

Aus der Chirurgische Klinik und Poliklinik der  
Ludwig-Maximilians-Universität München  
Direktor: Prof. Dr. med. W. Mutschler

**Kardioprotektive Effekte der Calpaininhibition im myokardialen  
Ischämie- und Reperfusionsmodell am Schwein**

Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität in München

vorgelegt von  
Matthias Pollhammer  
aus München

2007

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Matthias Siebeck
Mitberichterstatter:	PD. Dr. med. C. Reithmann
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. Dr. h.c. K. Meßmer
Mitbetreuung durch promovierten Mitarbeiter:	Dr. Philipe N. Khalil
Dekan:	Prof. Dr. med. D. Reinhard
Tag der mündlichen Prüfung:	20.12.2007

Meinen Eltern

## Danksagung

Ich bedanke mich bei Dr. med. Philippe Khalil für die ausgezeichnete Betreuung und Zusammenarbeit und die geduldige Lehre, Prof. Dr. med. Matthias Siebeck für die intensive Begleitung und Beratung, Prof. Dr. med. Fritz für seinen Rat und Vermittlungen, Dr. Maurice Khalil für den brüderlichen Einsatz und den Tierpflegerinnen und Tierpflegern der ZVH der LMU München für die außerordentliche Betreuung unserer Patienten.

Die hier vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom 13. Januar 2001 bis zum 27. März 2003 unter der Leitung von Prof. Dr. Matthias Siebeck an der Chirurgischen Klinik und Poliklinik, Klinikum Innenstadt der Ludwig-Maximilians-Universität München durchgeführt.

Hiermit erkläre ich, dass ich diese Arbeit selbstständig verfasst, keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die Arbeit nicht an anderer Stelle eingereicht habe.

München, den 26.2.2007

# Inhalt

1	Einleitung.....	5
1.1	Die Koronare Herzerkrankung .....	5
1.2	Calpaine, Aufbau und Einteilung.....	8
1.3	Calpaine, Vorkommen und Bedeutung .....	10
1.4	Calpaine, Aktivierung und Hemmung .....	12
1.5	Calpaine und Ischämie .....	14
1.6	Calpaine und therapeutische Inhibition .....	15
2	Material und Methoden.....	18
2.1	Vorbereitung und Narkoseeinleitung .....	19
2.2	Operatives Vorgehen .....	20
2.3	Monitoring .....	23
2.4	Ischämie- und Reperfusionskriterien .....	26
2.5	Präparation des entnommenen Herzens.....	26
2.6	Definition der myokardialen Regionen.....	29
2.7	Photographie und Planimetrie .....	31
2.8	Mikromorphometrische Korrelation der histochemischen Ergebnisse ...	33
2.9	In Situ Darstellung der apoptotischen Zellen .....	34
2.10	Protokoll der Wirkstoffverabreichung.....	34
2.11	Zielgrößen und Voraussetzungen .....	36
2.12	Gruppengröße .....	36
2.13	Validierung des Versuchsprotokolls .....	37
2.14	Statistik .....	37
3	Ergebnisse .....	38
3.1	Validierung des Versuchprotokolls .....	38
3.2	Arrhythmien.....	38
3.3	Effekte der Calpaininhibition auf die Globale Hämodynamik.....	39
3.4	Effekte der Calpaininhibition auf die Infarktgröße .....	42
3.5	Präparation des explantierten Herzens.....	44
3.6	Mikromorphometrische Korrelation .....	45
3.7	In Situ Nachweis apoptotischer Zellen.....	46

