte Mäuse großes Potential für Forschung.
Tang <i>et al.</i> (2006)	<i>In vivo</i> Rattenherz	↓ Infarktgröße Kardioprotektion nur, wenn Ischämie < 45 min.
Zhu <i>et al.</i> (2006)	Isoliertes Rattenherz	↓ Infarktgröße Kardioprotektion am remodellierten Myokard über Aktivierung von PI3K-PKB/AKT.
Philipp <i>et al.</i> (2006)	<i>In vivo</i> Kaninchenherz	↓ Infarktgröße Abhängig von A2b-Rezeptor Aktivierung, die wiederum von PKC-Aktivierung abhängig ist.
Schwartz <i>et al.</i> (2006)	<i>In vivo</i> Schweineherz	Postkonditionierung aktiviert AKT und ERK, jedoch keine Kardioprotektion.

Ilidromitis <i>et al.</i> (2006 a)	<i>In vivo</i> Schweineherz	↓ Infarktgröße Kardioprotektion beim Schwein nur, wenn > 4 Zyklen Ischämie/Reperfusion.
Ilidromitis <i>et al.</i> (2006 b)	<i>In vivo</i> Kaninchenherz	Postkonditionierung kein protektiver Effekt bei Kaninchen mit Hypercholesterinämie und Arteriosklerose.
Lim <i>et al.</i> (2007)	<i>In vivo</i> Mäuseherz	↓ Infarktgröße mPTP wichtig für Kardioprotektion.
Tsutsumi <i>et al.</i> (2007)	<i>In vivo</i> Mäuseherz Isolierte, adulte, murine Kardiomyozyten	↓ Infarktgröße ROS lösen Kardioprotektion aus.
Gomez <i>et al.</i> (2007)	<i>In vivo</i> Mäuseherz	↓ Infarktgröße ↑ funktionelle Erholung ↑ Langzeit-Überleben Aufgrund der Inhibition der mPTP.
Donato <i>et al.</i> (2007)	Isoliertes Kaninchenherz	↓ Infarktgröße Kardioprotektion bei gesunden und hypercholesterinämischen über Aktivierung von A1-Rezeptoren und K _{ATP} -Kanälen.
Mykytenko <i>et al.</i> (2007)	<i>In vivo</i> Hundeherz	↓ Infarktgröße ↓ Superoxidationbildung ↓ PMN-Akkumulation Myokardschäden nehmen mit Dauer bis zu Beginn der Reperfusion zu. Kardioprotektion durch Postkonditionierung auch nach längerer Dauer effektiv.
Fujita <i>et al.</i> (2007)	<i>In vivo</i> Hundeherz	↓ Infarktgröße Aktivierung von AKT und ERK über längere, transiente Azidose zu Beginn der Reperfusion.
Zhao <i>et al.</i> (2007)	<i>In vivo</i> Schweineherz	↓ <i>no-reflow</i> ↓ Nekrose Jedoch nicht bei Hypercholesterinämie.

Da der Effekt der Postkonditionierung inzwischen sowohl *in vivo* als auch in Entzündungszell-freien Versuchen, am isoliert perfundierten Herzen und in der Zellkultur, nachgewiesen werden konnte, geht man davon aus, dass es eine Neutrophilen-abhängige und eine Neutrophilen-unabhängige Komponente gibt.

3.1. Zeitlicher Ablauf der Postkonditionierung

Bei der Postkonditionierung sind zum einen die Dauer der Ischämie-Reperfusionen und zum anderen der Zeitpunkt der Postkonditionierung während der Reperfusion für die Kardioprotektion entscheidend.

Bei der Ratte führten zum Beispiel Reperfusion-Ischämie-Sequenzen von je 30 Sekunden nicht zu einer Reduktion der Infarktgröße, Sequenzen von je 15 Sekunden und von je 10 Sekunden hingegen schon (Vinten-Johansen *et al.*, 2005 a). Es wurde an verschiedenen Spezies bestätigt, dass die Dauer der Reperfusion-Ischämiezyklen wichtiger ist als die Anzahl der Zyklen (Kin *et al.*, 2004 a; Yang *et al.*, 2004 a).

Beginnt die Postkonditionierung nicht zeitgleich mit der Reperfusion, kann eine zeitliche Abweichung von Sekunden bis Minuten -je nach Herzfrequenz der Spezies- den Schutz auslöschen (Kin *et al.*, 2004 a; Yang *et al.*, 2004 a). Die Infarktgröße entspricht dann der Größe ohne Postkonditionierung, jedoch war die Neutrophilenansammlung gleich groß wie bei rechtzeitiger Postkonditionierung. Diese Ergebnisse lassen es fraglich erscheinen, ob die Neutrophilenansammlung eine Schlüsselrolle beim Reperfusionsschaden spielt.

Es scheint so als ob kleinere Spezies (und damit kleinere Herzen, höhere Herzfrequenz) kürzere Zyklen benötigen als größere Spezies (mit entsprechend größeren Herzen, niedrigere Herzfrequenz). Die Gründe für die größenabhängigen Unterschiede sind komplex. Als mögliche Ursachen kommen Speziesunterschiede der Signalwege, der Mediatoren, der Trigger, der Kollateraldurchblutung und der Stoffwechselrate in Frage (Vinten-Johansen *et al.*, 2005 a).

Es ist noch unbekannt nach welcher Ischämiedauer eine Intervention durch Postkonditionierung noch möglich ist. Man weiß nur, dass die finale Infarktgröße noch nicht erreicht sein darf (Tsang *et al.*, 2005).

3.2. Wirkung der Postkonditionierung

Über welche Mechanismen die Postkonditionierung genau ihre Wirkung entfalten kann, ist unbekannt. Es wird die Beteiligung von Guaninnucleotid-bindenden Protein gekoppelten Rezeptoren, die Aktivierung von protektiven Signalwegen (Stickoxid, RISK) (Vinten-Johansen *et al.*, 2005 b), die Protein-Kinase C, die massive Freisetzung von ROS (Hearse, 1991; Grill *et al.*, 1992), die Aktivierung

der mitochondrialen K_{ATP} -Kanäle und die Inhibition der mPTP-Öffnung (Halestrap *et al.*, 2004; Juhaszova *et al.*, 2004; Feng *et al.*, 2005) diskutiert.

3.2.1. Guaninnucleotid-bindende Protein gekoppelte Rezeptoren

Da es noch nicht bekannt ist, ob die Reperfusionintervalle oder die ischämischen Phasen während der Postkonditionierung die Kardioprotektion auslösen (Vinten-Johansen *et al.*, 2005 a), ist es möglich, dass sowohl die zusätzlichen Reokklusionen nach der Indexischämie während der Postkonditionierung die Produktion von Adenosin, Bradykinin und Opioiden verändert, als auch, dass die Unterbrechung der Reperfusion die Auswaschung von endogen freigesetzten Adenosin- oder Purinzwischenprodukten verzögert (Kin *et al.*, 2004 b).

3.2.1.1 Adenosin

Adenosin ist ein körpereigenes Signalmolekül. Es wird vermutet, dass durch die Postkonditionierung Adenosin langsamer ausgewaschen wird und somit höhere intravaskuläre Gefäßkonzentrationen möglich sind. Endogen freigesetztem Adenosin wird eine Rolle bei der Kardioprotektion durch Postkonditionierung zugesprochen (Kin *et al.*, 2004 b; Philipp *et al.*, 2004). Endogenes Adenosin soll, neben dem inhibitorischen Effekt auf Neutrophile, durch Aktivierung von Koronargefäßendothel und von Myozyten abschwächende Wirkung auf die Freisetzung von Oxidantien und Cytokinen haben (Vinten-Johansen *et al.*, 2005 a). Die in blutfreien Zellmodellen beobachtete Kardioprotektion spricht auch für eine Wirkung des Adenosins auf andere Zelltypen neben den Neutrophilen (Darling *et al.*, 2004; Galagduza *et al.*, 2004; Sun *et al.*, 2004; Tsang *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2004 b).

Dabei werden die kardioprotektiven Eigenschaften nur über bestimmte der insgesamt vier Rezeptorsubtypen (A_1 , A_{2A} , A_{2B} , A_3) vermittelt. Kin *et al.* (2005 a) konnten zeigen, dass die kardioprotektiven Eigenschaften des Adenosins während der Reperfusion durch die Rezeptorsubtypen A_{2A} und A_3 vermittelt werden, jedoch nicht durch den Subtyp A_1 . Durch die Gabe des A_{2A} -Rezeptorantagonist ZM241385 wird die durch Postkonditionierung ausgelöste Kardioprotektion verhindert (Kin *et al.*, 2004 b). Die Aktivierung des A_{2A} -Rezeptorsubtyps während der Reperfusion wurde mit den anti-entzündlichen Effekten in Zusammenhang gebracht (Cronstein *et al.*, 1983; Cronstein *et al.*, 1985; Cronstein *et al.*, 1986; Cronstein *et al.*, 1992; Zhao *et al.*, 1996; Zhao *et al.*, 1997; Budde *et*

al., 2000; Zhao *et al.*, 2000).

3.2.1.2 Bradykinin

Während der Reperfusion verabreichtes Bradykinin reduziert die Infarktgröße über den RISK Signalweg und die Produktion von Stickoxid (Yang *et al.*, 2004 c). Bell und Yellon (2003) kamen in einem Ischämie-Reperfusion-Mausmodell zu ähnlichen Ergebnissen. Ob endogenes Bradykinin eine Rolle während der Postkonditionierung spielt, ist noch unbekannt.

3.2.1.3 Opiode

Von den drei Opioidrezeptorsubtypen (δ , κ , μ) kommen zwei (δ , κ) in Kardiomyozyten vor. Das Myokard kann mit Enkephalinen, Endorphinen und Dynorphinen die endogenen Hauptopioide synthetisieren.

In einem Rattenmodell wurde mit dem Subtyp-unselektiven Inhibitor Naloxon die Kardioprotektion der Postkonditionierung aufgehoben (Kin *et al.*, 2005 b). Die Kardioprotektion konnte aber auch durch Subtyp-spezifische δ - (Naltrindolhydrochlorid) beziehungsweise κ -Inhibitoren (Nor-Binaltorphimine Dyhydrochlorid) aufgehoben werden.

3.2.2. Protektive Signalwege

3.2.2.1 Stickoxid

Die Beteiligung von Stickoxid (NO) an der Postkonditionierung wurde durch Inhibition der Stickoxid-Synthase (NOS) untersucht. Dazu wurde mittels L-NAME die NOS kurz vor der Reperfusion inhibiert. Die Inhibition alleine hatte keine Auswirkung auf die Infarktgröße, die Inhibition in Verbindung mit Postkonditionierung hob jedoch die Kardioprotektion auf (Yang *et al.*, 2004 a). An isoliert perfundierten Rattenherzen wurde die Beteiligung der endothelialen Isoform der Stickoxidsynthase (eNOS) nachgewiesen (Tsang *et al.*, 2004). Durch die Aktivität der eNOS wird NO im gesunden Gefäßendothel tonisch freigesetzt. Diese Freisetzung von NO aus dem koronaren Gefäßendothel ist während Ischämie und Reperfusion beeinträchtigt (Ma *et al.*, 1993; Guo *et al.*, 1996). Da im Hundemodell Effekte auftreten, die als physiologische Antwort auf erhöhte NO-Bildung gelten, wird angenommen, dass durch die Postkonditionierung weiter NO freigesetzt wird (Zhao *et al.*, 2003; Halkos *et al.*, 2004). eNOS ist das Hauptenzym, das NO in Gefäßen (Kelly *et al.*, 1996) und im Gewebe (Balligand

et al., 1995) bildet. Es wird zum Teil durch AKT-abhängige Phosphorylierung am Serin 1177 aktiviert, zudem ist es ein *downstream target* der PI3-Kinase-AKT-Aktivität und anderer RISK-Signalwege (Hausenloy *et al.*, 2004).

3.2.2.2 *Reperfusion injury salvage kinase*

Die Beteiligung verschiedener *reperfusion injury salvage kinase* (RISK)-Signalwege an der Kardioprotektion während der Postkonditionierung wird derzeit untersucht. Hausenloy *et al.* (2005) konnten zeigen, dass Komponenten der RISK, AKT und ERK1/2, an der durch Postkonditionierung hervorgerufenen Kardioprotektion beteiligt sind. Andere Arbeitsgruppen hingegen zeigten, dass der PI3K/AKT-Signalweg und nicht ERK1/2 bei der Postkonditionierung eine Rolle spielt (Philipp *et al.*, 2004; Tsang *et al.*, 2004). Darüber hinaus konnte an isoliert perfundierten Rattenherzen eine Erhöhung des phospho-AKT Level durch Postkonditionierung nachgewiesen werden (Tsang *et al.*, 2004; Philipp *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2004 b).

Es konnte sowohl durch den Einsatz von dem MEK-ERK1/2 Inhibitor PD-98059 (Yang *et al.*, 2004 a) als auch durch den von PI3K-Inhibitoren (Tsang *et al.*, 2004; Zhu *et al.*, 2006) die Kardioprotektion der Postkonditionierung verhindert werden.

3.3. Protein-Kinase C

Bei Nagetieren sind die Isoformen ϵ und δ der Protein-Kinase C (PKC) im Zusammenhang mit der Postkonditionierung die bedeutenden. PKC δ könnte als „schlechte“ Isoform an der Pathogenese der Myokardschäden nach Ischämie und Reperfusion beteiligt sein (Inagaki *et al.*, 2003 a, 2003 b). PKC δ wird mit erhöhter Superoxid-Anion-Bildung, mitochondrialer Dysfunktion und der Freisetzung von Cytochrom C und nachgeschalteten pro-apoptotischen Faktoren in Zusammenhang gebracht (Murriel *et al.*, 2004; Churchill *et al.*, 2005). PKC ϵ wird hingegen als „gute“ Isoform mit der Kardioprotektion in Zusammenhang gebracht (Toma *et al.*, 2004; Kostyak *et al.*, 2006; Philipp *et al.*, 2006). PKC ϵ verhindert die Öffnung der mPTP (Baines *et al.*, 2003). Die Reduktion der Infarktgröße durch Kardioprotektion lässt sich durch nicht-selektive PKC-Antagonisten (Zatta *et al.*, 2006; Penna *et al.*, 2006) und durch selektive PKC ϵ -Antagonisten (Zatta *et al.*, 2006) aufheben. Selektive PKC δ -Antagonisten reduzieren die Infarktgröße (Zatta *et al.*, 2006).

Es wird vermutet, dass Postkonditionierung die Aktivität der kardioprotektiven PKC ϵ steigert und die der kardiodestruktiven PKC δ abnimmt.

3.4. *Reactive oxygen spezies*

Zu den *reactive oxygen spezies* (ROS) zählen Superoxidanion und Stickoxid mit den jeweiligen Produkten. Normalerweise entstehen sie bei der Reduktion von Sauerstoff zu Wasser in den Mitochondrien.

ROS haben vielfältige Funktionen im Körper unter anderem als ein Bestandteil der zellulären Homöostase, bei der Signalübermittlung, bei der Differenzierung, während der Mitose und der Immunantwort, aber auch als eine Antwort auf Streß, wie zum Beispiel nach Ischämie und Reperfusion. Während der Reperfusion kommt es zu einer massiven Freisetzung von ROS sowohl im Myokard (Zweier *et al.*, 1987; Duilio *et al.*, 2001) als auch in isolierten Mitochondrien (Serviddio *et al.*, 2005). Hearse (1973) beschrieb die Tatsache, dass die Wiederherstellung der Sauerstoffversorgung auch negative Auswirkungen hat als *oxygen paradox*. Die ROS-Konzentration während der Reperfusion hat schädigende Wirkung auf das Myokard (Ytrehus *et al.*, 1986). ROS schädigen durch Lipidperoxidation die Membran, denaturieren Proteine und beschädigen die genomische DNA.

ROS hat eine Doppelrolle, zum einen die als Botenstoff, zum anderen die des schädigenden Agens. Ob die Rolle als Botenstoff oder die als Schadstoff überwiegt hängt unter anderem davon ab in welcher Konzentration ROS vorkommen, ob eine Umwandlung von weniger zu stärker reaktiven Spezies stattfindet, ob die Umgebung Eisen für die Fenton-Reaktion bereitstellt und ob die ROS-bildenden Enzyme aktiviert werden.

Postkonditionierung verhindert im Zellmodell die übermäßige ROS-Bildung, den *Calciumoverload* sowohl im Zytosol als auch im Mitochondrium und reduziert den Zelltod (Sun *et al.*, 2005). Im Tiermodell wurde über die Dihydroethidium-Färbung eine geringe ROS-Bildung (Halkos *et al.*, 2004; Kin *et al.*, 2004 a) und weniger Produkte der Lipidperoxidation nachgewiesen (Zhao *et al.*, 2003; Halkos *et al.*, 2004; Kin *et al.*, 2004 a). Postkonditionierung verhindert die übermäßige Superoxid-Bildung im koronarem Gefäßendothel (Mykytenko *et al.*, 2007), dies ist vielleicht der Grund für die Erhaltung der Endothelfunktion in epikardialen Koronararterien (Zhao *et al.*, 2003). An isolierten Rattenherzen wurde gezeigt, dass die Gabe von einem Radikalfänger während der Reperfusion den Effekt der

Postkonditionierung aufhebt, wird jedoch der Radikalfänger erst nach der Postkonditionierung verabreicht, hebt es den Effekt nicht auf (Penna *et al.*, 2006). Die Versuche von Penna *et al.* (2006) legen nahe, dass bei der Kardioprotektion durch Postkonditionierung sowohl die Erhaltung der ROS als Botenstoff als auch die verminderten Schäden durch die Oxidantien eine Rolle spielen. Postkonditionierung reduziert auch die Oxidation von Glutathion, dem wichtigsten Antioxidans im Körper (Serviddio *et al.*, 2005).

3.5. ATP-abhängiger Kalium-Kanal

Der Aktivierung des ATP-abhängigen Kalium-Kanals (K_{ATP} -Kanal) wird im Zusammenhang mit der Postkonditionierung Bedeutung beigemessen (Yang *et al.*, 2003, 2004 a). Die Blockade des Kanals sowohl mit dem nichtselektiven Inhibitor Glibenclamide als auch mit dem selektiven Inhibitor des mitochondrialen K_{ATP} -Kanals 5-Hydroxydecantoate (5-HD) hob die kardioprotektive Wirkung der Postkonditionierung auf (Yang *et al.*, 2004 a). Die Wirkung von 5-HD legt nahe, dass der mitochondriale K_{ATP} -Kanal eine Rolle spielt. Ob der entsprechende sarkolemmale Kanal eine Wirkung hat ist nicht untersucht. Ebenso ist unbekannt, ob die Aktivierung des K_{ATP} -Kanals während der frühen Postkonditionierung oder später während der Reperfusion erfolgt. Fraglich ist auch, ob eine spätere Inhibition des K_{ATP} -Kanal nach der Postkonditionierung die Kardioprotektion aufhebt.

3.6. Mitochondriale Permeabilitäts-Transitions-pore

Neben dem K_{ATP} -Kanal ist die mitochondriale Permeabilitäts-Transitions-pore (mPTP) ein Ziel der Postkonditionierung.

Während der frühen Reperfusion wird die Öffnung der unspezifischen mitochondrialen Permeabilitäts-Transitions-pore (mPTP) durch Calcium-Überschuss und oxidativen Stress getriggert. Das Öffnen dieser Pore hat eine gravierende Änderung der Membranpermeabilität zur Folge, da es zum Einstrom von normalerweise impermeablen Proteinen mit nachfolgender Zellschwellung führt, was wiederum einen Zusammenbruch des Protonengradienten und eine Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung zur Folge hat.

Die Öffnung der mPTP wurde mit dem Einsetzen des Zelltodes sowohl durch Apoptose als auch durch Nekrose in Zusammenhang gebracht. Hinzu kommt, dass die Verhinderung der mPTP-Öffnung als kardioprotektiv gilt (Hausenloy *et al.*,

2002, 2003). Argaud *et al.* (2005 a) zeigte im Kaninchenmodell, dass durch Postkonditionierung die Öffnung der mPTP verhindert wird. Damit wäre die Beteiligung von (vermutlich erhöhtem) NO (Yang *et al.*, 2004 a), das die Öffnung der mPTP verhindert (Piantadosi *et al.*, 2002) und einer reduzierten Belastung sowohl durch ROS als auch durch intrazelluläres und mitochondriales Ca^{2+} (Sun *et al.*, 2005) möglich. Es ist jedoch noch nicht bekannt, ob die Inhibition der Öffnung der mPTP die anderen physiologischen und zellulären Effekte der Postkonditionierung zur Folge hat.

3.7. Aktiver und passiver Anteil der Postkonditionierung

Es ist in der Diskussion, ob es bei der Protektion durch Postkonditionierung einen aktiven und einen passiven Anteil gibt (Tsang *et al.*, 2004; Abb. 5). Durch die schrittweise Reperfusion kommt es beim passiven Anteil zur Reduktion der Sauerstoffradikale, der Calciumüberladung und der Neutrophilen. Im aktiven Anteil kommt es zur Aktivierung der *reperfusion injury salvage kinase* (RISK). Dafür sind zwei interagierende Signalwege verantwortlich: der eine verläuft über Aktivierung von PI3K, AKT und eNOS und inhibiert die Öffnung der mPTP, der andere aktiviert MEK1/2 und ERK1/2. AKT und ERK1/2 aktivieren p70s6K, das schließlich zur Proteintranslation führt oder zu einer Inaktivierung von BAD.

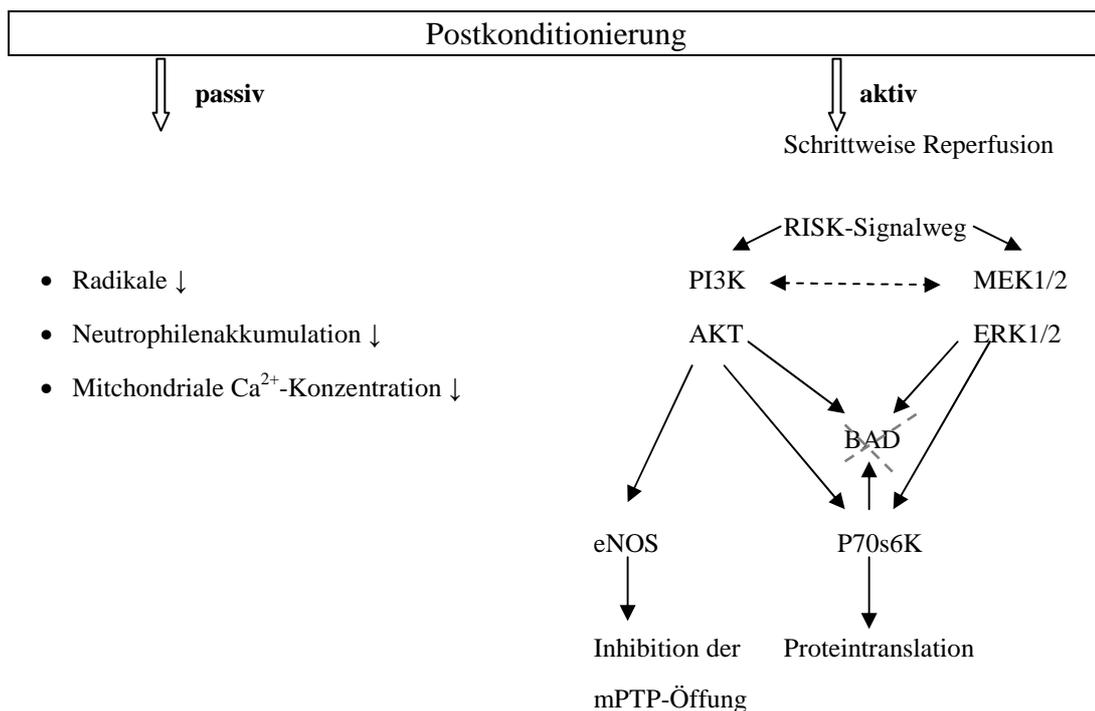


Abb. 5: Schematische Übersicht der Postkonditionierung nach Tsang *et al.*, 2004. Der passive Ast führt jeweils zur Reduktion von freien Radikalen, der Neutrophilenakkumulation und der mitochondrialen Calciumüberladung. Der aktive Ast führt über eine Aktivierung des RISK-Signalweges zu einer Inhibition der mPTP-Öffnung, der Proteintranslation oder Inaktivierung von BAD.

Durch *in vivo* Versuche wurde herausgefunden, dass die Protektion eher über den ERK1/2-Signalweg als über den PI3K/AKT-Signalweg zustande kommt (Darling *et al.*, 2005). Schwartz *et al.* (2006) zeigten im Schweinmodell, dass es durch die Postkonditionierung zwar zur Aktivierung von AKT und ERK kommt, dies aber keineswegs vor Reperfusionsschäden schützt.

3.8. Pharmakologische Postkonditionierung

Die Postkonditionierung lässt sich auch durch Narkosegase, wie zum Beispiel durch Isofluran, auslösen (Feng *et al.*, 2005; Weber *et al.*, 2005). Chiari *et al.* (2005) wiesen am Kaninchenherz während der frühen Reperfusion eine um ungefähr 50% verminderte Infarktgröße durch Isofluran nach. Dieser Effekt wird vermutlich über die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) vermittelt.

3.9. Klinische Bedeutung der Postkonditionierung

Die Besonderheit der ischämischen Postkonditionierung im Vergleich zur Präkonditionierung liegt in der klinischen Umsetzbarkeit bei der Therapie des

akuten Myokardinfarkt beim Menschen (Heusch, 2004; Valen *et al.*, 2005; Vinten-Johansen *et al.*, 2005 b).

In einer Studie an 30 Patienten mit akutem Myokardinfarkt und Symptombeginn vor weniger als 6 Stunden wurde von Staat *et al.* (2005) durch 4 Zyklen von 1-minütiger Reperfusion/1-minütiger Reokklusion zu Beginn der Reperfusion eine deutliche Reduktion der Creatin-Kinase-Freisetzung gezeigt.

4. Die hyperbare Sauerstofftherapie

Die hyperbare Sauerstofftherapie (*hyperbaric oxygenation*, HBO) wird als primäre Therapie bei der Dekompressionskrankheit, bei arterieller Gasembolie und bei Kohlenmonoxid-Vergiftung angewendet (Tibbles *et al.*, 1996). Darüber hinaus findet die HBO als unterstützende Therapie Anwendung zur Förderung der Wundheilung (Thackham *et al.*, 2008), bei diversen Infektions- und Inflammationsgeschehen und unter anderem auch bei beim Myokardinfarkt (Yogaratnam *et al.*, 2008).

Bei der hyperbaren Sauerstofftherapie wird 100% Sauerstoff in der Einatemluft mit einem höherem als dem normalen Atmosphärendruck verabreicht. Diese Sauerstoffdosis hat vielfältige, förderliche biochemische, zelluläre und physiologische Effekte (Yogaratnam *et al.*, 2007).

Sterling *et al.* (1993) zeigten im Kaninchenmodell eine signifikante Reduktion der Infarktgröße, wenn zu Beginn der Reperfusion Sauerstoff hyperbar verabreicht wurde.

In neueren Studien konnte eine dosisabhängige, kardioprotektive Wirkung der hyperbaren Sauerstofftherapie gezeigt werden (Dekleva *et al.*, 2004; Cabigas *et al.*, 2006; Yogaratnam *et al.*, 2007; Arab *et al.*, 2008).

Darüber hinaus konnten Petrosillo *et al.* (2011) in einem Rattenmodell zeigen, dass hyperoxische Präkonditionierung sowohl die mPTP-Öffnung als auch die Cytochrom C Freisetzung inhibiert und darüber kardioprotektiv wirkt.

5. Die Perfluorocarbone

Die Perfluorocarbone (PFC) sind vollständig mit Halogenen (Fluor) substituiertere Kohlenstoffverbindungen. PFCs wurden während dem Bau der Atombombe entwickelt (Sloviter *et al.*, 1969; Clark *et al.*, 1972; O'Brien *et al.*, 1972; Geyer,

1975; Clark, 1981) und werden seitdem in verschiedenen industriellen Bereichen (Clark *et al.*, 1970; Banks *et al.*, 1994; Lowe *et al.*, 1997) und auch medizinisch (Clark *et al.*, 1966; Sloviter *et al.*, 1969; Clark *et al.*, 1972; Geyer, 1973; Geyer, 1975; Clark, 1981; Geyer, 1982; Mitsuno *et al.*, 1982; O'Brien *et al.*, 1982; Tremper *et al.*, 1982; Shaffer *et al.*, 1992; Spiess *et al.*, 1996; Lowe *et al.*, 1999; Riess *et al.*, 1999; Obratsov *et al.*, 2000; Riess, 2005) genutzt.

5.1. Chemische und physikalische Eigenschaften der Perfluorocarbone

PFCs sind klare, farblose, geruchlose, nicht leitende und nicht brennbare Flüssigkeiten mit der doppelten Dichte von Wasser (Chang, 1998).

Nur die vollständige Substitution mit Halogenen verwandelt polare Kohlenwasserstoffe in unpolare PFCs. PFCs sind hydrophob und sind daher nicht mit wässrigen Lösungen mischbar (Keipert, 1998; Obratsov *et al.*, 2000).

Durch die sehr energiereiche, intramolekulare Kohlenstoff-Fluor-Bindung und die geringe Eigenschaft intermolekulare Bindungen einzugehen, können PFCs nicht an Enzyme oder Proteine binden. Sie sind biologisch inert (Sloviter *et al.*, 1969; Clark *et al.*, 1972; O'Brien *et al.*, 1972; Geyer, 1975; Clark, 1981) und werden nicht im Körper metabolisiert (Chang, 1998).

Aufgrund der unpolaren Struktur haben PFCs optimale Atemgastransporteigenschaften und können bei atmosphärischem Druck und Körpertemperatur große Mengen davon binden. Lineare PFC, wie zum Beispiel Perflubron, lösen mehr Sauerstoff als zyklische PFC, wie zum Beispiel Perfluorodecalin (Lowe, 1999). Die gute Gaslöslichkeit, die geringe Oberflächenspannung und die geringe Permittivität der PFC hängen unter anderem mit den geringen Van-der-Waals-Kräften des Fluors zusammen (Riess *et al.*, 1982).

PFC löst Gase und bindet sie nicht wie Hämoglobin kovalent. Es kommt beim PFC durch die Gasaufnahme und -abgabe weder zu Struktur-, Konformations- noch zu Verhaltensänderungen.

Die Gasmenge, die durch PFC gelöst werden kann, hängt vom Löslichkeitskoeffizienten des Gases ab und ist direkt proportional zu dem Partialdruck des Gases. Die Löslichkeit folgt also dem Henry-Gesetz (Riess, 2005; Arab *et al.*, 2008), das heißt, dass die PFCs eine hohe Gaskonzentration

während der Begasung brauchen um entsprechende Mengen Gas zu lösen.

5.2. Medizinischer Einsatz der Perfluorocarbone

Es wurde sowohl die intravenöse Verabreichung, als auch die pure, unverdünnte Gabe zur Flüssigkeitsbeatmung geprüft (Clark *et al.*, 1966; Sloviter *et al.*, 1969; Clark *et al.*, 1972; Geyer, 1973; Geyer, 1975; Clark, 1981; Geyer, 1982; Mitsuno *et al.*, 1982; O'Brien *et al.*, 1982; Tremper *et al.*, 1982; Spiess *et al.*, 1996; Obratsov *et al.*, 2000).

Clark und Gollan (1966) zeigten an Mäusen und Katzen die Möglichkeit der Flüssigkeitsbeatmung mit PFC. Die in PFC gelöste Menge Sauerstoff war in der Lage die Atemfunktion zu verbessern, jedoch gab es bei Katzen Beeinträchtigungen bei der Kohlenstoffdioxidatmung (Clark *et al.*, 1966). Dieser erste Versuch und die damit erhofften Einsatzmöglichkeiten der PFC faszinierten Wissenschaftler von nun an.

Die Eigenschaft der PFC bei Raumtemperatur beinahe 20 Mal so viel Sauerstoff transportieren zu können wie Wasser, ließen diese Flüssigkeit als Gaslieferant ideal erscheinen. Die intravenöse Verabreichung wurde durch die Entwicklung einer PFC-Mikroemulsion in Salz möglich (Sloviter *et al.*, 1967). Bei den ersten Versuchen zur intravenösen Verabreichung an Ratten, überwiegte jedoch die Emboli-Bildung diesen Nutzen (Geyer *et al.*, 1968).

Nachdem herausgefunden wurde, dass Perfluorodekalin schneller als die bis dahin entwickelten PFC aus dem Körper ausgeschieden wird (Clark *et al.*, 1973; Okamoto *et al.*, 1973; Naito *et al.*, 1990), begann die Entwicklung der ersten industriellen Emulsion Fluosol® (Green Cross Corp., Osaka, Japan).

Die erste Generation der industriellen PFC, Fluosol-DA 20%®, wurde in den späten 70er Jahren des 20. Jahrhunderts in den USA und in Japan als Blutersatz bei anämischen Patienten eingesetzt (Mitsuno *et al.*, 1982; Tremper *et al.*, 1982). Die mit 12 Stunden relativ kurze Plasmahalbwertszeit, der hohe Sauerstoffpartialdruck (>400 mmHg) und die geringe Applikationsdosis limitierten den Einsatz am Patienten (Sarteschi *et al.*, 2001).

Die zweite Generation setzt auf lineare Perfluorocarbone. Oxygent® (Alliance Pharmaceutical Corporation, San Diego, California, USA) enthält Perfluoroocetyl bromid und Perfluorodecyl bromid, als Emulgator wird

Eidotterphospholipid verwendet. Oxyfluor® (HemGen, St Louis, Missouri, USA) enthält Perfluorodichlorooctane und als Emulgator neben Eidotterphospholipid auch Triglycerid.

Im medizinischen Bereich können PFC als Blutersatz, zur Flüssigbeatmung, als Sensibilisator bei der Radiotherapie, zum Schutz bei Transplantationen und als Kontrastmittel bei Magnetresonanz- und Computertomographie eingesetzt werden (Shaffer *et al.*, 1992; Lowe *et al.*, 1999; Riess *et al.*, 1999; Riess, 2005). Trotz dieser vielfältigen Einsatzbereiche, ist derzeit kein PFC für den klinischen Einsatz zugelassen (Castro *et al.*, 2010).

5.3. Perfluorcarbone beim myokardialen Reperfusionsschaden

PFC mit einer sehr hohen Sauerstoff-Löslichkeit können aufgrund dieser Eigenschaft bei der Therapie der Ischämie hilfreich sein (Clark *et al.*, 1966; Magovern *et al.*, 1982; Tremper *et al.*, 1982).

Es wurden verschiedene Einsatzmöglichkeiten von PFC in myokardialen Ischämie modellen untersucht:

Zum einen wurde PFC als kardioplegische Lösung bei globalen Ischämie modellen untersucht. Es konnte im Vergleich zu bisher verwendeten kardioplegischen Lösungen gezeigt werden, dass die Sauerstoffanreicherung und die postischämische Myokardleistung verbessert sind (Kanter, 1979; Johnson *et al.*, 1988; Mosca *et al.*, 1996). Das myokardiale ATP bleibt fast vollständig erhalten (Flaherty *et al.*, 1984).

Zum anderen wurde PFC als Emulsion während der perkutanen transluminalen Koronarangioplastie durch den Ballonkatheter lokal verabreicht um eine Verbesserung der Sauerstoffversorgung des Gewebes zu erreichen und den Schaden der Ischämie zu begrenzen (Anderson *et al.*, 1985; Jaffe *et al.*, 1988).

Darüber hinaus wurden PFC als Perfusionlösung bei Modellen zur Myokardischämie (Koronarverschluss, akuter Myokardinfarkt) eingesetzt.

Glogar *et al.* (1981) zeigte im Hundemodell, dass die Infarktgröße nach 6 Stunden LAD-Koronararterien-Verschluss bei den anämischen, mit PFC infundierten Hunden, sowohl bei 100% Sauerstoff in der Einatemluft, als auch bei Raumluft, geringer war als bei den anämischen, mit Ringer-Laktat infundierten beziehungsweise den unbehandelten Kontrolltieren. Rude *et al.* (1982) fanden in

einem Hundemodell heraus, dass PFC den Partialdruck von Kohlenstoffdioxid unabhängig von einer zusätzlichen Sauerstoffzufuhr reduziert.

Bei den ersten Versuchen mit PFC wurden große Mengen davon eingesetzt, so dass eine anschließende Blutaustauschtransfusion unumgänglich war.

Forman *et al.* (1985) konnten zeigen, dass geringe Dosen von Fluosol-DA 20%® die Infarktgröße reduzieren ohne einen erheblichen Anstieg des pulmokapillären Verschlussdruckes und des linksventrikulären Füllungsdrucks und vor allem ohne eine Blutaustauschtransfusion als Folge zu haben. Mögliche Ursachen hierfür sind ein verminderter Endothelschaden nach PFC-Gabe zu Beginn der Reperfusion (Forman *et al.*, 1987 a, b) und zumindest *in vitro* eine schnellere ROS-Bildung durch Neutrophile (Forman *et al.*, 1992).

In klinischen Studien bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt konnte gezeigt werden, dass der Einsatz von PFC eine verbesserte ventrikuläre Funktion, eine reduzierte Infarktgröße und eine verbesserte Kontraktilität zur Folge hat (Forman *et al.*, 1991; Glazier, 2005). Als Nebenwirkungen traten beim klinischen Einsatz vermehrt Lungenödeme und kongestives Herzversagen auf (Wall *et al.*, 1994 b).

II. GEGENSTAND DER ARBEIT

In Zellkulturen primärer humaner Kardiomyozyten wurde in einem Hypoxie-Reoxygenierungsmodell der Einfluss einer Erhöhung der Atemgase Sauerstoff und Kohlenstoffdioxid auf Zell-, RNA- und Mitochondrienebene untersucht. Das Mitochondrium nimmt als „Kraftwerk der Zelle“ im Ischämie- und Reperfusionsgeschehen eine zentrale Rolle ein. Da geschädigte Mitochondrien den Zelluntergang einleiten ist deren Funktionalität für das Weiterleben der Zelle von entscheidender Bedeutung. Unser besonderes Augenmerk lag auf dem von Fukuda *et al.* (2007) postulierten Isoformen-*switch* der COX4-Untereinheiten. Da die Öffnung der mPTP während der Reperfusion von entscheidender Bedeutung für das Weiterleben der Zelle oder den Zelluntergang mit Einleitung von Apoptose beziehungsweise Nekrose ist, galt unser Interesse einer möglichen Stabilisierung dieser Pore.

Zunächst wurde versucht, ob das von Arab *et al.* (2008) eingeführte Hypoxie-Reoxygenierungsmodell mit PFC-gebundenem Sauerstoff auch auf ein Modell zur ischämischen Postkonditionierung übertragbar ist. Dazu wurde die Hypoxiedauer von 12 auf 4 Stunden reduziert. Zunächst wurde mit PFC-gebundenem Sauerstoff das Modell überprüft und anschließend die Wirkung von PFC-gebundenem Kohlenstoffdioxid untersucht.

Es wurden folgende Parameter sowohl nach hyperoxischer als auch nach Kohlenstoffdioxid-vermittelter, ischämischer Postkonditionierung betrachtet:

1. Auf Zellebene: Veränderung des pH-Wertes
2. Auf RNA-Ebene: Expression von COX4-1 und COX4-2 sowie HIF 1 α mittels quantitativer *real time* PCR
3. Auf Zellorganellebene: Entwicklung einer Resistenz der mPTP gegenüber wiederholten Calciumreizen mittels Calciumfluoreszenzbestimmung

Die zentralen Ziele dieser Arbeit waren ein Zellmodell für die ischämische, Kohlenstoffdioxid-vermittelte Postkonditionierung zu entwickeln, die biologischen Mechanismen zu untersuchen und dadurch eine Optimierung der Therapie zu ermöglichen.

III. MATERIAL UND METHODEN

1. Material

1.1. Zellen

Human Cardiac Myocytes
cryopreserved (HCM) PromoCell, Heidelberg, Deutschland

1.2. Zellkulturmedien

Myocyte Growth Medium PromoCell, Heidelberg, Deutschland

Supplement Mix Myocyte Growth
Medium PromoCell, Heidelberg, Deutschland

Cryo-SFM PromoCell, Heidelberg, Deutschland

1.3. Chemikalien

100 bp DNA Ladder, 100 – 2072 bp Gibco BRL Divison of Invitrogen,
Gaithersburg, USA

1kb DNA Ladder, 0,5 – 40 kb Gibco BRL Divison of Invitrogen,
Gaithersburg, USA

1-Bromoperfluorooctane (PFC) ABCR, Karlsruhe, Deutschland

5x Extraction Buffer A Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim,
Deutschland

5x Storage Buffer Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim,
Deutschland

6x Loading Dye Fermentas International Inc.
Burlington, Ontario, Kanada

Agarose Invitrogen Life Technologies,
Carlsbad, Kalifornien, USA

Aqua ad iniectabilia Braun, Melsungen, Deutschland

BSA-Standard Thermo Fisher Scientific Inc.,
Rockford, USA

Ca ²⁺	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland
Ca-Green	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Chloroform	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland
Coomassie-Brilliant-Blau	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
DEPC-Wasser	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland
DNaseI 10x Reaction buffer	Invitrogen GmbH, Carlsbad, USA
DNaseI Amplification Grade	Invitrogen GmbH, Carlsbad, USA
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS) w/o Ca Mg	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland
EDTA, 25 mM	Invitrogen GmbH, Carlsbad, USA
Ethanol	VWR, Fontenay, Frankreich
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland
Glutamat	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland
Isopropylalkohol	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland
KH ₂ PO ₄	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland
Malat	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland
MOPS	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland
Primer	Eurofins MWG, Ebersberg, Deutschland

Pyruvat	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland
RNAse Out	Invitrogen GmbH, Carlsbad, USA
Succinate	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland
Sucrose	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland
TAE	Promega Corporation, Madison, USA
Trizema	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland
Trizol Reagent	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

1.4. Kits

DetachKit (HepesBSS, Trypsin/EDTA, TNS)	PromoCell, Heidelberg, Deutschland
First strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR	Roche Diagnostics, Heidelberg, Deutschland
Light Cycler Fast Start DNA Master SYBR Green I	Roche Diagnostics, Heidelberg, Deutschland

1.5. Geräte und Zubehör

96-Loch-Platte	Nunc, Wiesbaden, Deutschland
Axiovert Mikroskop	Zeiss, Göttingen, Deutschland
Cellstar Tubes 15 ml	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Cellstar Tubes 50 ml	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Elektrophoresekammer SubCell GT mit Spannungsgerät PowerPac 3000	BioRad Laboratories Inc., Hercules Kalifornien, USA
Eppendorf Combitips plus, 0,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg,

	Deutschland
Eppendorf tubes (2ml)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Fluoreszenzmessgerät Gemini	Molecular Devices GmbH, Ismaning, Deutschland
Gelimager Biovision Videodokumentationssystem	Peqlab, Erlangen, Deutschland
Glasmörser u. -stößel Glascol	ABCR, Karlsruhe, Deutschland
Hypoxie-Kammer	Dinkelberg Analytics, Ulm, Deutschland
Inkubator Heracell	Heraeus, Hanau, Deutschland
Kimtech Präzisionstücher	Kimberly-Clark, Dallas, USA
LightCycler Capillaries 20 µl	Roche Diagnostics, Heidelberg, Deutschland
LightCycler System	Roche Diagnostics, Heidelberg, Deutschland
Parafilm "M"	Brand GmbH & CO KG, Wertheim Deutschland
Petrischalen 13,8 cm Durchmesser	Nunc, Wiesbaden, Deutschland
Petrischalen 5,3 cm Durchmesser	Nunc, Wiesbaden, Deutschland
pH Meter MP 220	Mettler, Toledo, Gießen, Deutschland
Pipetman Filter Tips 0,1-10µl	Gilson, Villiers le Bel, Frankreich
Pipetman Filter Tips 20-200µl	Gilson, Villiers le Bel, Frankreich
Pipetman Filter Tips 2-30µl	Gilson, Villiers le Bel, Frankreich
Pipette Pipetman, 0,2-2 µl	Gilson, Villiers le Bel, Frankreich
Pipette Pipetman, 20-200 µl	Gilson, Villiers le Bel, Frankreich
Pipette Pipetman, 2-20 µl	Gilson, Villiers le Bel, Frankreich

Pipettenspitzen ep T.I.P.S., 1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen ep T.I.P.S., 200 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipettor Easyspet	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipettor Eppendorf Reference 1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipettor Multipette plus	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Plastikkulturflaschen 25 cm ²	Nunc, Wiesbaden, Deutschland
Plastikkulturflaschen 80 cm ²	Nunc, Wiesbaden, Deutschland
Sicherheitswerkbank Biohazard EN 12469	Thermoquest, München, Deutschland
Spektroskop SpectraMAX Plus	Molecular Devices, Sunnyvale, USA
Stripette 10ml	costar, Corning Inc., Corning, USA
Stripette 25ml	costar, Corning Inc., Corning, USA
Stripette 2ml	costar, Corning Inc., Corning, USA
Stripette 5ml	costar, Corning Inc., Corning, USA
Thermocycler PTC 200	Biozym, Hess, Deutschland
Thermomixer 5436	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Thermowell Tubes, 0,5 ml RNase DNase free	costar, Corning Inc., Corning, USA
Vortex Heidolph Reax top	Heidolph instruments GmbH & CO KG, Schwabach, Deutschland
Waage Scaltec	Scaltec Instruments, Göttingen, Deutschland

Zellkratzer Costar	Corning Incorporated, Corning, USA
Zentrifuge Biofuge primo R	Heraeus, Hanau, Deutschland
1.6. Gase	
CO ₂	Linde Gase, Unterschleißheim, Deutschland
Gasgemisch für medizinische Zwecke 5 Vol% CO ₂ , 95 Vol% N ₂	Air Liquide, Düsseldorf Deutschland
Carbogen: 95 Vol% O ₂ , 5 Vol% CO ₂	Sauerstoffwerk Friedrichshafen, Friedrichshafen Deutschland
1.7. Software	
LightCycler Software version 5	Roche Diagnostics, Heidelberg, Deutschland
Softmax pro	Molecular Devices GmbH, Ismaning, Deutschland
2. Methoden	
2.1. Zellkultur	
<p>Es wurden für Langzeitversuche geeignete menschliche, kryokonservierte Herzmuskelzellen (HCM) in Passage 2, Myocyte Growth Medium und SupplementMix Myocyte Growth Medium von PromoCell, Heidelberg, Deutschland, bezogen. Die Zellen wurden in 1 ml serumfreien, DMSO-haltigen Cryo-SFM geliefert. Laut Hersteller waren pro ml > 500 000 Zellen enthalten. Die Zellen wurden in Trockeneis geliefert. Die Kultivierung erfolgte laut des <i>Instruction Manual for cryopreserved human cardiac myocytes</i> des Herstellers. Zunächst wurde das Myocyte Growth Medium mit dem SupplementMix Myocyte Growth Medium (Promocell, Heidelberg, Deutschland) versetzt. Von diesem Medium wurden 5 ml in eine 25 cm² Plastikkulturflasche (Nunc, Wiesbaden, Deutschland) gegeben und diese 30 Minuten bei 37°C mit Raumluft und 5% CO₂ inkubiert. Eine ausreichende Menge Medium ist von entscheidender Bedeutung, da das Einfriermedium DMSO enthält, das beim Auftauen eine zelltoxische Wirkung entfaltet. Daher muss die Menge des Mediums so gewählt werden, dass</p>	

das toxische DMSO ausreichend verdünnt wird. Das Einfriertube mit den darin enthaltenen, kryokonservierten HCM wurde aus dem Trockeneis entnommen. Um den Überdruck zu reduzieren wurde der Deckel leicht geöffnet und die Zellen wurden bei 34°C inkubiert, bis ca. 70% aufgetaut waren. Das Einfriertube wurde mit Ethanol (VWR, Fontenay, Frankreich) von außen gereinigt und die Zellen umgehend in die bereits mit vorgewärmten Medium versehene Plastikkulturflasche (Nunc, Wiesbaden, Deutschland) überführt und anschließend bei 37°C mit Raumluft und 5%CO₂ inkubiert. Ein Medienwechsel erfolgte am nächsten Tag um das zelltoxische DMSO des Einfriermediums weiter zu verdünnen. Die Herzmuskelzellen wurden in einem Verhältnis von 1:2 gesplittet, wenn sie eine Konfluenz von 60% erreichten. Zum Splitten wurde das Detach Kit (PromoCell, Heidelberg, Deutschland) verwendet. Zuerst erfolgte ein Waschschriff mit HepesBSS (Promocell, Heidelberg, Deutschland) um das im Medium enthaltene fetale Kälberserum, ein Trypsininhibitor, zu entfernen. Im Anschluss wurde das gleiche Volumina Trypsin (PromoCell, Heidelberg, Deutschland) auf die Zellen gegeben und für maximal 4 Minuten belassen. Die Zellen lösten sich unter vorsichtigem Schwenken und leichtem Klopfen von der Kulturfläche. Durch ein äquivalentes Volumen TNS (PromoCell, Heidelberg, Deutschland) wurde die Trypsinaktivität gestoppt. Die Zellsuspension wurde bei 220g und 4°C für 4 Minuten zentrifugiert. Der klare Überstand wurde entfernt und die Zellen in frischem Medium resuspendiert und auf Plastikkulturgefäße (Nunc, Wiesbaden, Deutschland) der entsprechenden Größe verteilt. Das Medium wurde 24 Stunden nach dem Splitten gewechselt um das zelltoxische Trypsin zu entfernen, danach erfolgte der Medienwechsel alle 48 Stunden.

Für die Hypoxie wurden die Zellen in Petrischalen (Nunc, Wiesbaden, Deutschland) mit 13,8 cm Durchmesser für die Mitochondrienextraktion und in Petrischalen mit 5,3 cm Durchmesser für die PCR ausgesät. Die Petrischalen wurden für 24 Stunden weiter inkubiert und vor der Hypoxie wurde noch ein Medienwechsel durchgeführt.

2.2. Hypoxie und Reoxygenierung

Für die Hypoxie wurde das Modell von Arab *et al.* (2008) modifiziert. Die Hypoxie-Kammer (Dinkelberg Analytics, Ulm, Deutschland) wurde mit 70% Ethanol (VWR, Fontenay, Frankreich) gereinigt und für 20 Minuten unter das UV-Licht der Sicherheitswerkbank Biohazard EN12469 (Thermoquest, München,

Deutschland) gestellt. In die Kammer wurden die übereinander gestapelten Petrischalen mit den Zellen reingestellt und zusätzlich zu oberst und zu unterst je eine Petrischale mit 50 ml Aqua ad iniectabilia (Braun, Melsungen, Deutschland). Die Wasserschalen sollten das Austrocknen der Zellen durch den Gasfluss in der Hypoxiekammer vermeiden. Die Kammer verblieb für 4 Stunden im Inkubator bei 37°C und 95% N₂, 5% CO₂ (Air Liquid, Düsseldorf, Deutschland). Mit dieser Hypoxie wurde eine Ischämie, die mit einem Infarktgeschehen vergleichbar ist, nachgeahmt.