---

4	Diskussion .....	47
5	Zusammenfassung.....	52
6	Literatur .....	54

# 1 Einleitung

## 1.1 Die Koronare Herzerkrankung

Die koronare Herzerkrankung (KHK), deren Ursache in der Arteriosklerose der Koronargefäße liegt, stellt derzeit die häufigste Todesursache in westlichen Ländern dar. In Deutschland leiden etwa 5-10% der Bevölkerung an einer KHK, wobei Männer wesentlich häufiger betroffen sind als Frauen. An den Folgen der KHK sterben in Deutschland etwa 163000 Menschen pro Jahr. Epidemiologische Studien der vergangenen Jahre konnten eine Reihe von Risikofaktoren für die Entstehung der Arteriosklerose identifizieren. Hierzu zählen neben dem Diabetes mellitus, der Hypercholesterinämie und Hyperurikämie, der arterielle Hypertonus, der Nikotinabusus und die Adipositas. Die klinischen Manifestationen der KHK sind neben der stabilen- und instabilen Angina pectoris die stumme Myokardischämie und der akute Myokardinfarkt. Hinzu kommen die Herzinsuffizienz und Rhythmusstörungen, einschließlich dem plötzlichen Herztod.

Im Rahmen der Arteriosklerose kommt es zu einer Lumeneinengung der epikardial verlaufenden Herzkranzgefäße und damit zu einer Behinderung des koronaren Blutflusses, in dessen Folge sich eine Myokardischämie und der Myokardinfarkt durch die Unterversorgung des Herzmuskels mit Sauerstoff entwickeln können. Das häufigste Leitsymptom der KHK ist die belastungsabhängige Angina pectoris; Ruheschmerzen hingegen gelten allgemein als prognostisch ungünstiger.

Histologisch kommt es im Verlauf des Myokardinfarktes zunächst zu einem ischämiebedingtem Zellödem nach etwa 30-60 Minuten und im weiteren Verlauf zu einer Homogenisierung mit konsekutiver Verklumpung des Sarkoplasmas. Bereits 4-6 Stunden nach Ischämiebeginn ist die Myokardnekrose voll entwickelt und histologisch

durch Verlust der Querstreifung und der Kernzeichnung gekennzeichnet. Im Anschluss daran entwickelt sich zunächst ein hämorrhagischer-, später ein leukozytärer Randsaum. Im weiteren Verlauf kommt es zu einer Organisation des Myokardinfarktes mit Abbau der Nekrose von der Peripherie zum Zentrum des Infarktes und dem Ersatz durch Granulationsgewebe was nach Wochen zu der Ausbildung einer amotilen Herzmuskelschwiele führt, die aus Kollagenfasern und eingeschlossenen Fettzellen besteht. Insbesondere experimentelle Untersuchungen konnten zuletzt nachweisen, dass es neben der Entwicklung einer Nekrose auch zu apoptotische Veränderungen im Rahmen des Myokardinfarktes kommt.

In der Diagnostik des akuten Myokardinfarktes stehen neben der typischen Klinik, die Enzymdiagnostik (CK, CK-MB, Troponin I, etc.), das 12-Kanal Elektrokardiogramm (EKG) und die Koronarangiographie im Vordergrund. Die Grundlagen der Standardtherapie des akuten Myokardinfarktes bestehen derzeit im Wesentlichen aus der Sicherung der Vitalfunktionen mit Überwachung von EKG und Blutdruck, der psychischen Abschirmung durch Sedierung und der Gabe von Sauerstoff. Acetylsalicylsäure (ASS) wird zur Thrombozytenaggregationshemmung und Nitrate zur Entlastung des Herzens eingesetzt. Bei starken Schmerzen kommen Opiate zur Analgesie zum Einsatz. Falls keine Kontraindikationen vorliegen werden zusätzlich Betablocker eingesetzt, die das Risiko von Kammerflimmern senken und die Gesamtletalität günstig beeinflussen. Rhythmusstörungen und die Linksherzinsuffizienz gehören zu den häufigsten akut behandlungsbedürftigen Komplikationen des Herzinfarktes.

Die Reperfusionstherapie, an deren erster Stelle die akute perkutan transluminale Koronarangioplastie (PTCA) steht, führt zu einer deutlichen Abnahme von Infarktgröße (87), EKG-Veränderungen, Blutspiegeln der Creatininkinase MB, LDH,

(3) und vor allem zu einer verminderten Abnahme der Herzfunktion und damit der Mortalität (1;74). Im weiteren Therapieverlauf können dann, je nach Befund noch aortokoronare Bypass-Operationen folgen.