Die Reoxygenierung mit PFC (ABCR, Karlsruhe, Deutschland) erfolgte ebenfalls nach einer modifizierten Methodik von Arab *et al.* (2008). Diese beschreibt, dass die Viabilität postischämischer Myozyten von der Konzentration des zugeführten oxygenierten PFC abhängig ist. Die beste Protektion wurde mit 750µM O₂ in 0,1 µM PFC erreicht (Arab *et al.*, 2008). Diese Menge entspricht 300 µl PFC (große Petrischale) bzw. 75 µl PFC (kleine Petrischale), die für 10 Minuten mit 95% O₂ (Sauerstoffwerke Friedrichshafen, Friedrichshafen, Deutschland) begast wird. Für die Reoxygenierung mit CO₂ wurden 2 ml (große Petrischale) bzw. 0,5 ml (kleine Petrischale) PFC verwendet, das ebenfalls 10 Minuten mit CO₂ (Linde, Unterschleißheim, Deutschland) begast wurde. Das begaste PFC wurde luftdicht verschlossen.

Die Herzmuskelzellen wurden zur Reoxygenierung aus der Hypoxie-Kammer entnommen, das Medium gewechselt, bei den Proben 2 ml (große Petrischalen)/0,5ml (kleine Petrischalen) mit CO₂-begastes PFC (ABCR, Karlsruhe, Deutschland) beziehungsweise 300µl (große Petrischalen)/75 µl (kleine Petrischale) mit O₂-begastes PFC hinzugefügt. Dies wurde für 10 Minuten unter leichtem Schwenken belassen, es erfolgte ein erneuter Medienwechsel und eine Inkubationszeit bei 37°C und 5% CO₂. Jede Probe wurde von einer Kontrolle begleitet, bei der das Medium gewechselt wurde und die unter den gleichen Bedingungen wie die Proben inkubiert wurde. Die Inkubationszeit variierte je nach Versuch zwischen 5, 15, 30, 45 und 60 Minuten.

2.3. pH-Messung

Die Zellkulturmedien der Kontroll- und Probengruppen wurden mit dem pH-Meter MP 220 (Mettler Toledo, Gießen, Deutschland) bei Raumtemperatur gemessen. Bei den Kontrollgruppen wurde der Wert nach der Hypoxie, sowie der

Wert nach Ablauf der Inkubationszeit gemessen, bei den Probengruppen zusätzlich der Wert nach 10-minütiger PFC-Behandlung. Bei der Auswertung wurde die Differenz zwischen dem pH-Wert nach Ablauf der Inkubationszeit und dem pH-Wert nach der Hypoxie berechnet.

2.4. Mitochondrien-Extraktion und Calcium-Retentions-Kapazität-Messung

2.4.1. Mitochondrien-Extraktion

Das Ziel der Mitochondrien-Extraktion war intakte Mitochondrien mit unbeschädigter innerer und äußerer Membran zu gewinnen. Dazu wurden die Mitochondrien intakter Herzmuskelzellen mittels physikalischer Trennung gewonnen. Alle Schritte fanden auf Eis statt.

Nach der Inkubationszeit erfolgten zunächst zwei Waschschrte mit dem gleichen Volumen Dulbecco's PBS w/o Ca Mg (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) wie zuvor das Zellmedium verwendet wurde. Es wurden 2 ml PBS w/o Ca Mg dazugegeben und die Zellen mit einem Zellkratzer (Corning Incorporated, Corning, USA) entfernt. Die Zell-Suspension wurde bei 220g und 4°C für 4 Minuten zentrifugiert. Der klare Überstand wurde entfernt, die Zellen in 1ml 1x Extraction Buffer (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) resuspendiert und 5 Minuten im Mörser (ABCR, Karlsruhe, Deutschland) homogenisiert. Das Homogenisat wurde bei 600g und 4°C für 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand, der Mitochondrien und andere Zellorganellen enthielt, wurde bei 11000g und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert. Nach diesem Zentrifugationsschritt befanden sich die Mitochondrien im Pellet, der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 100 µl 1x Storage Buffer (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) gelöst und bei -80°C eingefroren.

2.4.2. Mitochondrialer Bradford Assay

Zur Feststellung der Mitochondrienkonzentration wurde ein *Bradford Assay* durchgeführt. Für die Standardkurve wurde 20 µl BSA-Standard 2 µg/ml (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, USA) verwendet und mit Aqua ad iniectabilia (Braun, Melsungen, Deutschland) auf 200 µl aufgefüllt. 200 µl dieser BSA-Verdünnung wurde in das erste *Well* (A1) einer transparenten 96-Loch-Platte (Nunc, Wiesbaden, Dänemark) gegeben. In die *Wells* B1-H1 wurden jeweils 100

µl Aqua ad iniectabilia (Braun, Melsungen, Deutschland) vorgelegt. Um die Verdünnungsreihe zu erstellen wurden jeweils 100 µl der Verdünnung aus dem oberen *Well* (bei A1 startend) entnommen und in das sich darunter befindende gegeben. Die 100 µl aus H1 wurden verworfen, damit sich in allen *Wells* die gleiche Menge Flüssigkeit befand. Zusätzlich wurden noch 1 *Well* als *Blank* mit 100 µl Aqua ad iniectabilia (Braun, Melsungen, Deutschland) ein weiteres *Well* wurde mit 1 µl 1x Storage Buffer und je 1 *Well* mit je 1 µl der mitochondrialen Proben (in Storage Buffer, Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland) befüllt. Der 1 µl des 1x Storage Buffer und der Proben wurde mit Aqua ad iniectabilia (Braun, Melsungen, Deutschland) 1:100 verdünnt. Zu Verdünnungsreihe, Proben und Blank wurden je 25 µl Coomassie-Brillant-Blau (Bio Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) hinzugegeben und vermischt.

Nach einer Standzeit von 5 bis maximal 60 Minuten ermittelte man nach der Messung im Spektrophotometer SpektraMAX Plus (Molecular Devisces GmbH, Sunnyvale, USA) bei einer Wellenlänge von 595 nm anhand der Standardkurve die Proteinmenge in µg/ml. Die Versuche wurden mit ungefähr 40 µg Mitochondrienprotein durchgeführt.

2.4.3. Calcium-Retentions-Kapazität

Mit Hilfe der Calcium-Retentions-Kapazität (*calcium retention capacity* = CRC) wurde der Gehalt an Ca²⁺-Ionen bestimmt, den die Mitochondrien aufnehmen und speichern können, ehe sie mit einer calciuminduzierten Calciumfreisetzung reagieren (Ichas *et al.*, 1994; Ichas *et al.*, 1997; Fontaine *et al.*, 1998). Diese Calciumfreisetzung kann man mittels Calcium-bindender Fluoreszenzfarbstoffe sichtbar machen (Ichas *et al.*, 1994; Ichas *et al.*, 1997; Fontaine *et al.*, 1998).

Als Vorbereitung für die Messung der Calcium-Retentions-Kapazität erfolgte zuerst die Herstellung der benötigten Puffersubstanzen und Substrate der Atmungskette für den CRC-Puffer.

Puffer

1M Sucrose	10,269 g Sucrose auf 30 ml mit Aqua ad iniectabilia auffüllen
0,1M Tris/MOPS	6,05 g Tris in 250 ml Aqua ad iniectabilia, pH 7,3 mit MOPS einstellen, auf 500 ml auffüllen

0,1M EGTA/Tris 3,81 g EGTA in 50 ml Aqua ad iniectabilia, pH 7,3 mit Tris einstellen, auf 100 ml auffüllen

1M Pi 6,805 g KH_2PO_4 in 25 ml Aqua ad iniectabilia, pH 7,3 mit Tris einstellen, auf 50 ml auffüllen

Substrate der Atmungskette

0,25M Glutamat/Tris u. 0.125 Malat/Tris 9,2 g Glutamat und 4,2 g Malat in 100 ml Aqua ad iniectabilia, auf 250 ml auffüllen

0,25M Pyruvat/Tris 5,5 g Pyruvat in 100 ml Aqua ad iniectabilia, pH 7,4 mit Tris einstellen, auf 250 ml auffüllen

Es folgte die Herstellung des CRC-Puffers, dazu wurden 200 μl 0,25 M Glutamat-Tris und 0,125 Malat-Tris, 200 μl 0,25 M Pyruvat-Tris, 2,5 ml 1 M Sucrose, 100 μl 1 M Pi, 500 μl 0,1 M EGTA-Tris, 1 ml 0,1 M Tris-Mops und 5,5 ml Aqua ad iniectabilia zusammenpipettiert. Ca-Green Stock (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) wurde 1:5 verdünnt, davon 10 μl zu 2 ml CRC-Puffer gegeben. 3 μl 0,1 M Ca^{2+} wurden mit Ca-Green-CRC 1:500 verdünnt. Ca-Green bindet an freies Calcium und ermöglicht durch Fluoreszenz die photometrische Bestimmung der Calcium-Konzentration. Die Ca^{2+} -Ca-Green-CRC-Lösung diente als *Loading*-Lösung. Je Messschritt wurden 15 μl dazugegeben, dies entspricht einer Ca^{2+} -Menge von 3 nmol.

Die Mitochondrien wurden aufgetaut, bei 11000g und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet (~40 μg ; siehe Bradford-Assay) in 50 μl Ca-Green-CRC gelöst.

Gemessen wurde in einer schwarzen 96-Loch-Platte (Nunc, Wiesbaden, Deutschland) mit dem Fluoreszenzmessgerät (Molecular Devices, Ismaning, Deutschland) und der Software Softmax pro (Molecular Devices GmbH, Ismaning, Deutschland). Als erstes erfolgte die Messung des Hintergrundwertes, dazu wurden 50 μl Ca-Green-CRC bei Extension/Emission 505/535 für t=1 min gemessen, danach erfolgte die Zugabe der in Ca-Green-CRC gelösten Mitochondrien und die entsprechende Messung wie beim Hintergrundwert. Alle 2 Minuten wurden 15 μl der Ca^{2+} -Ca-Green-CRC *Loading*-Lösung zugegeben und bei gleicher Extension/Emission wie der Hintergrundwert gemessen.

2.4.4. Calcium-Retentions-Kapazität im Rahmen der Vorversuche

Im Rahmen der Vorversuche führten wir die Messungen wie oben beschrieben durch. Bei der Reoxygenierung der CO₂-Probe verwendeten wir jedoch 1 ml statt später 2 ml mit Kohlenstoffdioxid-begastem PFC. Es zeigte sich hier nur eine mäßige Stabilisierung der mPTP gegenüber wiederholten Calciumreizen nach ischämischer Reoxygenierung (CO₂) im Vergleich zur normoxischen Reoxygenierung (N) (Abb. 6).

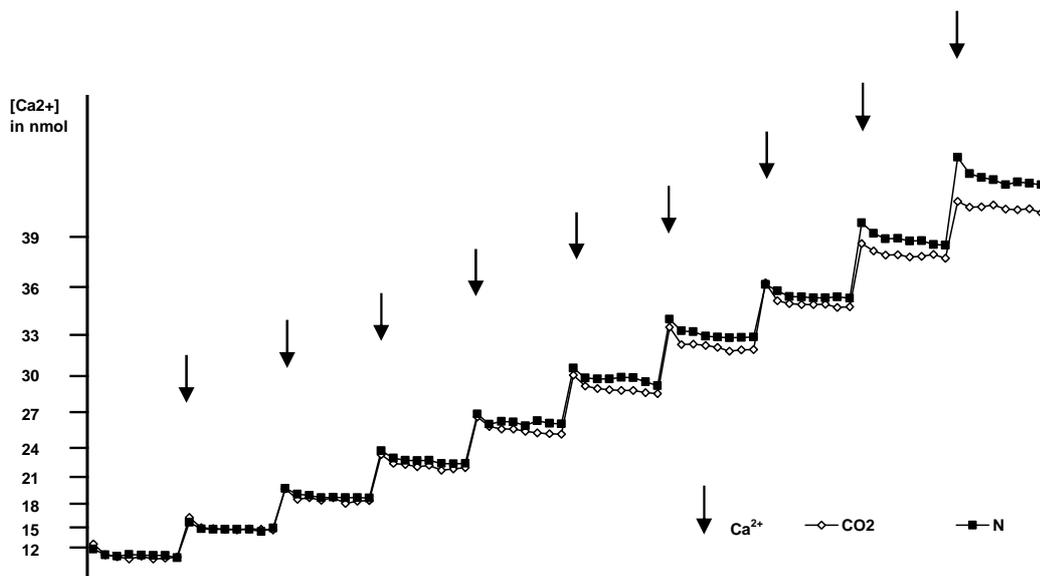


Abb. 6: Mitochondriale Calcium Retention Capacity –Messung im Rahmen der Vorversuche. Die ischämische Reoxygenierung (CO₂) erzielte hier im Vergleich zur Normoxie (N) eine mäßige Stabilisierung der mPTP gegenüber Calcium. Ab einer Calciumkonzentration von [Ca²⁺] = 36 nmol/l reagiert die Normoxie mit einer Calciumentladung, die ischämisch reoxygenierten Mitochondrien puffern Calcium weiterhin ab (n=3).

2.5. RNA-Extraktion, cDNA-Synthese, PCR

2.5.1. RNA-Extraktion

Die Zellen wurden nach der Methode der Guanidin-Thiocyanat-Phenol-Chloroform-Extraktion von Chomczynski (1987) mit Trizol lysiert. Dazu wurde zu jeder kleinen Petrischale 1 ml Trizol (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) hinzugegeben und für 1-5 Minuten belassen. Das Trizol mit den darin enthaltenen lysierten Zellen wurde in ein Eppendorf-Tube (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) überführt.

2.5.1.1 Phasentrennung

Es wurden 0,2 ml Chloroform (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) dazugegeben und zur besseren Durchmischung wurde die Probe für 15 Sekunden geschwenkt und anschließend 2 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Phasentrennung erfolgte ein Zentrifugationsschritt bei 12000g und 4°C für 15 Minuten. Die obere wässrige Phase enthielt vor allem RNA, die untere organische Phase überwiegend Chloroform, Proteine und DNA.

2.5.1.2 RNA-Präzipitation

Die wässrige Phase wurde in ein neues *Tube* überführt und 0,5 ml Isopropylalkohol (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) zur RNA-Fällung dazugegeben und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Durch das Zentrifugieren bei 12000g und 4°C für 10 Minuten bildete die RNA ein gelartiges Präzipitat.

2.5.1.3 Waschschrift

Der Überstand wurde entfernt und das Gel-Pellet in 1 ml 75% DEPC-Ethanol (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) gelöst. Nach erneuter Zentrifugation bei 7500 g und 4°C für 5 Minuten wurde der Überstand verworfen und das Pellet bei Raumtemperatur getrocknet. Das trockene Pellet wurde in 7µl H₂O (Roche Diagnostics, Heidelberg, Deutschland) aufgenommen. Um die RNA-Ausbeute zu maximieren wurde 10 Minuten bei 55-60°C inkubiert.

2.5.2. DNA-Verdau

Die verbleibende DNA wurde mit verdünnter DNaseI verdaut. Dazu wurden für 6 Proben 20 µl Mastermix aus 14 µl H₂O (Roche Diagnostics, Heidelberg, Deutschland), 2µl 10x Buffer (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland), 2 µl 1:10 verdünnter DNaseI (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) und 2 µl RNase Out (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) hergestellt. Je 3 µl Mastermix wurde zu dem in 7 µl H₂O gelösten RNA-Pellet gegeben, für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und die Reaktion mit je 1 µl EDTA (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) gestoppt. Um sicherzugehen, dass die DNaseI komplett denaturiert wurde, folgte eine Erhitzung auf 60°C für weitere 10 Minuten.

2.5.3. cDNA-Synthese

Mit dem cDNA-Synthes Kit for RT-PCR (Roche Diagnostics, Heidelberg, Deutschland) erfolgte die cDNA-Synthese. Für 6 Proben benötigte man 82,6 µl Mastermix, bestehend aus 14 µl 10x Buffer, 28 µl MgCl₂, 14 µl Deoxy, 7 µl RNA-Inhibitor, 14 µl Random Primer und 5,6 µl AMV-RT. Je 11,8 µl Mastermix wurden zu 8,2 µl RNA gegeben und im Thermocycler PTC 200 (Biozym, Hess, Deutschland) bei 25°C für 10 min, bei 42°C für 60 min, bei 95°C für 5 min und bei 4°C für 5 min inkubiert.

2.5.4. Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction

Durch Benutzung spezifischer Primer (Eurofins MWG, Ebersberg, Deutschland) (Simpson *et al.* 2000 und Tabelle 2) wurden Transkripte der Cytochrom C Oxidase 4-1 (COX4-1), der Cytochrom C Oxidase 4-2 (COX4-2), des *hypoxic inducible factor 1α* (HIF 1α), und als Transkripte eines konstitutiv exprimierten Genes 28S rRNA mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) amplifiziert und durch SYBR Green I quantifiziert (Morrison *et al.*, 1998).

Tab. 2: Die verwendeten Primer mit spezifischer Sequenz, Anlagerungs- und Schmelztemperatur (nach Simpsons *et al.*, 2000)

Gene	Primer	Primer-Sequenz (5'-3')	Anlagerungs-temperatur	Schmelz-temperatur
28 S rRNA	forward	TTG AAA ATC CGG GGG AGA G	54°C	87°C
	reverse	ACA TTG TTC CAA CAT GCC AG		
COX4-1	forward	GAG CAA TTT CCA CCT CTG C	55°C	87°C
	reverse	CAG GAG GCC TTC TCC TCC TC		
COX4-2	forward	GCT ATG CCC AGC GCT ACT AC	55°C	78°C
	reverse	CAT CTC CGC AAA GGT CTC AT		
HIF 1α	forward	ACA AGT CAC CAC AGG ACA G	52°C	83°C
	reverse	AGG GAG AAA ATC AAG TCG		

Für die PCR wurde das LightCycler System (Roche Diagnostics, Heidelberg, Deutschland) nach Herstellerinformationen verwendet. Es wurde ein Mastermix aus H₂O, MgCl₂, 1:10 verdünntem Primer *forward*, 1:10 verdünntem Primer *reverse* und der SYBR-Green-Mischung hergestellt. Es erfolgte die Herstellung einer Verdünnungsreihe einer bestimmten cDNA, mit den Konzentrationen 1:10, 1:100, 1:1000 und 1:10000. Hierzu wurden 2 µl einer cDNA mit 18 µl H₂O

versetzt und dies entsprechend weiterverdünnt. Die Glaskapillare wurden mit 18 μ l Mastermix und 2 μ l cDNA beziehungsweise 2 μ l verdünnter cDNA befüllt.

Als erstes fand ein 10-minütiger Denaturierungsschritt bei 95°C statt. Dieser sogenannte *Hot-Start-Approach* dient zur Reduktion der unspezifischen PCR-Produkte. Die hier verwendete Taq-Polymerase liegt erst bei Temperaturen \geq 60°C in aktiver Form vor. Es folgten 55 Zyklen, die aus je einer Denaturierungsphase bei 95°C für 10 Sekunden, einer Anlagerungsphase bei der für den jeweiligen Primer spezifischen Anlagerungstemperatur für je 10 Sekunden und einer Synthesephase bei 72°C für je 20 Sekunden bestanden. Zwischen den Zyklen fand jeweils mittels spektroskopischer Messung eine Quantifizierung der dsDNA statt. Diese Messung erfolgte für je 2 Sekunden 2°C unter der jeweils spezifischen Schmelztemperatur der Primer, dadurch wurde verhindert, dass unspezifische Produkte mitgemessen wurden.

Nach der Amplifikation wurde eine Schmelzkurve durch Aufheizen auf 95°C, Abkühlen auf 65°C und erneutes, langsames Aufheizen in 0,1°C/s ermittelt. Bei diesem Verfahren wird die unterschiedliche Schmelztemperatur von spezifischen und unspezifischen PCR-Produkten ausgenutzt.

2.5.5. Agarosegelelektrophorese

Zum Nachweis der spezifischen Produkte der qRT-PCR wurde eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Für das 1,5% Agarosegel wurde zunächst 75 ml 1x TAE (Promega Corporation, Madison, USA) mit 1,125 g Agarose (Invitrogen Life technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA) zusammen in der Mikrowelle bei 600 W erhitzt bis keine Schlieren mehr sichtbar waren. Danach wurde die Lösung 10 Minuten bei 50-60°C auf der Heizplatte inkubiert und 7,5 μ l Ethidiumbromid (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland) dazugegeben. Danach wurde das Gel umgehend in die schon mit dem Probenkamm versehene Probenkammer gegossen und dort zum Auspolimerisieren 30-40 Minuten belassen.

Die Proben wurden aus den Light-Cycler-Glaskapillaren gewonnen, indem sie kopfüber in Eppendorf-Tubes (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) gestellt und bei 3000g für 1 Minute zentrifugiert wurden. Die so gewonnenen Proben wurden mit 5 μ l 6x Loading Dye (Fermentas International Inc., Burlington, Ontario, Kanada) versetzt. 2 μ l Markerlösung 100 bp Ladder (Gibco BRL

Division of Invitrogen, Gaithersburg, USA) wurde mit 8 μ l 6x Loading Dye (Fermentas International Inc., Burlington, Ontario, Kanada) versetzt.

Das Gel wurde in die Elektrophoresekammer (SubCell-GT, BioRad Laboratories Inc., Hercules, Kalifornien, USA) gesetzt, mit 1x TAE (Promega Corporation, Madison, USA) überschichtet und die Taschen beladen. Die Elektrophoresekammer wurde an die Stromquelle (Power Pac 3000, BioRad Laboratories Inc., Hercules, Kalifornien, USA) angeschlossen und bei konstanter Spannung von 100 V 45-50 Minuten laufen gelassen. Im Anschluss daran wurden die Proben unter UV-Licht mittels des Gelimager (Bio Vision Videodokumentationssysteme, Peqlab, Erlangen, Deutschland) sichtbar gemacht und digital gespeichert (Abb. 7).

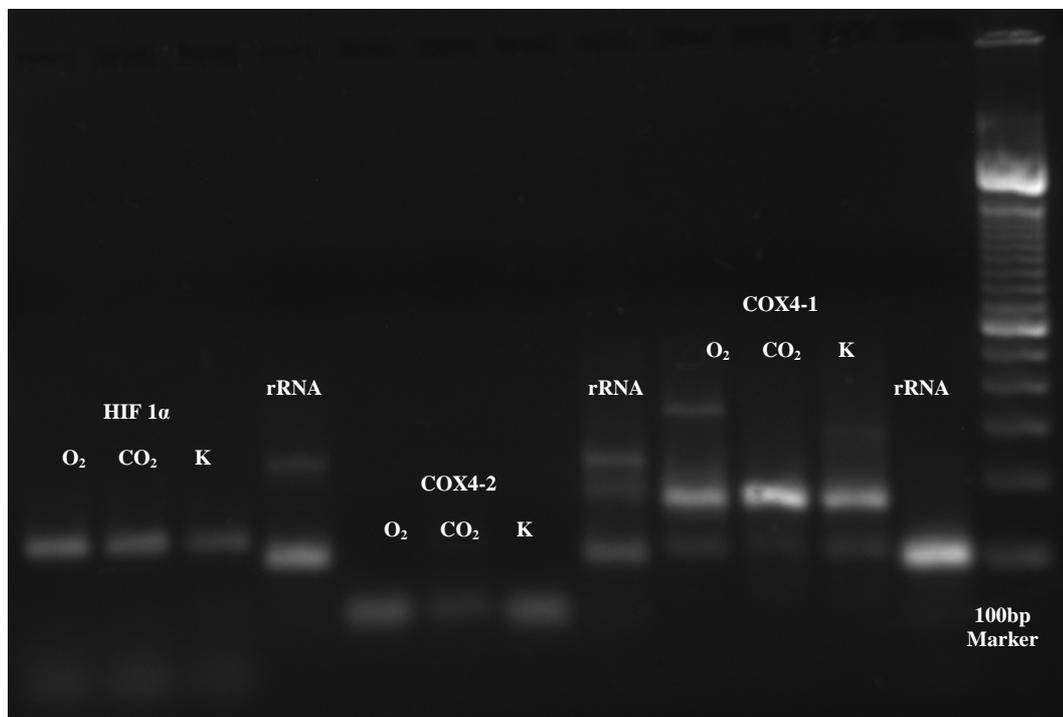


Abb. 7: Agarosegelelektrophorese der RT-PCR-Amplifikate. Es sind nach Abschluss der Schmelzkurve stabile Amplifikate entstanden.

IV. ERGEBNISSE

1. Hyperoxische Reoxygenierung von Kardiomyozyten

1.1. Reduktion des pH-Wert des Zellmediums nach hyperoxischer Reoxygenierung

Die Versuche von Cohen *et al.* (2007) zeigten, dass die Aufrechterhaltung der Gewebeazidose während der Reperfusion kardioprotektiv ist.

Wir untersuchten daher den pH-Wert des Zellmediums nach 4-stündiger Ischämie und 30 Minuten nach Reoxygenierung unter normoxischen (N) beziehungsweise hyperoxischen (O₂) Bedingungen.

Wie in Abb. 8 dargestellt, ist der pH-Wert der hyperoxisch reoxygenierten (O₂) Herzmuskelzellen mit 31% (\pm 31%) signifikant reduziert im Vergleich zu den normoxisch reoxygenierten (N) (100% \pm 3%) HCM.

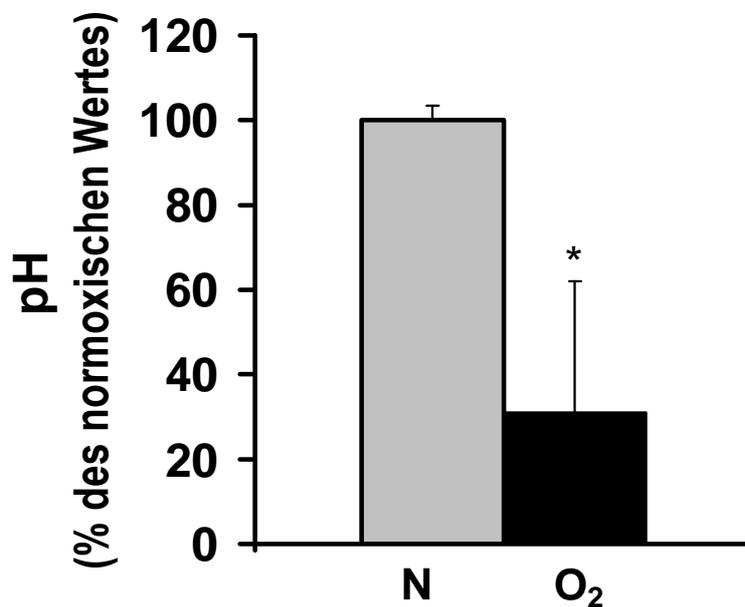


Abb. 8: pH-Wert des Zellmediums nach Reoxygenierung unter Sauerstoff-vermittelter Hyperoxie. Unter Hyperoxie reoxygenierte Kardiomyozyten (O₂) weisen nach 4h Hypoxie und 30 min nach Reoxygenierung einen reduzierten pH-Wert von 31% (\pm 31%) im Vergleich zur normoxischen Reoxygenierung (N) auf. Die Daten sind in % und im Vergleich zur normoxischen Reoxygenierung angegeben. Der pH-Wert der normoxischen Reoxygenierung ist auf 100% gesetzt (\pm 3%, n=3). * = p < 0,05

1.2. Verminderte Expression der normoxischen COX4-1 Untereinheit der Cytochrom C Oxidase nach hyperoxischer Reoxygenierung

Die Regulation der COX4 Untereinheiten ist ein wichtiger Bestandteil der Anpassung an ischämische Bedingungen. Die COX4-1-Isoform gilt hierbei im Vergleich zu COX4-2 als weniger energieeffiziente Isoform, die unter aeroben Bedingungen exprimiert und unter ischämischen durch LON degradiert wird (Fukuda *et al.*, 2007).

Nach 4-stündiger Ischämie und 15 Minuten nach hyperoxischer (O_2) beziehungsweise normoxischer Reoxygenierung (N) wurde die RNA mit Trizol lysiert und mittels *real time* PCR quantifiziert.

Es zeigte sich bei den hyperoxisch mit O_2 reoxygenierten humanen Kardiomyozyten (CO_2) eine signifikant gesteigerte Expression von COX4-1 auf RNA-Ebene auf 1212% (\pm 991%) im Vergleich zu den normoxisch reoxygenierten (N) (100% \pm 92%) (Abb. 9).

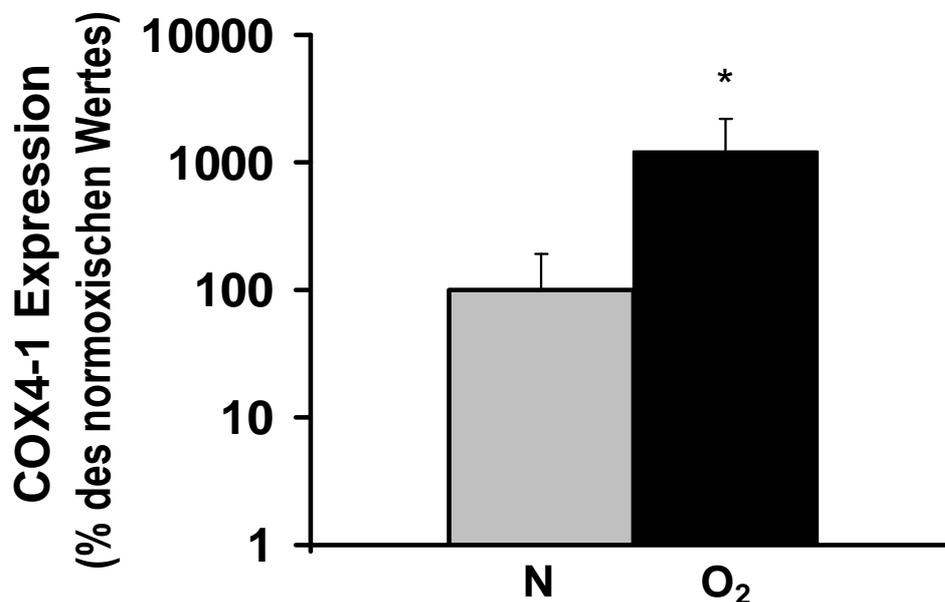


Abb. 9: Expression COX4-1 nach hyperoxischer und normoxischer Reoxygenation. Die mittels *real time* PCR quantifizierte RNA weist eine deutliche Hochregulation der hyperoxisch reoxygenierten Kardiomyozyten (O_2) auf 1212% (\pm 991%) im Vergleich zur normoxischen Reoxygenierung (N) auf. Die Daten sind angegeben in % und im Vergleich zur normoxischen Reoxygenierung. Die Expression von COX4-1 der normoxischen Reoxygenierung ist auf 100% gesetzt (\pm 92%, n=3). * = p <0,05

1.3. Regulation der ischämischen COX4-2 Untereinheit der Cytochrom C Oxidase nach hyperoxischer Reoxygenierung

Fukuda *et al.* (2007) konnten in ihren Versuchen an verschiedenen Säugetierzellen nachweisen, dass die ischämische, energieeffizientere Isoform COX4-2 der COX4 Untereinheit der Cytochrom C Oxidase unter Ischämie vermehrt exprimiert wird.

Uns interessierte nun wie diese Isoform in unserem Zellmodell reguliert wird. Hierzu untersuchten wir, unter den gleichen Versuchsbedingungen wie bei COX4-1, die Expression von COX4-2 nach 4-stündiger Ischämie und 15 Minuten nach hyperoxischer (O₂) beziehungsweise normoxischer Reoxygenierung (N).

Die Ergebnisse der quantitativen PCR zeigen eine Hochregulation der hyperoxisch O₂-reoxygenierten COX4-2 Expression auf 249% (\pm 248%) im Vergleich zur COX4-2 Expression in normoxisch reoxygenierten humanen Kardiomyozyten (100% \pm 100%) (Abb. 10).

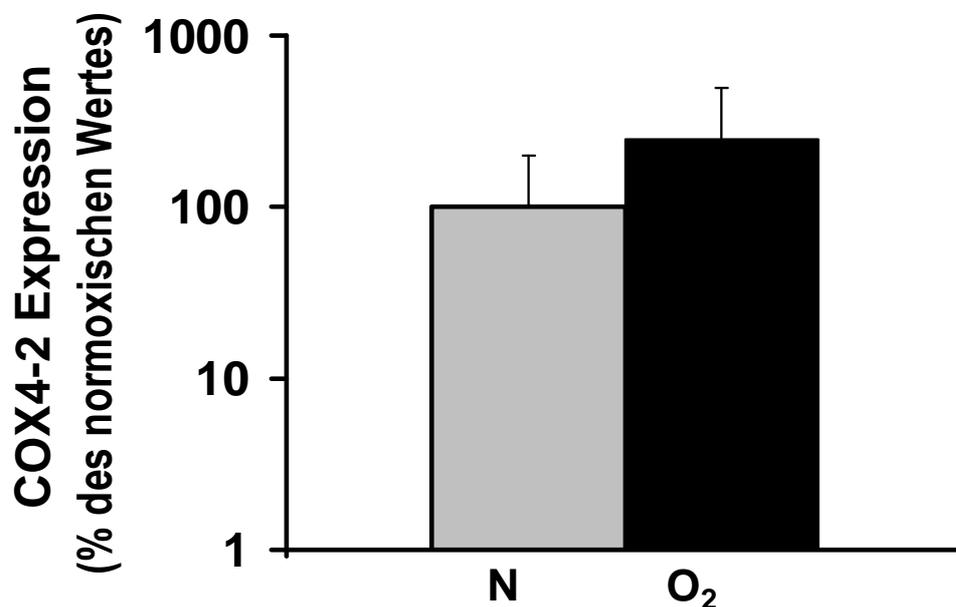


Abb. 10: Expression von COX4-2 nach hyperoxischer und normoxischer Reoxygenierung. Die Quantifizierung durch *real time* PCR zeigt unter hyperoxischer Reoxygenierung (O₂) eine deutliche Hochregulation um das etwa 2,5-fache auf 249% (\pm 248%) im Vergleich zur normoxischen Reoxygenierung (N). Die Daten sind angegeben in % und im Vergleich zur normoxischen Reoxygenierung. Die Expression von COX4-2 der normoxischen Reoxygenierung ist auf 100% gesetzt (\pm 100%, n=3).

1.4. Vermehrte Expression von HIF 1 α nach hyperoxischer Reoxygenierung

HIF 1 α ist das sauerstoffregulierte Protein des HIF 1-Heterodimers. Unter hypoxischen Bedingungen liegt HIF 1 α in der nicht hydroxylierten, aktiven Form vor und zeigt somit die Anpassung des Organismus an die Hypoxie und die damit verbundene effektivere Nutzung der Atmungskette an (Semenza et al., 1996; Iyer et al., 1998; Seagroves et al., 2001).

Nach 4-stündiger Hypoxie und 15 Minuten nach Reoxygenierung unter normoxischen (N) beziehungsweise hyperoxischen Bedingungen (O₂) wurde die HIF 1 α -Expression quantifiziert. Hyperoxisch reoxygenierte Herzmuskelzellen zeigen eine signifikant gesteigerte Expression von HIF 1 α auf 42878028% (\pm 42834599%) im Vergleich zu den normoxisch reoxygenierten (100% \pm 43%) (Abb. 11).

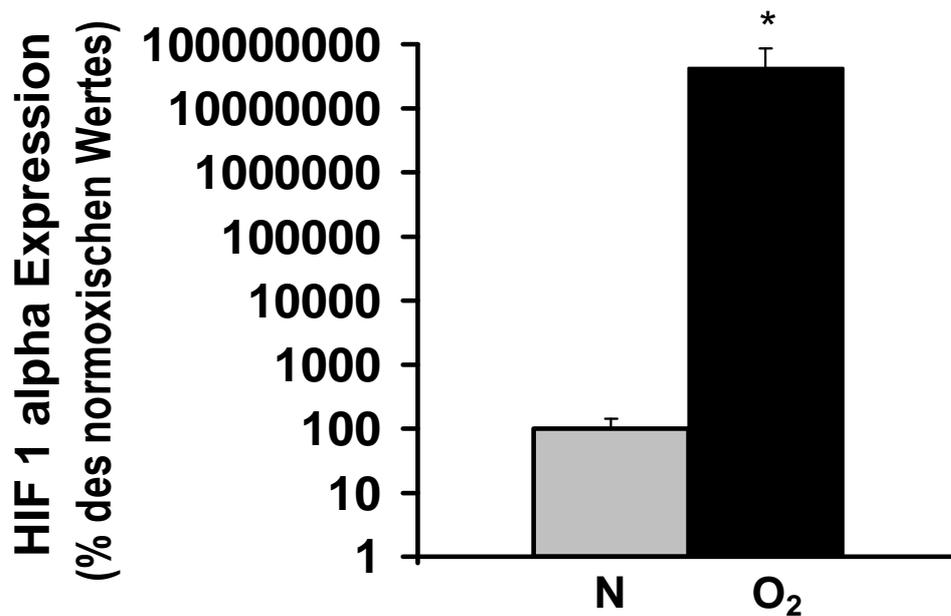


Abb. 11: Expression von HIF 1 α nach hyperoxischer und normoxischer Reoxygenierung. Die Quantifizierung durch *real time* PCR zeigt unter hyperoxischer Reoxygenierung eine deutliche Hochregulation auf 42878028% (\pm 42834599%) im Vergleich zur normoxischen Reoxygenierung. Die Daten sind angegeben in % im Vergleich zur normoxischen Reoxygenierung. Die Expression von HIF 1 α der normoxischen Reoxygenierung ist auf 100% gesetzt (\pm 43%, n=3). * = p < 0,05

2. Ischämische Reoxygenierung von Kardiomyozyten

2.1. Reduktion des pH-Wert des Zellmediums nach CO₂-vermittelter ischämischer Reoxygenierung

Nachdem wir zeigen konnten, dass der pH-Wert des Zellmediums nach hyperoxischer Reoxygenierung im Vergleich zur Normoxie signifikant abnimmt, untersuchten wir den pH-Wert des Zellmediums nach 4-stündiger Ischämie und 30 Minuten nach CO₂-vermittelter Reoxygenierung (CO₂) im Vergleich zur Reoxygenierung unter normoxischen Bedingungen (N).

Wie in Abb. 12 dargestellt, ist der pH-Wert der ischämisch reoxygenierten (CO₂) mit 28% ($\pm 17\%$) signifikant reduziert im Vergleich zu den normoxisch reoxygenierten (N) (100% $\pm 3\%$) HCM.

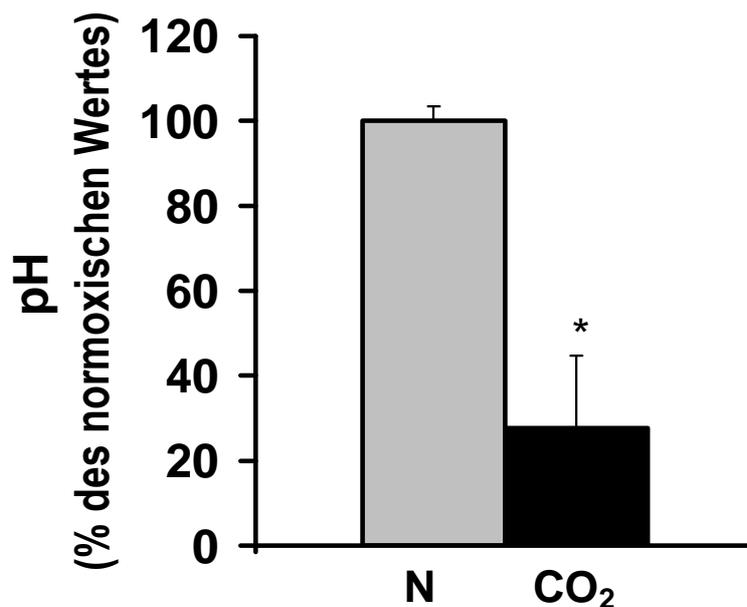


Abb. 12: pH-Wert des Zellmediums nach ischämischer und normoxischer Reoxygenierung. Unter passagerer Ischämie reoxygenierte Kardiomyozyten (CO₂) weisen 30 min nach Reoxygenierung mit 28% ($\pm 17\%$) einen reduzierten pH-Wert im Vergleich zur normoxischen Reoxygenierung (N) auf. Die Daten sind angegeben in % und im Vergleich zur normoxischen Reoxygenierung. Der pH-Wert der normoxischen Reoxygenierung ist auf 100% gesetzt ($\pm 3\%$, n=3). * = p < 0,05

2.2. Regulation der normoxischen COX4-1 nach ischämischer Reoxygenierung

Da wir bereits anhand unseres Zellmodells auf RNA-Ebene zeigen konnten, dass die COX4-1-Isoform nach hyperoxischer Reoxygenierung vermehrt exprimiert wird, untersuchten wir auch die Auswirkung von ischämischer Reoxygenierung auf das Expressionsverhalten der normoxischen Isoform COX4-1.

Zu diesem Zweck untersuchten wir mittels quantitativer PCR die Auswirkungen auf das Expressionsverhalten von COX4-1 nach 4-stündiger Ischämie und 15 Minuten nach ischämischer Reoxygenierung (CO₂) im Vergleich zur Normoxie (N).

Es zeigte sich eine insignifikant verringerte Expression von COX4-1 auf RNA-Ebene bei den ischämisch mit CO₂ reoxygenierten humanen Kardiomyozyten (CO₂) auf 18% ($\pm 15\%$) im Vergleich zu den normoxisch reoxygenierten (N) (100% $\pm 92\%$) (Abb. 13).

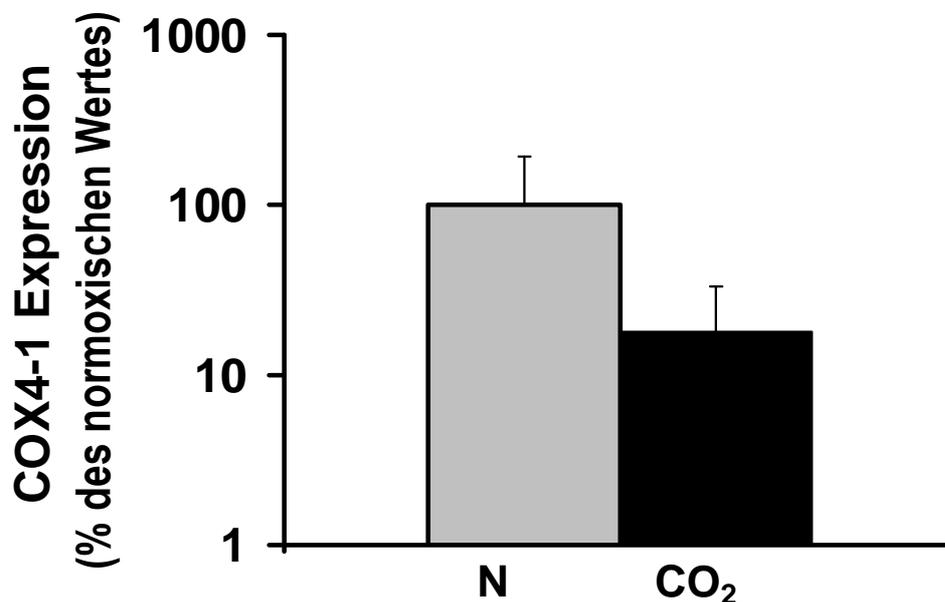


Abb. 13: Expression von COX4-1 nach ischämischer Reoxygenierung im Vergleich zur Normoxie. Die Quantifizierung durch *real time* PCR zeigt unter ischämischer Reoxygenierung (CO₂) eine signifikant verminderte Expression von COX4-1 auf 18% ($\pm 15\%$) im Vergleich zur normoxischen Reoxygenierung (N). Die Daten sind angegeben in % und im Vergleich zur normoxischen Reoxygenierung. Die Expression der COX4-1 der normoxischen Reoxygenierung ist auf 100% gesetzt ($\pm 92\%$, n=3).

2.3. Vermehrte Expression von COX4-2 nach ischämischer Reoxygenierung

Vergleichend zu unseren Versuchen zur Auswirkung der Reoxygenierung unter Sauerstoffvermittelter Hyperoxie auf das Expressionsverhalten der COX4-2 auf RNA-Ebene, untersuchten wir auch die Auswirkung unter ischämischen Bedingungen.

Die Ergebnisse der quantitativen PCR zeigen eine deutliche Hochregulation der ischämisch CO₂-reoxygenierten (CO₂) COX4-2 Expression auf 7649192% (\pm 3077554%) im Vergleich zur COX4-2 Expression in normoxisch reoxygenierten (N) humanen Kardiomyozyten (100% \pm 100%) (Abb. 14).

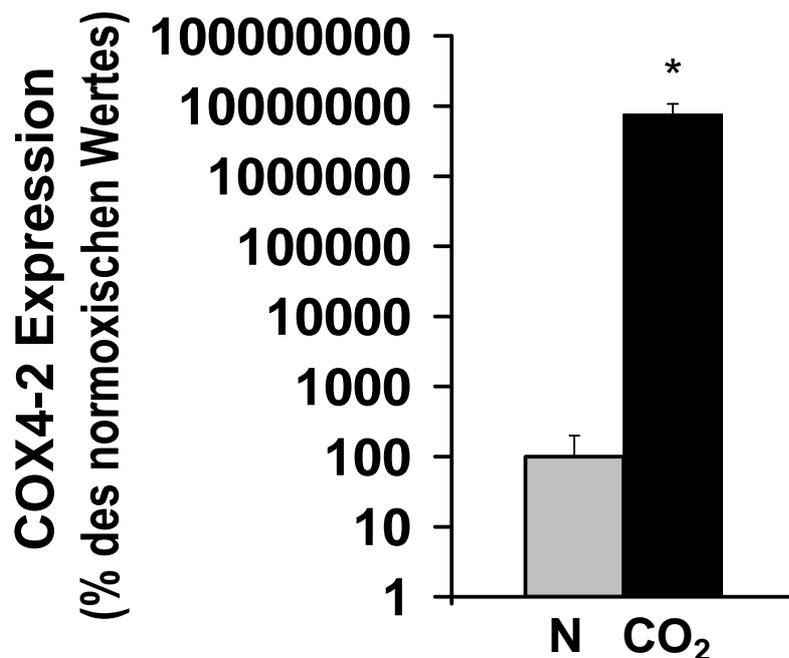


Abb. 14: Expression der ischämischen COX4-2 nach ischämischer und normoxischer Reoxygenierung. Die Quantifizierung durch *real time* PCR weist unter ischämischer Reoxygenierung (CO₂) eine deutlich vermehrte Regulation von COX4-2 auf 7649192% (\pm 3077554%) im Vergleich zur normoxischen Reoxygenierung (N). Die Daten sind angegeben in % und im Vergleich zur normoxischen Reoxygenierung. Die Expression der COX4-2 nach normoxischer Reoxygenierung ist auf 100% gesetzt (\pm 100%, n=3). * = p <0,05

2.4. Verminderte Expression von HIF 1 α nach ischämischer Reoxygenierung

Wir untersuchten die Expression von HIF 1 α nach ischämischer Reoxygenierung unter den gleichen Bedingungen wie bei der hyperoxischen Reoxygenierung.

Die HIF 1 α -Expression der ischämisch reoxygenierten (CO₂) Herzmuskelzellen nahm auf 1% (\pm 1%) im Vergleich zu den normoxisch (N) reoxygenierten (100% \pm 43%) ab (Abb. 15).

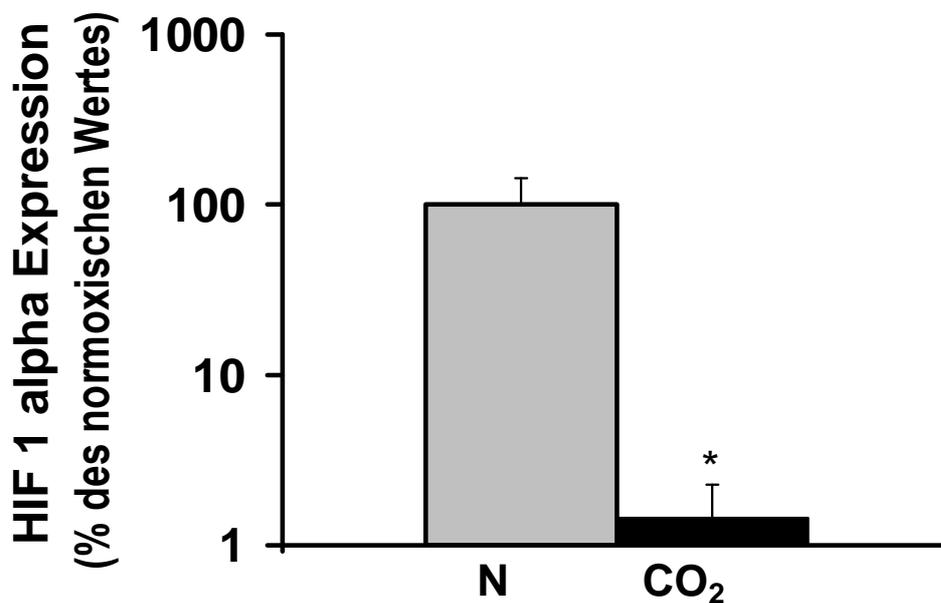


Abb. 15: Expression von HIF 1 α nach ischämischer Reoxygenierung in % des normoxischen Wertes. Die Quantifizierung durch *real time* PCR zeigt unter ischämischer Reoxygenierung (CO₂) eine deutliche Runterregulation von HIF 1 α auf 1% (\pm 1%) im Vergleich zur normoxischen Reoxygenierung (N). Die Daten sind angegeben in % im Vergleich zur normoxischen Reoxygenierung. Die Expression von HIF 1 α der normoxischen Reoxygenierung ist auf 100% gesetzt (\pm 43%, n=3). * = p <0,05

2.5. Stabilisierung der mitochondrialen Permeabilitäts-Transitions-pore nach ischämischer Reoxygenierung

Da die Stabilisierung der mPTP als ein Bestandteil der Kardioprotektion gilt (Crompton *et al.*, 1987; Crompton, 1999; Hausenloy *et al.*, 2002; Hausenloy *et al.*, 2003; Gomez *et al.*, 2007; Lim *et al.*, 2007), war es ein Ziel unserer Arbeit zu untersuchen, ob durch ischämische Postkonditionierung eine Resistenz-erhöhung gegenüber Calcium erreicht werden kann.

Die HCM wurden nach 4-stündiger Ischämie für 1 Stunde normoxisch (N) beziehungsweise ischämisch reoxygeniert (CO₂). Danach erfolgte die Mitochondrienextraktion.

Die Ergebnisse der CRC-Versuche zeigen, dass die Mitochondrien sowohl der normoxisch als auch der ischämisch reoxygenierten HCM Ca²⁺ abpuffern und damit die Calciumschwankungen dämpfen. Ab einer Ca²⁺-Konzentration von etwa 30 nmol/l (=10. Calciumbeladung) reagieren die normoxisch reoxygenierten jedoch mit einer Calciumentladung. Abb. 16 verdeutlicht, dass die Mitochondrien der ischämisch reoxygenierten die wiederholten Calciumreize weiterhin abpuffern, wohingegen die normoxisch reoxygenierten mit einer Calciumentladung reagieren. Die Calciumentladung geht mit einer Öffnung der mPTP einher (Icha *et al.*, 1994; Fontaine *et al.*, 1998).