Etwa 30% aller Herzinfarktpatienten versterben innerhalb der ersten 24 h vor Erreichen des Krankenhauses, zuzüglich besteht eine Krankenhausletalität von etwa 10%.

Nicht zuletzt dieser Umstand hat in den vergangenen Jahrzehnten zu enormen weltweiten Forschungsaktivitäten geführt, was nicht nur wesentlich zu einem besseren Verständnis der Pathogenese des Myokardinfarktes auf molekularer Ebene führte, sondern auch in der Entwicklung einer Vielzahl pharmakologischer Substanzen mündete. So finden heutzutage eine Reihe von Substanzen in der Akut- und Primärtherapie des Myokardinfarktes, sowie in der Sekundärprophylaxe dessen Komplikationen erfolgreich Verwendung. Hierzu zählen neben ASS, Betablockern, Angiotensin-Converting-Enzym (ACE) Hemmern auch Nitrate, Kalziumantagonisten, Lipidsenker und Antioxidantien (2;31;101).

Neben diesen zum Teil seit Jahren etablierten Therapeutika gibt es jedoch auch Ansätze direkt in die Infarktkaskade therapeutisch einzugreifen und somit das Myokard vor den drohenden Ischämieschäden zu schützen. Unter dieser so genannten Kardioprotektion versteht man die Eigenschaft einer Substanz die Größe eines akuten Myokardinfarkts oder die perioperative Infarzierung zu vermindern und so die Spätfolgen im Sinne einer ausgeprägten Herzinsuffizienz und das Auftreten ventrikulärer Arrhythmien zu minimieren (47), um letztendlich eine geringere Mortalität zu erreichen. Exemplarisch seien hier die Cariporide erwähnt.

Cariporide sind  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austausch-Hemmer und führen zu einem Abfall der intrazellulären Natriumkonzentration. Der Austausch von extrazellulärem Natrium mit

intrazellulärem Kalzium resultiert in einer verminderten intrazellulären Kalziumkonzentration. Einer erhöhten intrazellulären Kalziumkonzentration wird die Aktivierung von zahlreichen Mechanismen zugesprochen, die letztendlich den Zellmechanismus stören und zum Untergang der Zelle führen können. Klinische Studien zeigten den Effekt der Infarktgrößenreduktion (82). Andere Substanzen dieser Gruppe hatten jedoch nicht die gleiche Wirkung und zeigten teilweise sogar ein erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Zwischenfälle (42-44;46;116).

Eine weitere Stoffgruppe stellen die Calpaine dar, die seit einigen Jahren Gegenstand intensiver Forschungstätigkeit und Grundlage der vorliegenden experimentellen Arbeit sind.

## **1.2 Calpaine, Aufbau und Einteilung**

Calpaine sind kalziumaktivierte neutrale Cysteinproteasen, die ubiquitär vorkommen und 1964 erstmals von Guroff beschrieben wurden. Seit ihrer Identifizierung konnte eine Vielzahl unterschiedlicher Calpaine entdeckt und einer Position im Stammbaum der so genannten Calpain-Superfamilie (siehe unten) zugeordnet werden.

Im Mittelpunkt der Calpain-Forschung im humanen Organismus standen bisher die als konventionell bezeichneten ubiquitären  $\mu$ -, m- und  $\mu$ /m- Calpaine, benannt nach der jeweils zur proteolytischen Aktivierung in vitro benötigten mikromolaren bis millimolaren Mengen von Kalziumionen (37). Daneben fand man aber auch eine Vielzahl von gewebespezifischen Calpainen, so zum Beispiel das skelettmuskelspezifische Calpain p94, das plazentaspezifische Calpain CAPN6 und das linsenspezifische Calpain Lp82 (90).

Calpain-Homologa wurde unter anderem in *Drosophila melanogaster* (19), *Schistosoma mansoni* (4), sowie in *Aspergillus* (20) identifiziert.

Strukturanalytische Untersuchungen zeigen, dass sich die konventionellen Calpaine aus einer katalytischen, großen (80kD) und einer regulatorischen, kleinen (30kD) Untereinheit zusammensetzen. Die große Untereinheit kann in 4 Domänen (I-IV) und die kleine in 2 Domänen (V und IV') unterteilt werden, wie in Abbildung 1 dargestellt (34).