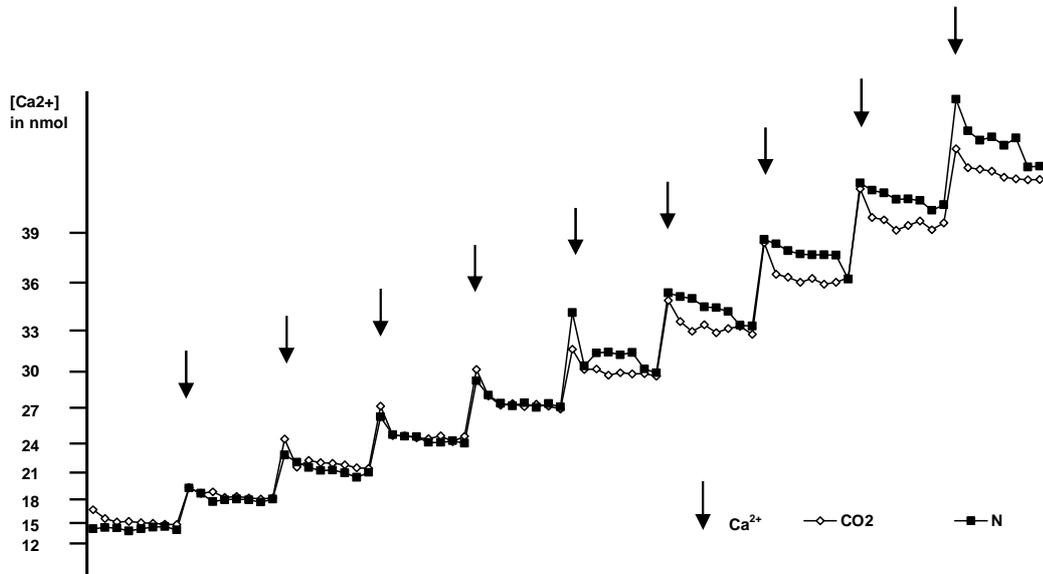


Abb. 16: Messung der mitochondrialen *Calcium Retention Capacity*. Die ischämische Reoxygenierung (CO₂) erzielte im Vergleich zur Normoxie (N) eine Stabilisierung der mPTP gegenüber Calcium. Ab einer Calciumkonzentration von [Ca²⁺] = 30 nmol/l reagiert die Normoxie mit einer Calciumentladung, die ischämisch reoxygenierten Mitochondrien puffern Calcium weiterhin ab.

Die Stabilität der mPTP wird durch die ischämische Reoxygenierung mindestens um das 3-fache im Vergleich zur normoxischen Reoxygenierung gesteigert (Abb. 17).

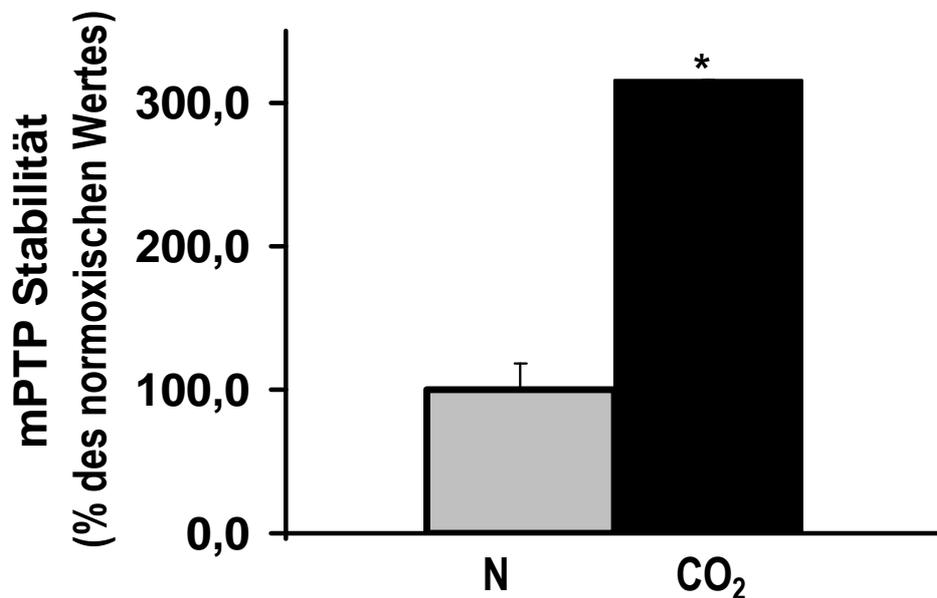


Abb. 17: mPTP-Stabilität nach ischämischer und normoxischer Reoxygenierung. Die ischämische Reoxygenierung erhöht die mPTP-Stabilität um das etwa 3-fache auf 316% (\pm 0%) im Vergleich zur normoxischen Reoxygenierung. Die Daten sind angegeben in % im Vergleich zur normoxischen Reoxygenierung. Die mPTP-Stabilität der normoxischen Reoxygenierung ist auf 100% gesetzt (\pm 18%, n=3). * = p < 0,05

V. DISKUSSION

1. Konzentrationserhöhung der Atemgase Sauerstoff und Kohlenstoffdioxid als Therapiemöglichkeit beim Myokardinfarkt

Im Rahmen dieser Arbeit war es ein wichtiges Ziel, die Effekte einer Erhöhung der Konzentration der Atemgase Sauerstoff und Kohlenstoffdioxid zu untersuchen. Die Wirkung des hyperoxischen Sauerstoff in der Therapie des Myokardinfarkts wird schon seit ungefähr 20 Jahren untersucht. Bei den ersten Versuchen zur therapeutischen Verabreichung von an PFC-gebundenen, hyperoxischen Sauerstoff konnte eine signifikante Reduktion der Infarktgröße gezeigt werden (Kent *et al.*, 1990; Forman *et al.*, 1991). Im Rahmen weiterer Studien mit unterschiedlichen Applikationsformen und Dosierungen kam es zu widersprüchlichen Ergebnissen hinsichtlich der Reduktion der Infarktgröße und damit erschien die kardioprotektive Wirkung des Sauerstoffs fraglich (Wall *et al.*, 1994 b). Einen ersten Beitrag zur kardioprotektiven, wirkungslosen oder zelltoxischen Einordnung des Sauerstoffs, lieferten die Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe aus dem Jahr 2008 (Arab *et al.*, 2008). Es konnte in einem Zellmodell mit humanen Kardiomyozyten und der Applikation von verschiedenen an PFC-gebundenen Sauerstoffdosierungen gezeigt werden, dass die Sauerstoffwirkung dosisabhängig ist. Die optimale Dosis für die Kardioprotektion wird mit einer moderaten Hyperoxie mit einem $pO_2 \approx 300$ mmHg erreicht. Wird die Dosis weiter erhöht, wirkt Sauerstoff zelltoxisch (Arab *et al.*, 2008). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Vitalität der hyperoxisch reoxygenierten Kardiomyozyten vergleichbar mit der Vitalität nicht-ischämischer Zellen ist (Arab *et al.*, 2010). Um sicherzustellen, dass die beobachteten protektiven Effekte auf der Sauerstoffgabe und nicht auf der PFC-Gabe an sich beruhen, wurden Kontrollversuche mit alleinigem PFC durchgeführt. Die alleinige Gabe der Trägersubstanz hatte jedoch keine verbesserte Zellvitalität zur Folge, so dass deren Einfluss ausgeschlossen werden konnte (Arab *et al.*, 2008).

Ob Kohlenstoffdioxid im Rahmen der Herzinfarkttherapie über eine Erhöhung der Konzentration möglicherweise eine vergleichbare protektive Wirkung wie Sauerstoff entfalten kann, ist bisher unbekannt. Spiess (2009) verdeutlichte dieses

fehlende Wissen um Kohlenstoffdioxid mit folgendem Zitat: „Wir wissen nicht, ob ein gesteigerter CO₂-Fluss von Nutzen ist oder zu einer Beeinträchtigung bei Gesunden und Kranken führt. Wir wissen auch nicht, ob sich der CO₂-Fluss in verschiedenen Geweben unterscheidet.“

Von Lungenpatienten, die zum Beispiel aufgrund einer *chronic obstructiv pulmonary disease* (COPD), im arteriellen Blut einen dauerhaft erniedrigten Sauerstoffpartialdruck (Partialinsuffizienz: $p_aO_2 < 60 \text{ mmHg}$; $p_aCO_2 = 35-45 \text{ mmHg}$ =physiologisch) und im fortgeschrittenen Stadium auch einen erhöhten Kohlenstoffdioxidpartialdruck (Globalinsuffizienz: $p_aO_2 < 60 \text{ mmHg}$; $p_aCO_2 > 45 \text{ mmHg}$) haben, weiß man, dass die Steuerung der Atmung bei einer Globalinsuffizienz über den Sauerstoffpartialdruck und den pH-Wert reguliert wird und nicht wie beim (Lungen-)Gesunden vornehmlich über den Kohlenstoffdioxidpartialdruck. Dies deutet eine Anpassungsfähigkeit des Körpers an nicht physiologische, toxische Kohlenstoffdioxidpartialdrücke an. Ab p_aCO_2 -Werten $> 60-70 \text{ mmHg}$ kommt es zur Bewusstseinstrübung. Diese Beeinträchtigung des Bewusstseins durch Kohlenstoffdioxid wird auch als CO₂-Narkose bezeichnet und zur Betäubung vor der Schlachtung oder in Rahmen von Tierversuchen verwendet. Bei Patienten mit dauerhaft erhöhtem Kohlenstoffdioxidpartialdruck ist die Toleranz gegenüber toxisch erhöhtem CO₂-Partialdruck von $p_aCO_2 > 60-70 \text{ mmHg}$ auch nach oben verschoben. Die Bewusstseinsbeeinträchtigung tritt später ein.

In dieser Arbeit wurde nun zum ersten Mal mit humanen Zellen ein *in vitro* Modell etabliert, um den Einfluss einer erhöhten Kohlenstoffdioxidgabe während der Reperfusion auf kardioprotektive Mechanismen zu untersuchen. Dazu wurde das von Arab *et al.* (2008) etablierte Modell zur Hypoxie und die an PFC-gebundenen Sauerstoff-Reoxygenierung zunächst von der dort verwendeten Ischämiedauer von 12 Stunden auf eine kürzere Zeitdauer von 4 Stunden übertragen, wie es den klinischen Ergebnissen der ischämischen Postkonditionierung entspricht, die im dritten Abschnitt näher erläutert werden. Mit den in unserem Modell verwendeten Kohlenstoffdioxidkonzentrationen konnten wir eine Kardioprotektion auf Zell-, RNA- und Mitochondrienebene nachweisen.

Das heißt es gelang uns erstmals in einem humanen *in vitro* Modell, aufzuzeigen, dass eine erhöhte Menge von Kohlenstoffdioxid eine schützende Wirkung bei

Kardiomyozyten entfalten kann.

2. Kardioprotektion durch Azidose

Der kardioprotektive Effekt einer Azidose während der Hypoxie beziehungsweise der Reperfusion ist schon seit längerem bekannt. So konnten Bing *et al.* (1973) nachweisen, dass eine Azidose zur Zeit der Hypoxie die funktionelle Wiederherstellung des Herzmuskels während der Reoxygenierung verbessert. Nayler *et al.* (1979) konnten an isoliert perfundierten Kaninchenherzen den kardioprotektiven Effekt einer milden Azidose während der Hypoxie bestätigen.

Einige Jahre später wurde untersucht, ob auch eine Azidose während der Reperfusion einen vergleichbaren Effekt hat. Die ersten Versuche hierzu führten Kitakaze *et al.* (1988) an isoliert perfundierten Frettchenherzen durch. Sie konnten zeigen, dass eine transiente Azidose während der frühen Reperfusion das *myocardial stunning* verhindert.

Kitakaze *et al.* (1997) wiesen am Hundemodell nach, dass sowohl die respiratorische als auch die metabolische Azidose während der Reperfusion die Infarktgröße verringert.

Nachdem auch gezeigt werden konnte, dass eine Azidose während der Reperfusion einen kardioprotektiven Effekt hat, verglichen Cohen *et al.* (2007) diesen Effekt mit dem der Postkonditionierung. Sowohl die azide Reperfusion als auch die Postkonditionierung muss für mindestens 2 Minuten und zwar gleich zu Beginn der Reperfusion erfolgen, um einen ähnlichen, schützenden Effekt zu erzielen. Sie vermuten, dass die Zyklen der Postkonditionierung zwar genug Sauerstoff liefern, damit die Mitochondrien *reactive oxygen spezies* produzieren können, aber die Zeitdauer zu kurz ist um den pH-Wert zu normalisieren und somit eine verlängerte Azidose die mPTP-Öffnung verhindert.

Fujita *et al.* (2007) konnten in ihrem Modell nachweisen, dass Postkonditionierung über eine verlängerte, transiente Azidose während der Reperfusion zu einer Aktivierung von AKT und ERK und damit zu einer Reduktion der Infarktgröße führt. Durch die Gabe von Natriumhydrogencarbonat wurde der Effekt der Postkonditionierung aufgehoben und AKT und ERK wurden nicht aktiviert.

Es gibt weitere Hinweise, dass die Wirkung der Postkonditionierung durch eine

verlängerte Azidose während der Reperfusion erreicht wird. Ebenso wie eine verlängerte Azidose während der Reperfusion einen Calcium-*Overload* verhindert (Steenbergen *et al.*, 1977), reduziert auch die Postkonditionierung die intra- und extrazelluläre Calciumkonzentration (Sun *et al.*, 2005). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass eine verlängerte Azidose eine vermehrte NO-Freisetzung und eine verstärkte Wirkung von Adenosin zur Folge hat (Merrill *et al.*, 1978; Gurevicius *et al.*, 1995; Kitakaze *et al.*, 2001). Beides Effekte, die als kardioprotektiv gelten und deren Inhibition die durch Postkonditionierung vermittelte Kardioprotektion aufheben (Yang *et al.*, 2004; Kin *et al.*, 2005). Dies lässt den Schluss zu, dass die durch Postkonditionierung vermittelte Kardioprotektion durch eine verlängerte Azidose während der frühen Reperfusion vermittelt wird.

Auf diesen Ergebnissen aufbauend, untersuchten wir bei unseren Versuchen zunächst den pH-Wert des Zellmediums. Wir konnten dabei zeigen, dass sowohl die hyperoxische als auch die ischämische Postkonditionierung den pH-Wert im Vergleich zur normoxischen Reoxygenierung signifikant reduziert. Nach dem aktuellem Wissensstand müsste dieser Umstand eine Kardioprotektion, vermutlich über eine Inhibition der mPTP-Öffnung (Cohen *et al.*, 2007), zur Folge haben.

3. Die Postkonditionierung als Therapiemöglichkeit

Murry *et al.* (1986) beschrieben vor 25 Jahren als erste das Phänomen der ischämischen Präkonditionierung im Hundemodell. Es konnte gezeigt werden, dass kurze Reperfusions-Ischämiezyklen vor einer längeren Okklusion der Koronararterien nicht etwa das Ausmaß des Myokardinfarktes vergrößern, sondern die endogene Protektion triggern und dadurch die Infarktgröße drastisch reduzieren (Murry *et al.*, 1986). So faszinierend diese Erkenntnisse auch waren, sie waren klinisch nicht umsetzbar. Bei einem Patienten mit akutem Herzinfarkt (*acute myocardial infarction* = AMI) ist die Koronararterie zum Zeitpunkt der Einlieferung in ein Krankenhaus bereits verschlossen und damit die Möglichkeit einer Intervention vor der Okklusion nicht mehr gegeben.

Umso größer waren die Hoffnungen als Zhao *et al.* (2003) vor einigen Jahren nachweisen konnten, dass auch Ischämie-Reperfusionzyklen, die der Ischämie nachgeschaltet sind, kardioprotektiv wirken. Dieses Phänomen wurde, parallel zur Präkonditionierung, Postkonditionierung genannt. Da der protektive Effekt der Prä- und der Postkonditionierung ähnlich ist (Halkos *et al.*, 2004; Tsang *et al.*,

2004) und die Methode der Postkonditionierung klinisch umsetzbar ist, vor allem auch während der perkutanen transluminalen coronaren Angioplastie (PTCA), entwickelte sich ein großes Interesse an dieser Möglichkeit zur Kardioprotektion. Bei der PTCA kann durch die In- und Deflation des Angioplastie-Ballons nach der Wiederherstellung des Gefäßflusses der repetitive Gefäßverschluss der Postkonditionierung nachgeahmt werden.

Die Effekte der Postkonditionierung konnten inzwischen an verschiedenen Spezies bestätigt werden. Jedoch muss die Postkonditionierung unmittelbar nach der Reperfusion erfolgen, da ansonsten der Schutz ausgelöscht wird (Kin *et al.*, 2004 a; Yang *et al.*, 2004 a).

Staat *et al.* (2005) konnten die Wirkung der Postkonditionierung erstmals *in vivo* beim humanen akuten Herzinfarkt nachweisen. Es wurden Patienten in diese Studie aufgenommen, die innerhalb von 6 Stunden, nach dem Einsetzen von Brustschmerzen, vorgestellt worden waren. Durch 4 malige, jeweils 1-minütige De- und Inflation des PTCA-Ballons konnte die Infarktgröße um 36% reduziert werden. Die verminderte Infarktgröße wurde anhand der signifikant reduzierten Creatinin-Kinase (CK)-Freisetzung der Postkonditionierungs-Gruppe beurteilt.

Die verminderte CK-Freisetzung konnte auch in einer Studie bestätigt werden, in welcher die Unterschiede zwischen >4 Inflationen und <3 Inflationen untersucht wurden (Darling *et al.*, 2007).

Thibault *et al.* (2008) untersuchten die Langzeitwirkung der Postkonditionierung in einer klinischen Studie über den Zeitraum von einem Jahr. Sie konnten dabei zeigen, dass sich die Postkonditionierung dauerhaft positiv auf die Reduktion der Infarktgröße und auf die funktionelle Wiederherstellung des Myokards auswirkt.

Neben der oben beschriebenen ischämischen Postkonditionierung gibt es auch eine hyperoxische Postkonditionierung. Stone *et al.* (2009) führten eine klinische, prospektive Studie an Patienten durch, bei denen zwischen Symptombeginn und PTCA maximal 6 Stunden vergangen waren. In dieser Studie wurde der Sauerstoffpartialdruck des Blutes in einem extrakorporalem Kreislauf auf 760-1000 mmHg erhöht um anschließend das hyperoxemische Blut über einen intrakoronaren Katheter dem Kreislauf während einer Dauer von 90 Minuten wiederzuzuführen. Durch diese hyperoxische Behandlung konnte die Infarktgröße signifikant reduziert werden.

Es ist noch unbekannt, nach welcher Zeitdauer eine Intervention durch Postkonditionierung möglich ist (Tsang *et al.*, 2005). In den *in vivo* und *in vitro* Tiermodellen dauerte die Ischämie zwischen 30 und 180 Minuten. Die Algorithmen variierten stark: 2-20 Zyklen mit einer Dauer zwischen 5 und 60 Sekunden. Bei Zellkulturversuchen variierte die Ischämie zwischen 2 und 8 Stunden (Sun *et al.*, 2005; Sun *et al.*, 2006; Zhao *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2006) und die 2-3 Reperfusion-Ischämiezyklen hatten je eine Dauer von 5 Minuten. In die klinischen Studien zum humanen akuten Herzinfarkt wurden Patienten eingeschlossen, die innerhalb von 6 Stunden nach Einsetzen der Brustschmerzen in ein Krankenhaus eingeliefert worden waren (Staat *et al.*, 2005; Thibault *et al.*, 2008). Die hier zitierte große Variation sowohl der Ischämiedauer als auch der Anzahl und der Länge der Reperfusion-Ischämiezyklen verdeutlicht wie variabel die Postkonditionierung gestaltet werden kann.

Im Rahmen dieser Arbeit wollten wir unter anderem auch den Effekt der ischämischen Postkonditionierung untersuchen. Da uns die Ischämiedauer im bisher von Arab *et al.* (2008) verwendeten Modell zur Ischämie und Reoxygenierung für ein Modell der ischämischen Postkonditionierung zu lang erschien, reduzierten wir die Ischämiedauer von 12 auf 4 Stunden. Durch die 10-minütige Gabe von Kohlenstoffdioxid-gebundenem PFC zu Beginn der Reperfusion versuchten wir die Postkonditionierung nachzuahmen. Andere Arbeitsgruppen imitierten die Postkonditionierung in ihren Zellmodellen, indem sie zwischen einem hypoxischen einem normoxischen Inkubator wechselten (Sun *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2006).

Vergleicht man die Dauer der Reperfusionenzyklen, stellt man fest, dass in Versuchen mit Zellkulturen mit deutlich längeren Intervallen (5 Minuten) gearbeitet wird, als *in vivo* beziehungsweise am isoliert perfundiertem Herzen (5-60 Sekunden). Eine mögliche Erklärung für diese unterschiedliche Zeitdauer ist die deutlich langsamere Stoffwechselrate von Zellkulturen verglichen mit den *in vivo* und *in vitro* genutzten Herzen (Sun *et al.*, 2005).

Einen ersten Anhaltspunkt, ob unser Modell zur Postkonditionierung funktioniert, sollte uns die pH-Wert-Messung liefern. Eine verlängerte Azidose während der Reperfusion gilt als kardioprotektiv (Kitakaze *et al.*, 1988 und 1997) und dieser Effekt wird durch Postkonditionierung vermittelt (Cohen *et al.*, 2007; Fujita *et al.*, 2007). Wir konnten sowohl durch hyperoxischen Sauerstoff als auch durch

hyperkapnisches Kohlenstoffdioxid eine signifikante Reduktion des pH-Wertes in den eingesetzten Kardiomyozyten erreichen.

Diese Ergebnisse zeigen, dass unser Modell eine verlängerte Azidose während der Reperfusion zur Folge hat. Dies lässt eine protektive Wirkung möglich erscheinen.

4. Die Regulation der Untereinheiten der Cytochrom C Oxidase 4

Nachdem wir anhand der pH-Wert Messung einen kardioprotektiven Effekt unserer verschiedenen Postkonditionierungsmodelle vermuten konnten, stellte sich die Frage wie die COX4-Isoformen in unserem Modell auf RNA-Ebene reguliert werden.

Die sauerstoffabhängige Regulation der COX und die damit verbundenen Auswirkungen auf die Atmungskette wurden zunächst an der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* nachgewiesen. Die COX5 der Hefe hat zwei Isoformen, COX5a und COX5b, die den Isoformen COX4-1 und COX4-2 der Säugetiere ähneln (Burke *et al.*, 1998). Bei guter Sauerstoffversorgung wird COX5a vermehrt exprimiert, die Expression von COX5b hingegen unterdrückt. Unter Ischämie verhält sich die Expression anders: die Transkription von COX5a wird unterdrückt und die Repression der COX5b wird aufgehoben (Lowry *et al.*, 1984; Forsburg *et al.*, 1989; Kwast *et al.*, 1998). Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass die vermehrt expremierte COX5b eine schnellere Elektronentransferrate und damit eine höhere Effizienz der Cytochrom C Oxidase und der gesamten Atmungskette zur Folge hat (Waterland *et al.*, 1991; Allen *et al.*, 1995).

Fukuda *et al.* (2007) untersuchten die Expression der entsprechenden Isoformen (COX4-1 und COX4-2) an unterschiedlichen Säugetierzellen. Sie wiesen nach, dass nach 24-stündiger Hypoxie sowohl bei menschlichen (Leber, Lunge, Colon, Uterus) als auch bei murinen Zellen (glatter Pulmonararterienmuskel) COX4-2 auf mRNA-Ebene exprimiert wird. COX4-1 wurde bei murinen glatten Pulmonalarterienmuskelzellen und bei humanen Uterus- und Leberzellen auf mRNA-Ebene nicht sauerstoffabhängig reguliert. Bei Mäusen, die einem 3-wöchigen Sauerstoffmangel ausgesetzt waren, wurde COX4-2 in Lunge und

Leber im Vergleich zu normalen Sauerstoffbedingungen vermehrt exprimiert, in Gehirn, Herz und Niere hingegen weniger. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die COX4-2 Induktion eine physiologische Antwort auf Hypoxie ist. Interessanterweise ließ sich in den Geweben, die COX4-2 unter Hypoxie vermehrt gebildet hatten, auch eine gesteigerte LON-Expression nachweisen. LON ist eine mitochondriale Protease, die durch Stress, Hypoxie und Ischämie des endoplasmatischen Retikulums aktiviert wird (Hori *et al.*, 2002). Den Versuchen von Fukuda *et al.* (2007) folgend wird unter Sauerstoffmangel HIF 1 aktiviert, das wiederum trägt zur gesteigerten Bildung von COX4-2 und LON bei. LON baut COX4-1 proteolytisch ab.

Unsere Arbeitsgruppe konnte bereits zeigen, dass in einem humanen *in vitro* Modell der hyperoxischen Postkonditionierung nach 12-stündiger Ischämie und 3 Stunden nach hyperoxischer Reoxygenierung HIF 1 α stabilisiert wird (Arab *et al.*, 2008). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Expression von COX4 im Vergleich zur normoxischen Reperfusion signifikant abnimmt (Arab *et al.*, 2010).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Expression der COX4-1 nach 4-stündiger Ischämie und 15 Minuten nach hyperoxischer Reoxygenierung untersucht. Mittels quantitativer RT-PCR konnten wir zeigen, dass unter diesen Bedingungen COX4-1 im Vergleich zur normoxischen Reoxygenierung signifikant hochreguliert wird. Interessanterweise wurde COX4-2, dessen Induktion als physiologische Antwort auf Sauerstoffmangel gilt, unter den gleichen Bedingungen ebenfalls vermehrt exprimiert.

Vergleichend dazu untersuchten wir zum gleichen Zeitpunkt die Regulation der COX4-Isoformen nach ischämischer Postkonditionierung. Hierbei ergab sich eine tendenziell verminderte Expression der COX4-1 und eine signifikante Hochregulierung der COX4-2.

Damit konnten wir auf der Ebene der RNA analog zu den Ergebnissen von Fukuda *et al.* (2007) bestätigen, dass eine Ischämie die vermehrte Expression von COX4-2 zur Folge hat.

Die Differenz hinsichtlich der signifikant hochregulierten COX4-1 nach hyperoxischer Reoxygenierung im Vergleich zu den Ergebnissen von Fukudas Arbeitsgruppe kann verschiedene Gründe haben. Bei Fukuda *et al.* (2007) wurde die Expression von COX4-1 unter ischämischen Bedingungen untersucht. Wir

hingegen legten Wert auf die Expression nach einer transienten Ischämie und nach einer erfolgten hyperoxischen Reoxygenierung. So könnte der unterschiedliche Zeitpunkt (während der Ischämie oder nach der Reoxygenierung) der RNA-Extraktion als auch die Ischämiedauer (24 Stunden im Vergleich zu 4 Stunden) eine wichtige Rolle spielen. Fukada *et al.* (2007) konnten nachweisen, dass bei murinen, glatten Pulmonalarterienzellen und bei humanen Leber- und Lungenzellen COX4-1 nicht sauerstoffabhängig exprimiert wird. Einen Hinweis darauf, dass COX4 auch in humanen Kardiomyozyten sauerstoffabhängig reguliert wird, geben uns die Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe aus dem Jahr 2010 (Arab *et al.*, 2010). Der Unterschied zwischen der Expression von COX4 nach 12-stündiger Ischämie und 3 Stunden nach hyperoxischer Reoxygenierung im Vergleich zur vermehrten Expression nach 4-stündiger Ischämie und 15 Minuten nach hyperoxischer Reoxygenierung hängen von der Dauer der Ischämie (12 Stunden im Vergleich zu 4 Stunden) und dem Einsetzen der Reoxygenierung ab. Es ergeben sich dadurch Hinweise darauf, dass nach einer kürzeren Ischämiezeit die protektiven Vorgänge weit schneller ablaufen als nach einer längeren Ischämie. Um die Unterschiede bezüglich der Ischämiedauer zu klären, laufen derzeit diesbezügliche Versuche in unserer Arbeitsgruppe.

Um zu bestätigen, dass COX4-1 nach einer 4-stündigen Ischämie zu einem anderen Zeitpunkt signifikant erniedrigt ist, bedarf es weiterer verlaufskinetischer Untersuchungen.

Wir konnten aber trotz der widersprüchlichen COX4-1-Ergebnisse zeigen, dass sowohl nach hyperoxischer als auch nach ischämischer Reoxygenierung COX4-2 vermehrt exprimiert wird und damit die Effizienz der Atmungskette gesteigert wird. Wir gehen davon aus, dass es sich hierbei um einen zentralen Regulationsmechanismus handelt.

5. Die Rolle von HIF 1 α und die Beeinflussung durch Postkonditionierung

Zhao *et al.* (2010) untersuchten die Auswirkung der Postkonditionierung auf die HIF 1 α -Expression im Rattenmodell. Es konnte auf Proteinebene gezeigt werden, dass die HIF 1 α -Expression nach 30-minütiger Ischämie und 3 Zyklen Postkonditionierung von je 10 Sekunden und 3 Stunden nach der Reperfusion um das 5,8-fache ansteigt und zwar im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, bei der

auf die 30 Minuten Ischämie direkt die 3 Stunden Reperfusion folgten. Die Infarktgröße war bei den postkonditionierten Herzen um 24% kleiner als bei denen der Kontrolle. Durch eine zusätzliche pharmakologische Präkonditionierung mit DMOG, einem Prolylhydroxylase-Inhibitor, der den Abbau von HIF 1 α verhindert, 24 Stunden vor der Ischämie, konnte sowohl die HIF 1 α -Expression gesteigert als auch die Infarktgröße reduziert werden. Zhao *et al.* (2009) konnten die Wirkung der Postkonditionierung auch an hyperlipämischen Ratten zeigen. Dieser Kardioprotektion lag ebenfalls eine gesteigerte HIF 1 α -Expression zu Grunde (Zhao *et al.*, 2009). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Hyperlipidämie selbst auch eine gesteigerte HIF 1 α -Expression induziert, die durch Ischämie und Reperfusion weiter gesteigert werden kann. Die gesteigerte HIF 1 α -Expression durch Hyperlipidämie wurde auch von anderen Arbeitsgruppen beobachtet (Zhu *et al.*, 2004; Rodriguez *et al.*, 2005), der Wirkmechanismus bleibt jedoch noch unbekannt. Es wird zum einen vermutet, dass die gesteigerte HIF 1 α -Expression die myokardiale Gewebhypoxie widerspiegelt (Zhu *et al.*, 2004) und zum anderen, dass für die gesteigerte Expression nicht unbedingt hypoxische Bedingungen notwendig sind, sondern dass sie Teil der zellulären Kompensation von gesteigertem oxidativen Stress ist (Khatri *et al.*, 2004).

Fukuda *et al.* (2007) zeigten in ihrem Modell, dass unter hypoxischen Bedingungen HIF 1 α die Untereinheiten COX4-1 und COX4-2 reziprok reguliert, das heißt, die normoxische Isoform COX4-1 wird durch eine gesteigerte HIF-Expression degradiert, wohingegen die ischämische Isoform COX4-2 vermehrt exprimiert wird.

Arab *et al.* (2008; 2010) konnten in einem *in vitro* Zellmodell an humanen Kardiomyozyten mit 12-stündiger Ischämie zeigen, dass die Gabe von moderaten Dosen oxygenierten PFC während der Reoxygenierung die Stabilisierung von HIF 1 α und Degradierung von COX4 zur Folge hat.

Wir konnten in unserem Modell zeigen, dass bei hyperoxischer Reoxygenierung die Expression von HIF 1 α auf RNA-Ebene zunimmt und bei ischämischer Reoxygenierung abnimmt.

Eine mögliche Erklärung für die verminderte Expression von HIF 1 α in unserem Modell zur ischämischen Postkonditionierung ist, dass wir die Expression von

HIF 1 α zu einem Zeitpunkt gemessen haben könnten, bei dem der HIF 1 α -Peak bereits vorbei ist oder noch bevor steht. Um dies zu klären bedarf es kinetischer Verlaufsuntersuchungen. Zhao *et al.* (2010) untersuchten die HIF 1 α -Expression in ihrem Modell nach einer deutlich kürzeren Ischämie (30 Minuten im Vergleich zu 4 Stunden) und nach einer deutlich längeren Reoxygenierung (3 Stunden im Vergleich zu 15 Minuten). Auch dies bietet Ansätze für mögliche Erklärungen.

Fukuda *et al.* (2007) untersuchten die Expression unter 24-48-stündiger Hypoxie. Wir hingegen die Expression nach 4-stündiger Hypoxie und 15 Minuten nach Reoxygenierung. Sowohl die unterschiedliche Zeitdauer als auch der Zeitpunkt der Expressionsbestimmung –unter Hypoxie oder nach der Reoxygenierung– bieten Ansätze für eine mögliche Erklärung der Differenz. Zudem ist es möglich, dass sich das Expressionsverhalten verschiedener Zellen unterscheidet und, dass auf die Konzentrations-Erhöhung der Atemgase, Sauerstoff und Kohlenstoffdioxid, während der Reoxygenierung zwar unterschiedlich reagiert wird, es aber dennoch zu einer Kardioprotektion kommt.

6. Stabilisierung der mitochondrialen Permeabilitäts-Transitions-pore durch ischämische Postkonditionierung

Vor dem Hintergrund des von Cohen *et al.* (2007) beschriebenen Zusammenhangs zwischen der durch Postkonditionierung erreichten Azidose und der Inhibition der mPTP-Öffnung, galt unser Interesse auch der mPTP. Ihre Stabilisierung diene uns als Nachweis eines kardioprotektiven Effekts auf mitochondrialer Ebene.

Während Ischämie und Reperfusion werden extrazellulär und intrazellulär Bedingungen geschaffen (Halestrap *et al.*, 1998; Yellon *et al.*, 2007), die zur Öffnung der mPTP während der frühen Reperfusion führen (Griffith *et al.*, 1995; Qian *et al.*, 1997). Die Öffnung der mPTP findet während der frühen Reperfusion statt, also in dem gleichen Zeitfenster indem auch die ischämische Postkonditionierung kardioprotektiv wirkt.

Argaud *et al.* (2005 a) konnten im Kaninchenmodell zeigen, dass sowohl Präkonditionierung als auch Postkonditionierung und der spezifische mPTP-Inhibitor NIM811 die Infarktgröße ähnlich reduzierten. Basierend auf der Arbeit von Ichas *et al.* (1994) entwickelten Argaud *et al.* (2005 b) ein Modell zur Quantifizierung des Calcium-Überschusses, der zur Öffnung der mPTP führt.

Dazu wurden Kaninchenherzen *in vivo* vor beziehungsweise nach der Ischämie prä- beziehungsweise postkonditioniert und anschließend die Mitochondrien *in vitro* wiederholten CaCl_2 -Reizen ausgesetzt. Dabei konnte gezeigt werden, dass die prä- und postkonditionierten Mitochondrien erst bei deutlich höheren CaCl_2 -Beladungen mit einer Öffnung der mPTP und damit mit einer Calciumentladung der intramitochondrialen Speicher reagieren (Präkonditionierung $12 \times 20 \mu\text{M}$ CaCl_2 ; Postkonditionierung $12 \times 20 \mu\text{M}$ CaCl_2 ; Kontrolle $4 \times 20 \mu\text{M}$ CaCl_2).

Einen weiteren Hinweis auf den Zusammenhang zwischen Inhibition der mPTP-Öffnung und der durch Postkonditionierung vermittelten Kardioprotektion, brachte ein Versuch, bei dem die durch Postkonditionierung erreichte Infarktreaktion bei Wildtyp-Mäusen mit der von Mäusen verglichen wurden, bei denen eine regulatorische Untereinheit der mPTP, Cyclophilin-D, ausgeschaltet worden war. Bei den Cyclophilin-D *Knock-out*-Mäusen konnte durch Postkonditionierung keine Infarktreaktion erreicht werden. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die mPTP eine Schlüsselrolle bei der Infarktreaktion durch Postkonditionierung spielt (Lim *et al.*, 2007).

In den Versuchen von Gomez *et al.* (2007) wurde die Calcium-Retentionskapazität (CRC) von Postkonditionierung und von Debio-025, einem mPTP-Inhibitor, miteinander und mit einer Kontrolle verglichen. Es zeigte sich, dass Postkonditionierung und Debio-025 zu einer ähnlichen, gesteigerten Resistenz gegenüber wiederholten Calciumreizen führen (Gomez *et al.*, 2007).

Bei unseren Versuchen zur ischämischen Postkonditionierung mit erhöhten Kohlenstoffdioxidkonzentrationen isolierten wir die Mitochondrien und setzen sie wiederholten Calciumreizen aus. Um eine mögliche Calciumentladung sichtbar zu machen, verwendeten wir den Fluoreszenzfarbstoff *Calcium-Green*. Damit konnten wir zeigen, dass die ischämisch postkonditionierten Mitochondrien eine etwa 3-fach gesteigerte Stabilität gegenüber Calciumreizen im Vergleich zu den normoxisch reoxygenierten hatten. Die Normoxiegruppe reagierte bei der 10. Calciumbeladung mit einer calciuminduzierten Calciumfreisetzung aus den intramitochondrialen Speichern, mit der die Öffnung mPTP einhergeht.

Wir können –wie auch die Ergebnisse von Argaud *et al.* (2005 a), Lim *et al.* (2007) und Gomez (2007) zeigen– bestätigen, dass die ischämische Postkonditionierung eine erhöhte Calciums-Retentionskapazität und damit auch

eine Stabilisierung der mPTP zur Folge hat. Auch den von Cohen *et al.* (2007) beschriebenen Zusammenhang zwischen Azidose und mPTP konnten wir in unserem Modell sehen.

Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass die mittels einer Erhöhung der Kohlenstoffdioxidkonzentration erzielte ischämische Postkonditionierung in unserem *in vitro*-Modell über eine Stabilisierung der mPTP kardioprotektiv wirkt.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Da die humane koronare Herzkrankheit eine der häufigsten Todesursachen in den Industrienationen darstellt, gibt es vielfältige Bestrebungen deren Therapie zu optimieren. Die möglichst schnelle Rekanalisierung des betroffenen Gefäßes ist bis heute die Therapie der Wahl. Ein Hauptaugenmerk der Forschungsarbeiten liegt aber auch auf der Verminderung des Reperfusionsschadens, da dieser einen beträchtlichen Teil der Infarktgröße ausmachen kann. Durch Interventionen wie der hyperbaren Sauerstofftherapie und der Postkonditionierung wird versucht diesen Schaden zu minimieren.

Die Mitochondrien von Kardiomyozyten stehen im Mittelpunkt dieser Arbeit. Sie liefern als „Kraftwerke“ der Zelle neben Wärme auch metabolisch nutzbare Energie, indem sie Nährstoffe und andere Energieträger mittels Sauerstoff in die Energiespeicherform ATP umwandeln. Darüber hinaus wirken sie durch „Abpufferung“ der Calciumkonzentrationsschwankungen in der zellulären Calciumhomöostase mit. Auch bei der Vermittlung des Zelltodes nehmen sie eine wichtige Rolle ein. Nach aktuellen Forschungsergebnissen stellt die Öffnung der mPTP während der frühen Reperfusion einen entscheidenden Wendepunkt zwischen reversiblen und irreversiblen, letalen Reperfusionsschaden dar.

In unserem *in vitro* Modell mit hyperoxischer Reoxygenierung konnten wir einen kardioprotektiven Effekt zeigen, der sich durch eine verlängerte Azidose während der Reperfusion, durch eine verminderte COX4-1-Expression und durch eine deutlich gesteigerte Expression von COX4-2 darstellt. Vergleichend dazu konnten wir im selben Modell mit ischämischer Postkonditionierung ebenfalls eine verlängerte Azidose und eine deutlich vermehrte COX4-2-Expression nachweisen. Darüber hinaus fanden wir auch eine erhöhte Calciumretentionskapazität, die mit einer mPTP-Stabilisierung bei der durch Kohlenstoffdioxid-vermittelte Postkonditionierung einhergeht.

Durch die vorliegende Arbeit konnte damit erstmals eine durch erhöhte Kohlenstoffdioxidkonzentration erreichte Kardioprotektion aufgezeigt werden. Dies kann als wichtiger Beitrag zur Grundlagenforschung des Ischämie-Reperfusionsgeschehen im Allgemeinen und zur Therapie des menschlichen Herzinfarkts im Besonderen gesehen werden.

VII. SUMMARY

THE EFFECT OF INCREASING CO₂ LEVELS ON THE MITOCHONDRIAL PERMEABILITY TRANSITION PORE OPENING IN ISCHEMIC HUMAN CARDIOMYOCYTES

The human coronary heart disease is one of the most common causes of death in industrialized nations. This is the reason why there are many theories to optimize its treatment and therapy. The rapid recanalization of the affected vessel has been the treatment of choice to date. One of the main areas scientific research papers and projects have been focused on, is how to minimize the reperfusion injury, as it is a major determinant of the infarct size. Interventions such as hyperbaric oxygen therapy and postconditioning are attempts to minimize the reperfusion injury.

The main focus of this thesis is the mitochondria of human cardiomyocytes. These “cellular power plants” do not only create heat but also metabolic usable energy by converting nutrients and other energy sources, with the aid of oxygen, into the storage form ATP. Furthermore, they are a part of the calcium homeostasis mechanism, because they buffer variations in the levels of calcium. Additionally they play an important role in the mediation of cell death. According to current research findings the mPTP opening during the early reperfusion is a key point to determine if the reperfusion injury is reversible or irreversible and lethal.

Our *in vitro* model of hyperoxic reoxygenation showed a cardioprotective effect. This is established by a prolonged acidosis during the reperfusion, a reduced expression of COX4-1 and an increased expression of COX4-2. In comparison to this, the ischemic postconditioning model also showed a prolonged acidosis and an increased expression of COX4-2. Additionally there is a higher calcium retention capacity, which is associated with a stabilization of the mPTP through carbon dioxide postconditioning.

Our research showed for the first time that increased levels of carbon dioxide have a cardioprotective effect. This is an important contribution to the basic research of the ischemia-reperfusion and particularly to the therapy of the human coronary heart disease.

VIII. ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS

Abb. 1: Bedingungen, die zur Öffnung der mPTP unter Reperfusion führen (nach Halestrap *et al.*, 2004)

Abb. 2: Sauerstoffabhängige Regulation der COX-Untereinheiten nach Fukuda *et al.*, 2007.

Abb. 3: Mechanismen und Mediatoren des Reperfusionsschaden nach Verma *et al.*, 2002.

Abb. 4: Protokoll zur Prä- und Postkonditionierung nach Zhao *et al.*, 2003.

Abb. 5: Schematische Übersicht der Postkonditionierung nach Tsang *et al.*, 2004.

Abb. 6: Mitochondriale *Calcium Retention Capacity* –Messung im Rahmen der Vorversuche.

Abb. 7: Agarosegelelektrophorese der RT-PCR-Amplifikate.

Abb. 8: pH-Wert des Zellmediums nach Reoxygenierung unter Sauerstoffvermittelter Hyperoxie.

Abb. 9: Expression COX4-1 nach hyperoxischer und normoxischer Reoxygenation.

Abb. 10: Expression von COX4-2 nach hyperoxischer und normoxischer Reoxygenierung.

Abb. 11: Expression von HIF 1 α nach hyperoxischer und normoxischer Reoxygenierung.

Abb. 12: pH-Wert des Zellmediums nach ischämischer und normoxischer Reoxygenierung.

Abb. 13: Expression von COX4-1 nach ischämischer Reoxygenierung im Vergleich zur Normoxie.

Abb. 14: Expression der ischämischen COX4-2 nach ischämischer und normoxischer Reoxygenierung.

Abb. 15: Expression von HIF 1 α nach ischämischer Reoxygenierung in % des normoxischen Wertes

Abb. 16: Messung der mitochondrialen *Calcium Retention Capacity*.

Abb. 17: mPTP-Stabilität nach ischämischer und normoxischer Reoxygenierung.

Tab. 1: Ein Überblick über verschiedene Tiermodelle zur Postkonditionierung aus den Jahren 2003-2007 (nach Yellon und Hausenloy, 2005)

Tab. 2: Die verwendeten Primer mit spezifischer Sequenz, Anlagerungs- und Schmelztemperatur (nach Simpsons *et al.*, 2000)

IX. LITERATURVERZEICHNIS

Agati L (1999) Microvascular integrity after reperfusion therapy *Am Heart J* 138(2 Pt2):76-78

Allen DG, Xiao X-H (2003) Role of the cardiac Na⁺/H⁺ exchanger during ischemia and reperfusion. *Cardiovasc Res* 57:934–941

Allen, L.A., Zhao, X.-J., Caughey, W., and Poyton, R.O. (1995). Isoforms of yeast cytochrome c oxidase subunit V affect the binuclear reaction center and alter the kinetics of interaction with the isoforms of yeast cytochrome c. *J. Biol. Chem.* 270, 110–118.

Ambrosio G, Jacobus WE, Mitchell MC, et al. (1989) Effects of ATP precursors on ATP and free ADP content and functional recovery of postischemic hearts. *Am J Physiol.* 256:H560-H566

Ambrosio G, Zweier JL, Flaherty JT (1991) The relationship between oxygen radical generation and impairment of myocardial energy metabolism following post-ischemic reperfusion. *J Mol Cell Cardiol* 23: 1359–1374

Anderson, HV, Leimgruber, PP, Roubin, GS, Nelson, DK, Gruentzig, AR (1985). Distal coronary artery perfusion during percutaneous transluminal coronary angioplasty. *Am Heart J* 110, 720-6.

Arab A, Kuemmerer K, Wang J, Bode C, Hehrlein C. (2008) Oxygenated perfluorochemicals improve cell survival during reoxygenation by pacifying mitochondrial activity. *J Pharmacol Exp Ther.* 325(2):417-24.

Arab A, Wang J, Bausch K, von Schmädel K, Bode C, Hehrlein C. (2010) Transient hyperoxic reoxygenation reduces cytochrome C oxidase activity by increasing superoxide dismutase and nitric oxide. *J Biol Chem.* 285(15):11172-7.

Argaud L, Gateau-Roesch O, Muntean D, Chalabreysse L, Loufouat J, Robert D, et al. (2005 b) Specific inhibition of the mitochondrial permeability transition prevents lethal reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol* 38:367– 74.

Argaud L, Gateau-Roesch O, Raisky O, Loufouat J, Robert D, Ovize M. (2005 a) Postconditioning inhibits mitochondrial permeability transition. *Circulation*. 111(2):194-7.

Arnold JMO, Braunwald E, Sandor T, et al. (1985) Inotropic stimulation of reperfused myocardium, effects on infarct size and myocardial function. *J Am Coll Cardiol*. 7:580-589

Baines CP, Song C-X, Zheng Y-T, Wang G-W, Zhang J, Wang O-L, Guo Y, Bolli R, Cardwell EM, Ping P (2003) Protein kinase C[epsilon] interacts with and inhibits the permeability transition pore in cardiac mitochondria. *Circ Res* 92:873–880

Balligand JL, Kobzik L (1995) Nitric oxide-dependent parasympathetic signalling is due to activation of constitutive endothelial (type III) nitric oxide synthase in cardiac myocytes. *J Biol Chem* 270:14582–14586

Banks, RE, Smart, B.E., Tatlow, J.C., eds. (1994). Organofluorine chemistry: principles and commercial applications. *New York: Plenum Press*.

Becker LC, Levine JH, DiPaula AF, et al. (1986) Reversal of dysfunction in postischemic stunned myocardium by epinephrine and postextrasystolic potentiation. *J Am Coll Cardiol*. 7:580–589.

Bell RM, Yellon DM (2003) Bradykinin limits infarction when administered as an adjunct to reperfusion in mouse heart: the role of P18K, Akt and eNOS. *J Mol Cell Cardiol* 35:185–193

Bing, O. H. L., W. W. Brooks, and J. V. Messer. (1973) Heart muscle viability following hypoxia: protective effect of acidosis. *Science (Wash. DC)*. 180:1297-1298.

Bolli R, Jeroudi MO, Patel BS, et al. (1989 a) Direct evidence that oxygen-derived free radicals contribute to postischemic myocardial dysfunction in the intact dog. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:4695-4699

Bolli R, Jeroudi MO, Patel BS, et al. (1989 b) Marked reduction of free radical generation and contractile dysfunction by antioxidant therapy begun at the

time of reperfusion: evidence that myocardial “stunning” is a manifestation of reperfusion injury. *Circ Res.* 65:607–622.

Bolli R, Marban E (1999) Molecular mechanisms of myocardial stunning
Physiol Rev 79(2):609-634

Bolli R, Patel BS, Jeroudi MO, et al. (1988) Demonstration of free radical generation in “stunned” myocardium of intact dogs with the use of the spin trap alpha-phenyl N-tertiary butyl nitron *J Clin Invest.* 82; 476-485

Bolli R, Patel BS, Zhu WX, et al. (1987) The iron chelator desferrioxamine attenuated postischemic ventricular dysfunction. *Am J Physiol.* 253: H1372–H1380.

Bradford MM, (1976) A rapid and sensitive method of the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal Biochem* May 7; 72: 248 – 254

Braunwald E, Kloner RA (1985) Myocardial reperfusion: a double-edged sword? *J Clin Invest* 76:1713–1719

Braunwald E, Kloner RA. (1982) The stunned myocardium: prolonged, post-ischemic ventricular dysfunction *Circulation* 66: 1146-1149

Budde JM, Velez DA, Zhao Z, Clark KL, Morris CD, Muraki S, Guyton RA, Vinten-Johansen J (2000) Comparative study of AMP579 and adenosine in inhibition of neutrophil-mediated vascular and myocardial injury during 24 h of reperfusion. *Cardiovasc Res* 47:294–305

Burke, P.V., and Poyton, R.O. (1998). Structure/function of oxygenregulated isoforms in cytochrome c oxidase. *J. Exp. Biol.* 201, 1163–1175.

Cabigas BP, Su J, Hutchins W, Shi Y, Schaefer RB, Recinos RF, Nilakantan V, Kindwall E, Niezgodka JA, Baker JE. (2006) Hyperoxic and hyperbaric-induced cardioprotection: role of nitric oxide synthase 3. *Cardiovasc Res.* 72(1):143-51.

Capaldi RA (1990) Structure and assembly of cytochrome c oxidase. *Arch Biochem Biophys* 280(2): 252-262

Carden DL, Granger DN (2000) Pathophysiology of ischemia – reperfusion injury *J Pathol* 190(3):255-266

Castro CI, Briceno JC (2010) Perfluorocarbon – based oxygen carriers: review of products and trials. *Artif Organs* 34(8): 622-634

Chang, TMS, ed. (1998). Blood substitutes: Principles, methods, products and clinical trials. *Karger Landes Systems* ISBN 3-8055-6633-6.

Chiari PC; Bienengraeber MW, Patel PS, et al. (2005) Isoflurane protects against myocardial infarction during early reperfusion by activation of phosphatidylinositol-3-kinase signal transduction: evidence for anesthetic-induced postconditioning in rabbits *Anesthesiology* 102:102-109

Chomczynski P, Sacchi N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 162(1):156-9.

Churchill EN, Szweda LI (2005) Translocation of deltaPKC to mitochondria during cardiac reperfusion enhances superoxide anion production and induces loss in mitochondrial function. *Arch Biochem Biophys* 439:194–199

Clark LC, Becattini F, Kaplan S. (1972) The physiological effects of artificial blood made from inert organic solvents. *Ala J Med Sci* 9: 16–29

Clark LC. (1981) Emulsion of perfluorinated solvents for intravenous gas transport. *Fed Proc* 34: 1468–1477.

Clark, LC (1970). Introduction. *Fed Proc* 29(2), 1698.

Clark, LC, Becattini, F, Kaplan, S, *et al.* (1973). Perfluorocarbons having a short dwell time in the liver. *Science* 181, 680.

Clark, LC, Gollan, F (1966). Survival of mammals breathing organic liquids *Science.* 152(730):1755-6.