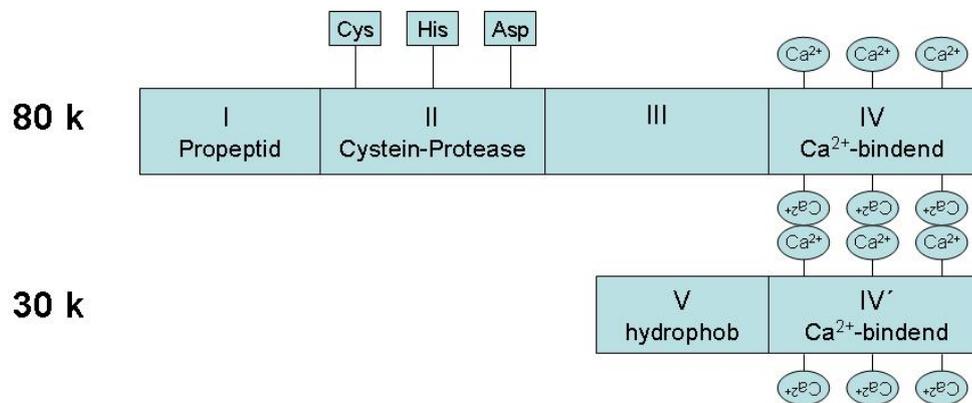


Abbildung 1: Schematischer Calpainaufbau

Der Domäne II mit katalytischen Cystein-, Histidin- und Asparaginresten wird dabei die proteolytische Aktivität und den Domänen IV und IV' die Kalziumsensitivität und Kalziumbindung zugeschrieben. Die Domäne I gilt als Propetid und als Inhibitor der proteolytischen Domäne II und kann durch N-terminale Autolyse aktiviert werden. Die glycinreiche Domäne V der kleinen Calpain-Untereinheit wird wegen ihrer hydrophoben Eigenschaften für das Zusammenspiel mit Phospholipiden und so mit Membranen verantwortlich gemacht. Eine Interaktion und damit die Bildung der

heterodimeren Struktur der beiden Untereinheiten kommt zum einen durch die Kalzium bindende Funktion der Domänen IV und IV' sowie durch intensive hydrophobe Wechselwirkungen zustande (18;68).

Die unter dem Begriff der Calpain-Superfamilie zusammengefassten Homologa werden anhand ihres molekularen Aufbaus und des jeweiligen Abweichens von der oben beschriebenen Struktur klassifiziert. Zum einen werden die Homologa zur großen Calpain-Untereinheit, welche sich im Aufbau der Domäne II annähernd gleichen ansonsten aber teilweise stark unterscheiden und zum anderen die Homologa zur kleinen Untereinheit respektive zu den Domänen IV und IV' in zwei grundsätzliche Gruppen unterschieden. Innerhalb dieses Schemas können die einzelnen Calpaine noch weiter bezüglich ihres Expressionsmodus oder ihres Vorkommens bei Vertebraten oder Nonvertebraten eingeteilt werden (71;93). Diese Klassifikation bezeichnet Calpaine deren große Untereinheit aus allen vier oben genannten Domänen bestehen, so zum Beispiel auch die bereits genannten  $\mu$ -, m- und  $\mu$ /m-Calpaine, als typisch und alle anderen als atypisch.

### **1.3 Calpaine, Vorkommen und Bedeutung**

Calpaine sind ubiquitär vorkommende Proteasen, die an einer Reihe von zellulären Prozessen wie Zellteilung (77) und Zelldifferenzierung (104), Zellwachstum (56), Zellzyklusregulation (15) sowie am Proteinumsatz beteiligt sind. Grundlegend scheinen sie durch posttranslationale Modifikation eine Änderung der Lokalisation, Integrität und Aktivität von endogenen Proteinen herbeizuführen (109).