- Cohen MV, Yang XM, Downey JM. (2007) The pH hypothesis of postconditioning: staccato reperfusion reintroduces oxygen and perpetuates myocardial acidosis. *Circulation*. 115(14):1895-903
- Cooley DA, Ruel GJ, Wukasch DC (1972) Ischemic contracture of the heart: "Stone Heart". *Am J Cardiol* 29:575–577
- Crompton M (1999) The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem J* 341:233–249
- Crompton M, Costi A, Hayat L. (1987) Evidence for the presence of a reversible Ca²⁺-dependent pore activated by oxidative stress in heart mitochondria. *Biochem J*. 245(3):915-8.
- Cronstein BN, Kramer SB, Weissmann G, Hirschhorn R (1983) Adenosine: a physiological modulator of superoxide anion generation by human neutrophils. *J Exp Med* 158:1160–1177
- Cronstein BN, Levin RI, Belanoff J, Weissmann G, Hirschhorn R (1986) Adenosine: an endogenous inhibitor of neutrophil-mediated injury to endothelial cells. *J Clin Invest* 78:760–770
- Cronstein BN, Levin RI, Philips M, Hirschhorn R, Abramson SB, Weissmann G (1992) Neutrophil adherence to endothelium is enhanced via adenosine A1 receptors and inhibited via adenosine A2 receptors. *J Immunol* 148:2201–2206
- Cronstein BN, Rosenstein ED, Kramer SB, Weissmann G, Hirschhorn R (1985) Adenosine: a physiologic modulator of superoxide anion generation by human neutrophils. Adenosine acts via an A2 receptor on human neutrophils. *J Immunol* 135:1366–1371
- Darling C, Maynard M, Przyklenk K (2004) Post-conditioning via stuttering reperfusion limits myocardial infarct size in rabbit heart. *Acad Emerg Med* 11:536-a
- Darling CE, Jiang R, Maynard M, Whittaker P, Vinten-Johansen J, Przyklenk K. (2005) Postconditioning via stuttering reperfusion limits myocardial

infarct size in rabbit hearts: role of ERK1/2. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 289(4):H1618-26.

Darling CE, Solari PB, Smith CS, Furman MI, Przyklenk K (2007) 'Postconditioning' the human heart: multiple balloon inflations during primary angioplasty may confer cardioprotection. *Basic Res Cardiol.* 102(3):274-8.

Date T, Mochizuki S, Belanger AJ, Yamakawa M, Luo Z, Vincent KA, Cheng SH, Gregory RJ, Jiang C. (2005) Expression of constitutively stable hybrid hypoxia-inducible factor-1alpha protects cultured rat cardiomyocytes against simulated ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Cell Physiol.* 288(2):C314-20.

Davenpeck KL, Gauthier TW, Albertine KH, Lefer AM (1994) Role of P-selectin in microvascular leukocyte-endothelial interaction in splanchnic ischemiareperfusion. *Am J Physiol (Heart Circ Physiol)* 267:H622–H630

Dekleva M, Neskovic A, Vlahovic A, Putnikovic B, Beleslin B, Ostojic M. (2004) Adjunctive effect of hyperbaric oxygen treatment after thrombolysis on left ventricular function in patients with acute myocardial infarction. *American Heart Journal.* 148(4):E14.

Donato M, D'Annunzio V, Berg G, Gonzalez G, Schreier L, Morales C, Wikinski RL, Gelpi RJ. (2007) Ischemic postconditioning reduces infarct size by activation of A1 receptors and K⁺(ATP) channels in both normal and hypercholesterolemic rabbits. *J Cardiovasc Pharmacol.* 49(5):287-92.

Duilio C, Ambrosio G, Kuppusamy P, DiPaula A, Becker LC, Zweier JL (2001) Neutrophils are primary source of O₂ radicals during reperfusion after prolonged myocardial ischemia. *Am J Physiol (Heart Circ Physiol)* 280:H2649–H2657

Eckle T, Köhler D, Lehmann R, El Kasmi K, Eltzschig HK. (2008) Hypoxia-inducible factor-1 is central to cardioprotection: a new paradigm for ischemic preconditioning. *Circulation.* 118(2):166-75.

Ellis JG, Wynne J, Braunwald E, et al. (1984) Response of reperfusion-salvaged stunned myocardium to inotropic stimulation. *Am Heart J.* 107: 13–19.

Feng J, Lucchinetti E, Ahuja P et al. (2005) Isoflurane postconditioning prevents opening of the mitochondrial permeability transition pore through inhibition of glycogen synthase kinase 3b *Anesthesiology* 103: 987-995

Flaherty JT, Jaffin, JH, Magovern, GJ,Jr., Kanter, KR, Gardner, TJ, Miceli, MV, Jacobus, WE (1984). Maintenance of aerobic metabolism during global ischemia with perfluorocarbon cardioplegia improves myocardial preservation. *Circulation* 69(3), 585-92.

Flaherty JT, Pitt B, Gruber JW, et al. (1994) Recombinant human superoxide dismutase (h-SOD) fails to improve recovery of ventricular function in patients undergoing coronary angioplasty for acute myocardial infarction. *Circulation*. 89:1982–1991.

Fleet WF, Johnson TA, Graebner CA, et al. (1985) Effect of serial brief ischemic episodes on extracellular K^+ , pH, and activation in the pig. *Circulation*. 72:922–932.

Follette DM, Fey K, Buckberg GD, Helly JrJJ, Steed DL, Foglia RP, Maloney JV Jr (1981) Reducing postischemic damage by temporary modification of reperfusate calcium, potassium, pH, and osmolarity. *J Thorac Cardiovasc Surg* 82:221–238

Fontaine E, Eriksson O, Ichas F, Bernardi P. (1998) Regulation of the permeability transition pore in skeletal muscle mitochondria. Modulation By electron flow through the respiratory chain complex i. *J Biol Chem*. 273(20):12662-8.

Forman MB, Bingham S, Kopelman HA, Wehr C, Sandler MP, Kolodgie F, Vaughn WK, Friesinger GC, Virmani R (1985) Reduction of infarct size with intracoronary perfluorochemical in a canine preparation of reperfusion *Circulation*. 71(5):1060-8

Forman MB, Perry JM, Wilson BH, Verani MS, Kaplan PR, Shawl FA, Friesinger GC.(1991) Demonstration of myocardial reperfusion injury in humans: results of a pilot study utilizing acute coronary angioplasty with

perfluorochemical in anterior myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*. 18(4):911-8.

Forman, MB, Pitarys, CJ, Vildibill, HD, Lambert, TL, Ingram, DA, Virmani, R, Murray, JJ (1992). Pharmacologic perturbation of neutrophils by Fluosol® results in a sustained reduction in infarct size in the canine model of reperfusion. *J Am Coll Cardiol*19(1), 205-16.

Forman, MB, Puett, DW, Bingham, SE, Virmani, R, Tantengco, MV, Light, RT, Bajaj, A, Price, R, Friesinger, G (1987 a). Preservation of endothelial cell structure and function by intracoronary perfluorochemical in a canine preparation of reperfusion. *Circulation* 76(2), 469-79.

Forman, MB, Puett, DW, Wilson, BH, Vaughn, WK, Friesinger, GC, Virmani, R (1987 b). Beneficial long-term effect of intracoronary perfluorochemical on infarct size and ventricular function in a canine reperfusion model. *J Am Coll Cardiol* 9(5), 1082-90.

Forsburg, S.L., and Guarente, L. (1989). Communication between mitochondria and the nucleus in regulation of cytochrome genes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu. Rev. Cell Biol.* 5, 153–180.

Fujita M, Asanuma H, Hirata A, Wakeno M, Takahama H, Sasaki H, Kim J, Takashima S, Tsukamoto O, Minamino T, Shinozaki Y, Tomoike H, Hori M, Kitakaze M. (2007) Prolonged transient acidosis during early reperfusion contributes to the cardioprotective effects of postconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 292(4):H2004-8.

Fukuda R, Zhang H, Kim JW, Shimoda L, Dang CV, Semenza GL. (2007) HIF-1 regulates cytochrome oxidase subunits to optimize efficiency of respiration in hypoxic cells. *Cell*. 129(1):111-22.

Galagudza M *et al.* (2004) Ischemic postconditioning: brief ischemia during reperfusion converts persistent ventricular fibrillation into regular rhythm. *Eur J Cardiothorac Surg* 25: 1006–1010

Garcia-Dorado D, Gonzalez MA, Barrabes JA, Ruiz-Meana M, Solares J, Lidon R-M, Blanco J, Puigfel Y, Piper HM, Soler-Soler J (1997) Prevention of ischemic rigor contracture during coronary occlusion by inhibition of Na⁺-H⁺ exchange. *Cardiovasc Res* 35:80–89

Geyer RP. (1973) Fluorocarbon-polyol artificial blood substitutes. *N Engl J Med* 289: 1077–1082

Geyer RP. (1975) “Bloodless” rats through the use of artificial blood substitutes. *Fed Proc* 34: 1499–1505.

Geyer RP. (1982) Oxygen transport in vivo by means of perfluorochemical preparations. *N Engl J Med* 307: 304–305

Geyer, RP, Monroe, RG, Taylor, K (1968). Survival of rats having red cells totally replaced with emulsified fluorocarbon. *Federation Proc* 27, 384-90.

Glazier JJ (2005) Attenuation of reperfusion microvascular ischemia by aqueous oxygen: experimental and clinical observations. *Am Heart J* 149(4): 580-584

Glogar, DH, Kloner, RA, Muller, J, DeBoer, LW, Braunwald, E, Clark, LC (1981). Fluorocarbons reduce myocardial ischemic damage after coronary occlusion. *Science* 211(4489), 1439-41.

Gomez L, Thibault H, Gharib A, Dumont JM, Vuagniaux G, Scalfaro P, Derumeaux G, Ovize M. (2007) Inhibition of mitochondrial permeability transition improves functional recovery and reduces mortality following acute myocardial infarction in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293(3):H1654-61.

Granger DN (1999) Ischemia – reperfusion: mechanisms of microvascular dysfunction and the influence of risk factors for cardiovascular disease *Microcirculation* 6(3):167-178

Griffiths EJ, Halestrap AP. (1995) Mitochondrial non-specific pores remain closed during cardiac ischaemia, but open upon reperfusion. *Biochem J.* 307 (Pt 1):93-8.

Grill HP, Zweier JL, Kuppusamy P, Weisfeldt ML, Flaherty JT (1992) Direct measurement of myocardial free radical generation in an in vivo model: effects of postischemic reperfusion and treatment with human recombinant superoxide dismutase *J Am Coll Cardiol* 20:1604-1611

Gross GJ, Farber NE, Hardman HF, et al. (1986) Beneficial actions of superoxide dismutase and catalase in stunned myocardium of dogs. *Am J Physiol*. 250:H372–H377.

Gross GJ, Gumina RJ (2001) Cardioprotective effects of Na⁺/H⁺ exchange inhibitors. *Drugs of the Future* 26:253–260

Gumina RJ, Auchampach JA, Wang R, Buerger E, Eickmeier C, Moore J, Daemmgen J, Gross GJ (2000) Na⁺/H⁺ exchange inhibition-induced cardioprotection in dogs: effects on neutrophils versus cardiomyocytes. *Am J Physiol (Heart Circ Physiol)* 279:H1563–H1570

Guo J-P, Murohara T, Buerke M, Sciall R, Lefer AM (1996) Direct measurement of nitric oxide release from vascular endothelial cells. *J Appl Physiol* 81:774–779

Gurevicius J, Salem MR, Metwally AA, Silver JM, Crystal GJ. (1995) Contribution of nitric oxide to coronary vasodilation during hypercapnic acidosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 268: H39–H47

Halestrap A.P. (1999) The Mitochondrial Permeability Transition: its molecular mechanism and role in reperfusion injury, Mitochondria and cell death, *Biochemical Society Symposia*, eds Brown G.C., Nicholls D.G., Cooper C.E. (Portland Press, London), vol. 66, pp 181–203.

Halestrap A.P., McStay G.P., Clarke S.J. (2002) The permeability transition pore complex: another view. *Biochimie* 84:153–166.

Halestrap AP, Clarke SJ, Javadov SA (2004) Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion – a target for cardioprotection *Cardiovasc Res* 61:372-385

Halestrap AP, Kerr PM, Javadov S, Woodfield KY (1998) Elucidating the molecular mechanism of the permeability transition pore and its role in reperfusion injury of the heart. *Biochim Biophys Acta* 1366:79–94

Halkos ME, Kerendi F, Corvera JS, et al. (2004) Myocardial protection with postconditioning is not enhanced by ischemic preconditioning *Ann Thorac Surg* 78:961-969

Hausenloy DJ, Duchen MR, Yellon DM. (2003) Inhibiting mitochondrial permeability transition pore opening at reperfusion protects against ischaemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res.* 60(3):617-25.

Hausenloy DJ, Maddock HL, Baxter GF, Yellon DM. (2002) Inhibiting mitochondrial permeability transition pore opening: a new paradigm for myocardial preconditioning? *Cardiovasc Res.* 55(3):534-43.

Hausenloy DJ, Tsang A, Mocanu MM, and Yellon DM (2005) Ischemic preconditioning protects by activating prosurvival kinases at reperfusion. *Am J Physiol (Heart Circ Physiol)* 288:H971–H976

Hausenloy DJ, Yellon DM (2004) New directions for protecting the heart against ischaemia-reperfusion injury: targeting the Reperfusion Injury Salvage Kinase (RISK)-pathway. *Cardiovasc Res* 61:448–460

Hearse DJ (1991) Reperfusion-induced injury: a possible role for oxidants stress and its manipulation *Cardiovasc Drugs Ther* 5:225-235

Hearse DJ, Humphrey SM, Chain EB (1973) Abrupt reoxygenation of the anoxic potassium-arrested perfused rat heart: a study of myocardial enzyme release. *J Mol Cell Cardiol* 5:395–407

Heusch G (2004) Postconditioning. Old wine in a new bottle? *J Am Coll Cardiol* 44:1111-1112

Heusch G, Büchert A, Feldhaus S, Schulz R (2006) No loss of cardioprotection by postconditioning in connexin 43-deficient mice *Basic Res Cardiol* 101(4):354-6.

Heyndrickx GR, Millard RW, McRitchie RJ, et al. (1975) Regional myocardial functional and electrophysiological alterations after brief coronary artery occlusion in conscious dogs. *J Clin Invest.* 56: 978–985.

Hori O, Ichinoda F, Tamatani T, Yamaguchi A, Sato N, Ozawa K, Kitao Y, Miyazaki M, Harding HP, Ron D, Tohyama M, M Stern D, Ogawa S. (2002) Transmission of cell stress from endoplasmic reticulum to mitochondria: enhanced expression of Lon protease. *J Cell Biol.* 157(7):1151-60.

Hurtado C, Pierce GN (2001) Sodiumhydrogen exchange inhibition: pre-versus post-ischemic treatment. *Basic Res Cardiol* 96:312–317

Ichas F, Jouaville LS, Mazat JP. (1997) Mitochondria are excitable organelles capable of generating and conveying electrical and calcium signals. *Cell.* 89(7):1145-53.

Ichas F, Jouaville LS, Sidash SS, Mazat JP, Holmuhamedov EL. (1994) Mitochondrial calcium spiking: a transduction mechanism based on calcium-induced permeability transition involved in cell calcium signalling. *FEBS Lett.* 348(2):211-5.

Iliodromitis EK, Georgiadis M, Cohen MV, Downey JM, Bofilis E, Kremastinos DT (2006 a) Protection from postconditioning depends on the number of short ischemic insults in anesthetized pigs. *Basic Res Cardiol* 101:502–507

Iliodromitis EK, Zoga A, Vrettou A, Andreadou I, Paraskevaïdis IA, Kaklamanis L, Kremastinos DT. (2006 b) The effectiveness of postconditioning and preconditioning on infarct size in hypercholesterolemic and normal anesthetized rabbits. *Atherosclerosis.* 188(2):356-62.

Inagaki K, Chen L, Ikeno F, Lee FH, Imahashi K, Bouley DM, Rezaee M, Yock PG, Murphy E, Mochly-Rosen D (2003 b) Inhibition of delta-protein kinase C protects against reperfusion injury of the ischemic heart in vivo. *Circulation* 108:2304–2307

Inagaki K, Hahn HS, Dorn II GW, Mochly-Rosen D (2003 a) Additive protection of the ischemic heart ex vivo by combined treatment with δ -Protein kinase C inhibitor and e-Protein kinase C activator. *Circulation* 108:869–875

Ito BR, Tate H, Kobayashi M, et al. (1987) Reversibly injured, postischemic canine myocardium retains normal contractile reserve. *Circ Res.* 61:834–846.

Ivan, M., Kondo, K., Yang, H., Kim, W., Valiando, J., Ohh, M., Salic, A., Asara, J.M., Lane, W.S., and Kaelin, W.G., Jr. (2001). HIF- α targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing. *Science* 292, 464–468.

Iyer, N.V., Kotch, L.E., Agani, F., Leung, S.W., Laughner, E., Wenger, R.H., Gassmann, M., Gearhart, J.D., Lawler, A.M., Yu, A.Y., and Semenza, G.L. (1998). Cellular and developmental control of O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 α . *Genes Dev.* 12, 149–162.

Jaakkola, P., Mole, D.R., Tian, Y.M., Wilson, M.I., Gielbert, J., Gaskell, S.J., Kriegsheim, A.V., Hebestreit, H.F., Mukherji, M., Schofield, C.J., Maxwell, P.H., Pugh, C.W., and Ratcliffe, P.J. (2001). Targeting of HIF- α to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. *Science* 292, 468–472.

Jaffe, CC, Wohlgelernter, D, Cabin, H, Bowman, L, Deckelbaum, L, Remetz, M, Cleman, M (1988). Preservation of left ventricular ejection fraction during percutaneous transluminal coronary angioplasty by distal transcatheter coronary perfusion of oxygenated Fluosol DA 20%® . *Am Heart J* 115, 1156-64.

Jennings RB, Kaltenbach JP, Sommers HM, et al. (1963) Studies of the dying myocardial cell. In: James TN, Keyes JW, eds. *The Etiology of Myocardial Infarction*. Boston, Mass: Little, Brown and Co 189–205.

Jennings RB, Murry CE, Steenbergen C Jr, et al. (1990) Development of cell injury in sustained acute ischemia. *Circulation.* 82(suppl):II-2–II-12

Jennings RB, Reimer KA, Hill ML, et al. (1981) Total ischemia, in dog

hearts, in vitro, I: comparison of high energy phosphate production, utilization and depletion and of adenine nucleotide catabolism in total ischemia in vitro vs severe ischemia in vivo. *Circ Res.* 49:892–900.

Jennings RB, Reimer KA, Steenbergen C Jr. (1986) Myocardial ischemia revisited: the osmolar load, membrane damage, and reperfusion. *J Mol Cell Cardiol.* 18:769–780.

Jennings RB, Schaper J, Hill ML, et al. Jr. (1985 a) Effect of reperfusion late in the phase of reversible ischemic injury: changes in cell volume, electrolytes, metabolites, and ultrastructure. *Circ Res.* 56:262–278.

Jennings RB, Sebbag L, Schwartz LM, et al. (2001) Metabolism of preconditioned myocardium: effect of loss and reinstatement of cardioprotection. *J Mol Cell Cardiol.* 33:1571–1588.

Jennings RB, Steenbergen C Jr. (1985 b) Nucleotide metabolism and cellular damage in myocardial ischemia. *Annu Rev Physiol.* 1985;47:727–749.

Jeroudi MO, Triana FJ, Patel BS, et al. (1990) Effect of superoxide dismutase and catalase, given separately, on myocardial “stunning.” *Am J Physiol.* 259:H889–H901

Johnson, DL, Greene, PS, Gott, VL, Gardner, TJ (1988). New pluronic-free perfluorocarbon cardioplegia improves myocardial oxygenation. *Circulation* 78(5 Pt 2), III153-7.

Juhaszova M, Zorov DB, Kim SH, Pepe S, Fu Q, Fishbein KW, Ziman BD, Wang S, Ytrehus K, Antos CL, Olson EN, Sollott SJ (2004) Glycogen synthase kinase-3 β mediates convergence of protection signaling to inhibit the mitochondrial permeability transition pore *J Clin Invest* 113: 1535-1549

Kaljusto ML, Mori T, Mohammad Husain Rizvi S, Galagudza M, Frantzen ML, Valen G, Vaage J. (2006) Postconditioning in rats and mice. *Scand Cardiovasc J.* 40(6):334-41.

Kanter, KR (1979). Superiority of perfluorocarbon cardioplegic controversy. *J Thorac Cardiovasc Surg* 77, 803.G.

Keipert, PE (1998). Perfluorochemical emulsions: future alternatives to transfusion. *Blood Subst Princ Meth Prod Clin Trials* 2, 127-56.

Kelly RA, Balligand J-L, Smith TW (1996) Nitric oxide and cardiac function. *Circ Res* 79:363–380

Kent KM, Cleman MW, Cowley MJ, Forman MB, Jaffe CC, Kaplan M, King SB 3rd, Krucoff MW, Lassar T, McAuley B, et al. (1990) Reduction of myocardial ischemia during percutaneous transluminal coronary angioplasty with oxygenated Fluosol *Am J Cardiol.* 66(3):279-84.

Kevin LG, Camara AKS, Riess ML, Novalija E, Stowe DF (2003) Ischemic preconditioning alters real-time measure of O₂ radicals in intact hearts with ischemia and reperfusion. *Am J Physiol (Heart Circ Physiol)* 284:H566–H574

Khatri JJ, Johnson C, Magid R, Lessner SM, Laude KM, Dikalov SI, Harrison DG, Sung HJ, Rong Y, Galis ZS. (2004) Vascular oxidant stress enhances progression and angiogenesis of experimental atheroma *Circulation.* 3;109(4):520-5.

Kin H *et al.* (2005 a) Postconditioning reduces infarct size via adenosine receptor activation by endogenous adenosine. *Cardiovasc Res* 67: 124–133

Kin H, Lofye MT, Amerson BS, Zatta AJ, Kerendi F, Halkos ME, Zhao Z-Q, Headrick JP, Guyton RA, Vinten- Johansen J (2004 b) Cardioprotection by “postconditioning” is mediated by increased retention of endogenous intravascular adenosine and activation of A_{2a} receptors during reperfusion. *Circulation* 110:III-168

Kin H, Zatta AJ, Jiang R, Reeves JG, Mykytenko J, Sorescu G, Zhao Z-Q, Wang N-P, Guyton RA, Vinten-Johansen J (2005 b) Activation of opioid receptors mediates the infarct size reduction by Postconditioning. *J Mol Cell Cardiol* 38:827

Kin H, Zhao ZQ, Sun HY, et al. (2004 a) Postconditioning attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by inhibiting events in the early minutes

of reperfusion *Cardiovasc Res* 62:74-85

Kitakaze M, Node K, Takashima S, Asanuma H, Asakura M, Sanada S, Shinozaki Y, Mori H, Sato H, Kuzuya T, Hori M. (2001) Role of cellular acidosis in production of nitric oxide in canine ischemic myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 33: 1727–1737

Kitakaze M, Takashima S, Funaya H, Minamino T, Node K, Shinozaki Y, Mori H, Hori M. (1997) Temporary acidosis during reperfusion limits myocardial infarct size in dogs. *Am J Physiol.* 272(5 Pt 2):H2071-8.

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

Klein HH, Pich S, Bohle RM, Lindert-Heimberg S, Nebendahl K (2000) Na⁺/H⁺ Exchange inhibitor cariporide attenuates cell injury predominantly during ischemia and not at onset of reperfusion in porcine hearts with low residual blood flow. *Circulation* 102:1977–1982

Kloner RA, Ellis SG, Lange R, et al. (1983) Studies of experimental coronary artery reperfusion: effects on infarct size, myocardial function, biochemistry, ultrastructure and microvascular damage. *Circulation.* 68(suppl I):I-8–I-15.

Kloner RA, Ganote CE, Whalen D, et al. (1974) Effect of a transient period of ischemia on myocardial cells, II: fine structure during the first few minutes of reflow. *Am J Pathol.* 74:399–422.

Kloner RA, Jennings RB (2001) Consequences of Brief Ischemia: Stunning, Preconditioning, and Their Clinical Implications Part 1 *Circulation* 104: 2981-2989

Kloner RA, Przyklenk K, Patel B. (1989) Altered myocardial states: the stunned and hibernating myocardium. *Am J Med.* 86(suppl 1A):14–22.

Kostyak JC, Hunter JC, Korzick DH (2006) Acute PKCdelta inhibition limits ischaemia-reperfusion injury in the aged rat heart: role of GSK-3beta. *Cardiovasc Res* 70:325–334

Kwast, K.E., Burke, P.V., and Poyton, R.O. (1998). Oxygen sensing and the transcriptional regulation of oxygen-responsive genes in yeast. *J. Exp. Biol.* 201, 1177–1195.

Lee SH, Wolf PL, Escudero R, Deutsch R, Jamieson SW, Thistlethwaite PA (2000) Early expression of angiogenesis factors in acute myocardial ischemia and infarction. *N Engl J Med* 342:626–633

Lefer AM, Tsao PS, Lefer DJ, Ma X-L (1991) Role of endothelial dysfunction in the pathogenesis of reperfusion injury after myocardial ischemia. *FASEB J* 5:2029–2034

Lefer AM, Weyrich AS, Buerke M (1994) Role of selectins, a new family of adhesion molecules, in ischaemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 28:289–294

Lemasters JJ, Bond JM, Chacon E, Harper IS, Kaplan SH, Ohata H, Trollinger DR, Herman B, Cascio WE. (1996) The pH paradox in ischemia-reperfusion injury to cardiac myocytes. *EXS*. 76:99-114.

Lim SY, Davidson SM, Hausenloy DJ, Yellon DM. (2007) Preconditioning and postconditioning: the essential role of the mitochondrial permeability transition pore. *Cardiovasc Res* 75 (3): 530-535

Lowe, KC (1997). Perfluorochemical respiratory gas carriers: applications in medicine and biotechnology. *Sci Prog* 169-93.

Lowe, KC (1999). Perfluorinated blood substitutes and artificial oxygen carriers. *Blood Rev* 13, 171-84.

Lowry, C.V., and Zitomer, R.S. (1984). Oxygen regulation of anaerobic and aerobic genes mediated by a common factor in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 6129–6133.

Lucchesi BR (1994) Complement, neutrophils and free radicals: mediators of reperfusion injury. [Review]. *Arzneim-Forsch/Drug Res* 44:420–432

Ma X-L, Weyrich AS, Lefer DJ, Lefer AM (1993) Diminished basal nitric oxide release after myocardial ischemia and reperfusion promotes neutrophil adherence to coronary endothelium. *Circ Res* 72:403–412

Magovern, GJ, Flaherty, JT, Gott, VL, Bulkley, BH, Gardner, TJ (1982). Optimal myocardial protection with Fluosol® cardioplegia. *Ann Thorac Surg* 34, 249.

Martorana PA, Kettenbach B, Briepohl G, et al. (1990) Reduction of infarct size by local angiotensin converting enzyme inhibition is abolished by a bradykinin antagonist. *Eur J Pharmacol.* 182:395–396.

Maxwell, P.H., Wiesener, M.S., Chang, G.W., Clifford, S.C., Vaux, E.C., Cockman, M.E., Wykoff, C.C., Pugh, C.W., Maher, E.R., and Ratcliffe, P.J. (1999). The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature* 399, 271–275.

Merrill GF, Haddy FJ, Dabney JM. (1978) Adenosine, theophylline, and perfusate pH in the isolated, perfused guinea pig heart. *Circ Res* 42: 225–229

Mitsuno, T, Ohyanagi, H, Naito, R (1982). Clinical studies of a perfluorochemical whole blood substitute (Fluosol-DA®) Summary of 186 cases. *Ann Surg* 195(1), 60-9.

Morrison, T. B., Weis, J. J., and Wittwer, C. T. (1998) Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *Biotechniques* 24(6), 954-8, 960, 962

Mosca, RS, Rohs, TJ, Waterford, RR, Childs, KF, Brunsting, LA, Bolling, SF (1996). Perfluorocarbon supplementation and postischemic cardiac function. *Surgery* 120(2):197-204.

Murriel CL, Churchill E, Inagaki K, Szweda LI, Mochly-Rosen D (2004) Protein kinase Cdelta activation induces apoptosis in response to cardiac ischemia

and reperfusion damage: a mechanism involving BAD and the mitochondria. *J Biol Chem* 279:47985–47991

Murry CE (1986) Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 74: 1124–1136

Murry CE, Richard VJ, Jennings RB, et al. (1991) Myocardial protection is lost before contractile function recovers from ischemic preconditioning. *Am J Physiol.* 260:H796–H804.

Myers ML, Bolli R, Lekirch RF, et al. (1985) Enhancement of recovery of myocardial function by oxygen free-radical scavengers after reversible regional ischemia *Circulation* 72:915-921

Mykytenko J, Kerendi F, Reeves JG, Kin H, Zatta AJ, Jiang R, Guyton RA, Vinten-Johansen J, Zhao ZQ (2007) Long-term inhibition of myocardial infarction by postconditioning during reperfusion. *Basic Res Cardiol* 102:90–100

Naito, R, Yokoyama, K (1990). Perfluorochemical blood substitutes. Technical Information Series n05 and n07, Green Cross Corp., Osaka, Japan 1978, 1981; Fluosol® 20% intravascular perfluorochemical emulsion. *Product Monograph, Alpha Therapeutic Corporation.*

Nayler, W. G., R. Ferrari, P. A. Poole-Wilson, and C. E. Yopez.(1979) A protective effect of a mild acidosis on hypoxic heart muscle. *J.Mol. Cell. Cardiol.* 11:1053-1071.

Noda K, Sasaguri M, Ideishi M, et al. (1993) Role of locally formed bradykinin in the reduction of myocardial infarct size in dogs. *Circ Res.* 27: 334–340.

O'Brien RN, Langlais AJ, Deufert WD. (1982) Diffusion coefficients of respiratory gases in a perfluorocarbon liquid. *Science* 217: 153–155

Obraztsov VV, Neslund GG, Kornbrust ES, Flaim SF, Woods CM.(2000) In vitro cellular effects of perfluorochemicals correlate with their cellular lipid solubility. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 278: L1018–L1024

Okamoto, H, Yamanouchi, K, Imagawa, T, *et al.* (1973). Persistence of fluorocarbons in circulating blood and organs. *Proceed 22nd Intercompany Conf., Green Cross Corp. Osaka, Japan.*

Park JL, Lucchesi BR (1999) Mechanisms of myocardial reperfusion injury *Ann Thorac Surg* 68(5):1905-1912

Patel B, Kloner RA, Przyklenk K, *et al.* (1988) Postischemic myocardial “stunning”: a clinically relevant phenomenon. *Ann Intern Med.* 108: 626–629.

Penna C, Rastaldo R, Mancardi D, Raimondo S, Cappello S, Gattullo D, Losano G, Pagliaro P (2006) Post-conditioning induced cardioprotection requires signaling through a redoxsensitive mechanism, mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channel and protein kinase C activation. *Basic Res Cardiol* 101:180–189

Petrosillo G, Di Venosa N, Moro N, Colantuono G, Paradies V, Tiravanti E, Federici A, Ruggiero FM, Paradies G. (2011) In vivo hyperoxic preconditioning protects against rat-heart ischemia/reperfusion injury by inhibiting mitochondrial permeability transition pore opening and cytochrome c release. *Free Radic Biol Med.* 50(3):477-83.

Philipp S, Yang X-M, Cui L, Davis AM, Downey JM, Cohen MV (2006) Postconditioning protects rabbit hearts through a protein kinase C-adenosine A2b receptor cascade. *Cardiovasc Res* 70:308–314

Philipp SD, Downey JM, Cohen MV (2004) Postconditioning must be initiated in less than 1 minute following reperfusion and is dependent on adenosine receptors and P13-kinase. *Circulation* 110:III-168

Piantadosi CA, Tatro LG, Whorton AR. (2002) Nitric oxide and differential effects of ATP on mitochondrial permeability transition. *Nitric Oxide.* 6(1):45-60.

Piper HM (1989) Energy deficiency, calcium overload or oxidative stress: possible causes of irreversible ischemic myocardial injury. *Klin Wochenschr* 67:465–476

- Piper HM, Garcia-Dorado D (1999) Prime cause of rapid cardiomyocyte death during reperfusion. *Ann Thorac Surg* 68:1913–1919
- Piper HM, Garcia-Dorado D, Ovize M (1998) A fresh look at reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 38:291–300
- Piper HM, Meuter K, Schafer C. (2003) Cellular mechanisms of ischemia–reperfusion injury. *Ann Thorac Surg* 75:S644 –8.
- Piper HM, Schafer AC (2004) The first minutes of reperfusion: a window of opportunity for cardioprotection. *Cardiovasc Res* 61:365–371
- Przyklenk K, Kloner RA. (1986) Superoxide dismutase plus catalase improve contractile function in the canine model of the “stunned myocardium.” *Circ Res.* 58:148–156
- Qian T, Nieminen AL, Herman B, Lemasters JJ. (1997) Mitochondrial permeability transition in pH-dependent reperfusion injury to rat hepatocytes. *Am J Physiol.* 273(6 Pt 1):C1783-92.
- Riess JG (2005) Understanding the fundamentals of perfluorocarbons and perfluorocarbon emulsions relevant to in vivo oxygen delivery. *Artif Cells Blood Subsit Immobil Biotechnol* 33(1): 47-63
- Riess JG, Krafft MP (1999) Fluorocarbons and fluorosurfactants for in vivo oxygen transport (blood substitutes), imaging and drug delivery *Mat Res Soc Bull* 24: 42-48
- Riess, JG, Le, Blanc, M (1982). Solubility and transport phenomena in perfluorochemicals relevant to blood substitution and other biomedical applications. *Pure Appl Chem* 54, 2383-406.
- Rodríguez JA, Nespereira B, Pérez-Illarbe M, Eguinoa E, Páramo JA. (2005) Vitamins C and E prevent endothelial VEGF and VEGFR-2 overexpression induced by porcine hypercholesterolemic LDL. *Cardiovasc Res.* 15;65(3):665-73.
- Rovetto MJ, Lamberton WF, Neely JR. (1975) Mechanisms of glycolytic

inhibition in ischemic rat hearts. *Circ Res.* 37:742–751.

Rude, RE, Glogar, D, Khuri, SF, Kloner, RA, Karaffa, S, Muller, JE, Clark, LC, Jr, Braunwald, E. (1982). Effects of intravenous fluorocarbons during and without oxygen enhancement on acute myocardial ischemic injury assessed by measurement of intramyocardial gas tensions. *Am Heart J* 103(6), 986-95.

Salceda, S., and Caro, J. (1997). Hypoxia-inducible factor 1a (HIF-1a) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes. *J. Biol. Chem.* 272, 22642–22647.

Sarteschi, L.M., Sagripanti, A., Carpi, A., Menchini-Fabris, F. (2001). Rationale for the development of red-cell substitutes and status of the research. *Internal Medicine* 9, 36-44.

Schömig A. (1990) Catecholamines in myocardial ischemia. *Circulation.* 82(suppl II):II-13–II-22.

Schultz JEJ, Rose E, Yao Z, et al. (1995) Evidence for involvement of opioid receptors in ischemic preconditioning in rat hearts. *Am J Physiol.* 268:H2157–H2161.

Schumacker PT. (2005) Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). *Crit Care Med.* 33(12 Suppl):S423-5.

Schwartz LM (2004) Ischemic postconditioning during reperfusion fails to protect against lethal myocardial ischemia-reperfusion injury in pigs. *Circulation* 110:III-106

Schwartz LM, Lagranha CJ (2006) Ischemic postconditioning during reperfusion activates Akt and ERK without protecting against lethal myocardial ischemia-reperfusion injury in pigs. *Am J Physiol* 290:H1011–H1018

Seagroves, T.N., Ryan, H.E., Lu, H., Wouters, B.G., Knapp, M., Thibault, P., Laderoute, K., and Johnson, R.S. (2001). Transcription factor HIF-1 is a necessary mediator of the Pasteur effect in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* 21, 3436–3444.

Semenza GL, Jiang BH, Leung SW, Passantino R, Concordet JP, Maire P, Giallongo A.(1996) Hypoxia response elements in the aldolase A, enolase 1, and lactate dehydrogenase A gene promoters contain essential binding sites for hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem.* 271(51):32529-37.

Semenza GL. (2001) Hypoxia-inducible factor 1: oxygen homeostasis and disease pathophysiology. *Trends Mol Med.* 7(8):345-50.

Semenza GL. (2004) Hydroxylation of HIF-1: oxygen sensing at the molecular level. *Physiology (Bethesda).* 19:176-82.

Semenza GL.(2009) Regulation of oxygen homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Physiology (Bethesda).*24:97-106.

Serviddio G, Di Venosa VN, Federici A, et al. (2005) Brief hypoxia before normoxic reperfusion (postconditioning) protects the heart against ischemia-reperfusion injury by preventing mitochondria peroxide production and glutathione depletion. *FASEB J* 19:354-361

Shaffer, TH, Wolfson, MR (1992). Liquid ventilation. *Pediatr Pulmonol* 14, 102-9.

Silverman H.S., Stern M.D. (1994) Ionic basis of ischaemic cardiac injury: insights from cellular studies. *Cardiovasc. Res.* 28:581–597.

Simpson, D. A., Feeney, S., Boyle, C., and Stitt, A. W. (2000) Retinal VEGF mRNA measured by SYBR green I fluorescence: A versatile approach to quantitative PCR. *Mol Vis* 6,178-83

Sloviter HA, Petrovic M, Ogoshi S, Yamada H. (1969) Dispersed fluorochemicals as substitutes for erythrocytes in intact animals. *J Appl Physiol* 27:666–668

Sloviter, H, Kamimoto, T (1967). Erythrocyte substitute for perfusion of brain. *Nature* 216, 458-60.

Sobel BE, Bresnahan GF, Shell WE, Yoder RD. (1972) Estimation of Infarct Size in Man and its Relation to Prognosis *Circulation* Oct; 46(4): 640-648

Spiess BD, Cochran RP. (1996) Perfluorocarbon emulsions and cardiopulmonary bypass: a technique for the future. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 10: 83–90

Spiess BD. (2009) Perfluorocarbon emulsions as a promising technology: a review of tissue and vascular gas dynamics. *J Appl Physiol.* 106(4):1444-52.

Staat P, Rioufol G, Piot C, et al. (2005) Postconditioning the human heart *Circulation* 112:2143-2148

Steenbergen C, Deleeuw G, Rich T, Williamson JR. (1977) Effects of acidosis and ischemia on contractility and intracellular pH of rat heart. *Circ Res.* 1977 Dec;41(6):849-58.

Steenbergen C, Hill ML, Jennings RB (1985) Volume regulation and plasma membrane injury in aerobic, anaerobic, and ischemic myocardium in vitro. Effects of osmotic cell swelling on plasma membrane integrity. *Circ Res* 57:864–875

Steenbergen C, Murphy E, Levy L, et al. (1987) Elevation in cytosolic free calcium concentration early in myocardial ischemia in perfused rat heart. *Circ Res.* 60:700–707.

Sterling DL, Thornton JD, Swafford A, Gottlieb SF, Bishop SP, Stanley AW, Downey JM. (1993) Hyperbaric oxygen limits infarct size in ischemic rabbit myocardium in vivo. *Circulation.* 88(4 Pt 1):1931–1936.

Stone GW, Martin JL, de Boer MJ, Margheri M, Bramucci E, Blankenship JC, Metzger DC, Gibbons RJ, Lindsay BS, Weiner BH, Lansky AJ, Krucoff MW, Fahy M, Boscardin WJ; AMIHOT-II Trial Investigators. (2009) Effect of supersaturated oxygen delivery on infarct size after percutaneous coronary intervention in acute myocardial infarction. *Circ Cardiovasc Interv.* 2(5):366-75.

Sun HY, Wang NP, Kerendi F, et al. (2005) Hypoxic postconditioning reduces cardiomyocyte loss by inhibiting ROS generation and intracellular Ca²⁺ overload *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288:H1900-1908

Sun H-Y, Wang N-P, Kerendi F, Halkos ME, Kin H, Guyton RA, Vinten-Johansen J, Zhao Z-Q (2004) Hypoxic postconditioning reduces cardiomyocyte loss by inhibiting the generation of reactive oxygen species and intracellular calcium overload. *Am J Physiol (Heart Circ Physiol)* 288(4):H1900-8

Sun JZ, Kaur H, Halliwell B, et al. (1993) Use of aromatic hydroxylation of phenylalanine to measure production of hydroxyl radicals after myocardial ischemia in vivo: direct evidence for a pathogenetic role of the hydroxyl radical in myocardial stunning. *Circ Res.* 73:534–549.

Tang XL, Sato H, Tiwari S, Dawn B, Bi Q, Li Q, Shirk G, Bolli R. (2006) Cardioprotection by postconditioning in conscious rats is limited to coronary occlusions <45 min *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 291(5):H2308-17.

Thackham JA, McElwain DL, Long RJ. (2008) The use of hyperbaric oxygen therapy to treat chronic wounds: A review. *Wound Repair and Regeneration.* 16(3):321–330.

Thibault H, Piot C, Staat P, Bontemps L, Sportouch C, Rioufol G, Cung TT, Bonnefoy E, Angoulvant D, Aupetit JF, Finet G, André-Fouët X, Macia JC, Raczka F, Rossi R, Itti R, Kirkorian G, Derumeaux G, Ovize M. (2008) Long-term benefit of postconditioning. *Circulation.* 117(8):1037-44.

Tibbles PM, Edelsberg JS. (1996) Hyperbaric-oxygen therapy. *The New England Journal of Medicine.* 334(25):1642–1648.

Toma O, Weber NC, Wolter JJ, Obal D, Preckel B (2004) Desflurane preconditioning induces time-dependent activation of protein kinase C epsilon and extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 in the rat heart in vivo. *Anesthesiology* 101:1372–1380

Tremper KK, Friedman AE, Levine EM, Lapin R, Camarillo D. (1982) The preoperative treatment of severely anemic patients with a perfluorochemical oxygen-transport fluid, Fluosol-DA. *N Engl J Med* 307: 277–283

Triana JF, Li X-Y, Jamaluddin U, et al. (1991) Postischemic myocardial “stunning”. Identification of major differences between open-chest and the

conscious dog and evaluation of the oxygen radical hypothesis in the conscious dog. *Circ Res.* 69:731-747

Tsang A, Hausenloy DJ, Macanu MM, Yellon DM (2004) Postconditioning-A form of ‘‘modified reperfusion’’ protects the myocardium by activating the P13K-Akt pathway. *Circulation* 110:III167

Tsang A, Hausenloy DJ, Yellon DM (2005) Myocardial postconditioning: reperfusion injury revisited. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289:H2-H7

Tsutsumi YM, Yokoyama T, Horikawa Y, Roth DM, Patel HH. (2007) Reactive oxygen species trigger ischemic and pharmacological postconditioning: in vivo and in vitro characterization. *Life Sci.* 81(15):1223-7

Valen G, Vaage J (2005) Pre- and postconditioning during cardiac surgery *Basic Res Cardiol* 100:179-186

Verma S, Fedak PW, Weisel RD, Butany J, Rao V, Maitland A, Li RK, Dhillon B, Yau TM. (2002) Fundamentals of reperfusion injury for the clinical cardiologist. *Circulation* May 21;105(20):2332-2336.

Vinten-Johansen J (2004) Involvement of neutrophils in the pathogenesis of lethal myocardial reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 61:481–497

Vinten-Johansen J (2007) Postconditioning: a mechanical maneuver that triggers biological and molecular cardioprotective responses to reperfusion. *Heart Fail Rev* 12:235-244

Vinten-Johansen J, Yellon DM, Opie LH (2005 b) Postconditioning. A simple, clinically applicable procedure to improve revascularization in acute myocardial infarction. *Circulation* 112:2085-2088

Vinten-Johansen J, Zhao ZQ, Zatta AJ, et al. (2005 a) Postconditioning – a new link in nature’s armor against myocardial ischemia-reperfusion injury *Basic Res Cardiol* 100:295-310

Wall TM, Sheehy R, Hartman JC. (1994 a) Role of bradykinin in myocardial preconditioning. *J Pharmacol Exp Ther.* 1994;270:681–690.

Wall, TC, Califf, RM, Blankenship, J, Talley, JD, Tannenbaum, M, Schwaiger, M, Gacioch, G, Cohen, MD, Sanz, M, Leimberger, JD, *et al.* (1994 b). Intravenous Fluosol® in the treatment of acute myocardial infarction. Results of the Thrombolysis and Angioplasty in Myocardial Infarction 9 Trial. TAMI 9 Research Group. *Circulation* 90(1), 114-20.

Wang, G.L., Jiang, B.-H., Rue, E.A., and Semenza, G.L. (1995). Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 5510–5514.

Waterland, R.A., Basu, A., Chance, B., and Poyton, R.O. (1991). The isoforms of yeast cytochrome c oxidase alter the in vivo kinetic properties of the holoenzyme. *J. Biol. Chem.* 266, 4180–4186.

Weber NC, Preckel B, Schlack W. (2005) The effects of anaesthetics on the myocardium – new insights into myocardial protection *Eur J Anaesthesiol* 22:647-657

Wu C, Yan L, Depre C, Dhar SK, Shen YT, Sadoshima J, Vatner SF, Vatner DE. (2009) Cytochrome c oxidase III as a mechanism for apoptosis in heart failure following myocardial infarction. *Am J Physiol Cell Physiol.* 297(4):C928-34

Yang X-M, Downey JM, Cohen MV (2003) Multiple, brief coronary occlusions during early reperfusion protect rabbit hearts by activation of ERK and production of nitric oxide. *Circulation (Suppl)* 108:158

Yang X-M, Downey JM, Cohen MV (2004 b) Postconditioning's protection is not dependent on circulating blood factors or cells but requires P13-kinase and guanylyl cyclase activation. *Circulation* 110:III-168

Yang XM, Krieg T, Cui L, Downey JM, Cohen MV (2004 c) NECA and bradykinin at reperfusion reduce infarction in rabbit hearts by signaling through PI3K, ERK, and NO. *J Mol Cell Cardiol* 36:411–421

Yang XM, Philipp S, Downey JM, Cohen MV. (2005) 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.* 100(1):57-63.

Yang XM, Proctor JB, Cui L, et al. (2004 a) Multiple, brief coronary occlusions during early reperfusion protect rabbit hearts by targeting cell signaling pathways *J Am Coll Cardiol* 44:1103-1110

Yellon DM, Baxter GF (1999) Reperfusion injury revisited: is there a role for growth factor signaling in limiting lethal reperfusion injury? *Trends Cardiovasc Med.* 9(8):245-9.

Yellon DM, Hausenloy DJ (2005) Realizing the clinical potential of ischemic preconditioning and postkonditioning *Nat Clin Pract Cardiovasc Med.* 2(11):568-75.

Yellon DM, Hausenloy DJ. (2007) Myocardial reperfusion injury. *N Engl J Med.* 357(11):1121-35.

Yogarathnam JZ, Laden G, Guvendik L, Cowen M, Cale A, Griffin S. (2008) Pharmacological preconditioning with hyperbaric oxygen: can this therapy attenuate myocardial ischemic reperfusion injury and induce myocardial protection via nitric oxide? *J Surg Res.* 149(1):155-64.

Yogarathnam JZ, Laden G, Guvendik L, Cowen M, Cale A, Griffin S. (2007) Can hyperbaric oxygen be used as adjunctive heart failure therapy through the induction of endogenous heat shock proteins? *Advances in Therapy.* 24(1):106–118.

Yogarathnam JZ, Laden G, Madden LA, Seymour AM, Guvendik L, Cowen M, Greenman J, Cale A, Griffin S. (2006) Hyperbaric oxygen: a new drug in myocardial revascularization and protection? *Cardiovascular Revascularization Medicine.* 7(3):146–154.

Ytrehus K, Myklebust R, Mjos OD (1986) Influence of oxygen radicals generated by xanthine oxidase in the isolated perfused rat heart. *Cardiovasc Res* 20:597–603

Yu, F., White, S.B., Zhao, Q., and Lee, F.S. (2001). HIF-1a binding to

VHL is regulated by stimulus-sensitive proline hydroxylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 9630–9635.

Yusuf S, Dagenais G, Pogue J, Bosch J, Sleight P The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study investigators. (2000) Vitamin E supplementation and cardiovascular events in high risk patients. *N Engl Med* 342:154-160

Zatta AJ, Kin H, Lee G, Wang N, Jiang R, Lust R, Reeves JG, Mykytenko J, Guyton RA, Zhao ZQ, Vinten-Johansen J (2006) Infarct-sparing effect of myocardial postconditioning is dependent on protein kinase C signalling. *Cardiovasc Res* 70:315–324

Zhao H, Wang Y, Wu Y, Li X, Yang G, Ma X, Zhao R, Liu H. (2009) Hyperlipidemia does not prevent the cardioprotection by postconditioning against myocardial ischemia/reperfusion injury and the involvement of hypoxia inducible factor-1alpha upregulation. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 41(9):745-53.

Zhao HX, Wang XL, Wang YH, Wu Y, Li XY, Lv XP, Zhao ZQ, Zhao RR, Liu HR. (2010) Attenuation of myocardial injury by postconditioning: role of hypoxia inducible factor-1alpha. *Basic Res Cardiol*. 105(1):109-18.

Zhao JL, Yang YJ, You SJ, Cui CJ, Gao RL. (2007) Different effects of postconditioning on myocardial no-reflow in the normal and hypercholesterolemic mini-swines. *Microvasc Res*. 73(2):137-42.

Zhao Z-Q, Clark KL, Wang N-P, Velez DA, Guyton RA, Vinten-Johansen J (2000) Comparison of AMP579 and adenosine in inhibition of cell-cell interaction between human neutrophil and vascular endothelial cell. *Drug Devel Res* 49:266–272

Zhao ZQ, Corvera JS, Halkos ME, et al. (2003) Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285:H579-588

Zhao Z-Q, Sato H, Williams MW, Fernandez AZ, Vinten-Johansen J (1996) Adenosine A2-receptor activation inhibits neutrophil-mediated injury to coronary endothelium. *Am J Physiol (Heart Circ Physiol)* 271:H1456–H1464

Zhao Z-Q, Todd JC, Sato H, Vinten-Johansen J (1997) Adenosine A2-mediated cardioprotection during reperfusion does not involve KATP channel activation. *Am J Physiol (Heart Circ Physiol)* 273:H1677–H1678

Zhu M, Feng J, Lucchinetti E, Fischer G, Xu L, Pedrazzini T, Schaub MC, Zaugg M (2006) Ischemic postconditioning protects remodeled myocardium via the PI3K-PKB/Akt reperfusion injury salvage kinase pathway. *Cardiovasc Res* 72:152–162

Zhu XY, Rodriguez-Porcel M, Bentley MD, Chade AR, Sica V, Napoli C and Caplice N, et al. (2004) Antioxidant intervention attenuates myocardial neovascularization in hypercholesterolemia. *Circulation* 109: 2109–2115.

Zweier JL, Flaherty JT, Weisfeldt ML (1987) Direct measurement of free radicals generated following reperfusion of ischemic myocardium. *Proc Natl Acad Sci* 84:1404–1407

X. DANKSAGUNG

Ich danke Herrn Univ.-Prof. Dr. med. vet. Stangassinger für die Übernahme der Dissertation an der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München und seine freundliche Unterstützung bei der Fertigstellung der Arbeit.

Mein Dank gilt Univ.-Prof. Dr. med. Hehrlein und Dr. med. Arab der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg für die Überlassung des Themas, die gute Betreuung, die gewährte Hilfestellung und die Schaffung einer angenehmen Arbeitsatmosphäre im Labor. Meinen Mitdotorandinnen danke ich für die gute Zusammenarbeit.

Meinen Eltern und meinen Brüdern danke ich für moralische und tatkräftige Unterstützung, Motivation, Verständnis und Geduld.

Meinem Freund Michael Stetter danke ich, dass er mir seit Jahren in allen Lebenslagen zur Seite steht.