Für Calpaine sind in der Vergangenheit eine Vielzahl von Substraten identifiziert worden, von denen in Tabelle 1 nur einige geläufige Beispiele der verschiedenen Proteingruppen genannt werden können:

1. Zytoskelett-/Strukturproteine	Dystrophin
	Spectrin ( $\alpha$ und $\beta$ )
	Troponin I und T
2. Integrale Membranproteine	adrenerger Rezeptor
	G-Protein
	PDGF-Rezeptor
3. Enzyme des Zytosols	Calcium-ATPase
	HMG-CoA Reduktase
	Proteinkinase C
4. Metabolische Enzyme	Glykogensynthase D
5. Transkriptionsproteine und nukleare Enzyme	c-Myc
	NF-kappa B
6. Extrazelluläre Enzyme	Faktor V
	Von Willebrand-Faktor
7. Andere	Calpastatin
	p53
	Thyreoglobulin

Tabelle 1: Substratgruppen und Beispiele

Über die physiologische Relevanz der Calpaine sind in der letzten Zeit vielseitige Erkenntnisse gesammelt worden, jedoch konnte ihnen noch keine allgemeine Stellung bzw. Funktion innerhalb der verschiedenen Organismen zugeordnet werden. So scheinen die verschiedenen Calpaine der Calpain-Superfamilie unterschiedliche Funktionen zu übernehmen, abhängig von ihrer Gewebespezifität (90) und ihrer Lokalisation innerhalb der Zellen (40;70).

Auch bei der Pathogenese einer Vielzahl von Erkrankungen wird eine Beteiligung von Calpaine angenommen. Eine Reihe von Untersuchungen konnte zeigen, dass im Pathomechanismus der Duchenne-Muskeldystrophie (79) und der Beckengürtelmuskeldystrophie eine Mutation im Calpain 3-Gen eine entscheidende Rolle spielt (80). Zudem gibt es Hinweise auf eine Beteiligung von Calpainen bei neurodegenerativen Erkrankungen wie den M. Alzheimer (59) oder M. Parkinson

(61), bei neuronalen ischämischen Prozessen (111) und traumatischen Ereignissen im Bereich des ZNS (12). Mittlerweile ist auch eine Rolle von Calpainen bei malignen Prozessen auf der Ebene des Zellremodeling und der Zellmigration in Diskussion (13;14).

#### **1.4 Calpaine, Aktivierung und Hemmung**

Der genaue Mechanismus der Calpainaktivierung wird derzeit noch kontrovers diskutiert (32;95;108). Im Zytosol liegt Calpain als inaktives Proenzym vor, das für seine Aktivierung Kalziumionen benötigt (89). So konnte gezeigt werden, dass zur Aktivierung von  $\mu$ -Calpain in vitro eine Kalziumkonzentration von 10-100  $\mu$ M und von m-Calpain sogar von 150-800  $\mu$ M nötig sind (100). Da diese Konzentrationen in vivo jedoch nie erreicht werden, wird postuliert, dass Kalzium nur einer von mehreren Kofaktoren für die Aktivierung darstellt und weitere Mechanismen zur Erhöhung der Kalziumsensitivität führen (94). Hierzu zählen die Autolyse des Calpains im Sinne einer Abspaltung von Aminosäuren vom N-terminalen Ende der beiden Untereinheiten (7). Da aber die Autolyse von Calpain auch durch weit höhere Kalziumkonzentrationen ausgelöst wird, bleibt fraglich ob sie grundsätzlich der Sensitivitätserhöhung oder der Aktivierung der proteolytischen Funktion dient (103). Dennoch gibt es Untersuchungen, die den Calpainen auch ohne Autolyse proteolytische Funktionen zuschreiben (60). Neueste Ergebnisse zeigen auch eine Beziehung von Autolyse und Dissoziation der beiden Calpainuntereinheiten, wobei die kalziumabhängige Dissoziation erst nach Abspaltung des N-terminalen Endes stattfindet (113).

Derzeit wird die dissoziierte große Untereinheit als aktive in vivo Form angesehen (95). Untersuchungen haben diesbezüglich ergeben, dass die 80 kD (respektive

76kD) Untereinheit im Gegensatz zur kleinen Untereinheit nach Dissoziation die vollständige proteolytische Aktivität behält. Allerdings hat auch die nicht-dissoziierte Form eine enzymatische Funktion (114).

Die Aufklärung der Bindungsfähigkeit von Calpain an Phospholipide und damit an Membranen bei der Thrombozytenaggregation hat den Vorgang der Translokation des Calpains an Zellmembranen in die Aktivierungsdiskussion eingeführt (24;83). Hinweise zeigen, dass dieser kalziumabhängige Prozess über Elemente des Glykoprotein IIb-IIIa-Zytoskelett-Komplexes an der Calpainaktivierung beteiligt ist (25). Es sind Proteine identifiziert worden, die die zur Calpainaktivierung nötige Kalziumkonzentration reduzieren, wobei der genaue Mechanismus diesbezüglich noch unklar zu sein scheint (57;58). Grundlegend besteht anscheinend auch die Möglichkeit einer erhöhten Calpainexpression, gemessen an erhöhten m-RNA-Spiegeln, was unter anderem bei beta-adrenerger Stimulation (73) und bei Zelldifferenzierungsprozessen (16) nachgewiesen werden konnte.

Der physiologische, spezifische, intrazelluläre Inhibitor des Calpains ist das Calpastatin (68;69). Calpastatin besitzt eine Masse von ca. 80kD, eine gering ausgeprägte Sekundärstruktur und eine hohe Resistenz gegenüber äußeren Einflüssen wie Hitze und Säuren (98).

Sein Aufbau ähnelt dem des Calpain: 4 Domänen mit je drei Regionen A, B und C plus einer Domäne L, die wahrscheinlich die Bindung von Calpastatin an Membranen vermittelt (36;55;96). In den vergangenen Jahren konnten ähnlich dem Calpain eine Reihe von speziensspezifischen als auch gewebespezifischen Calpastatinen identifiziert werden. Die inhibitorische Aktivität wird den 4 Domänen mit ihren Regionen A, B und C zugeschrieben, wobei jede Domäne ein Calpainmolekül binden kann (35). Dabei tritt die Region B als inhibitorisches Zentrum auf, die beiden

anderen Regionen verstärken die hemmende Aktivität (39). Die Wirkung des Calpastatins entfaltet sich über zwei Mechanismen. Zum einen wird die oben beschriebene Aktivierung des Calpains durch autolytische Konversion und zum anderen die proteolytischen Funktion des bereits aktivierten Calpains gehemmt (97). Letzteres geschieht durch kompetitive Bindung der Region B unmittelbar neben dem katalytischen Zentrum des Calpains (18).

Das Zusammenspiel von Calpastatin und Calpain in vivo ist noch nicht abschließend geklärt. Einerseits verlangt die Bindung von Calpastatin an Calpain die Präsenz von Kalziumionen (17), andererseits ist das Calpastatin ein Substrat des Calpains (63). Eine Chelatbildung durch Zufuhr von EDTA zum Beispiel führt zur Lösung der eingegangenen Verbindung und zur vollständigen Wiederherstellung der inhibitorischen Funktion des Calpastatins und der proteolytischen Funktion des Calpains.

Zusätzlich werden verschiedene Modelle diskutiert, die unter anderem auch der Präsenz von Aktivatorproteinen oder der Bindung von Calpain an Membranen eine Bedeutung schenken (54;76).

## **1.5 Calpaine und Ischämie**

Im Rahmen von ischämischen Prozessen kommt es in Zellen zu einer Reihe von Veränderungen, die letztendlich zur Degeneration der Zelle, Apoptose und Nekrose führen können. So kommt es zum Beispiel am Myokard durch den reduzierten Blutfluss zur Akkumulation von Stoffwechselprodukten, vor allem von  $H^+$ ,  $NADH^+$ ,  $CO_2$  und Laktat (64). Einem damit verbundenem Absinken des zellulären pH-Wertes wird mit Hilfe der  $Na^+/H^+$ -Austauscher entgegengewirkt. Diese transportieren die  $H^+$ -Ionen aus der Zelle heraus, sowie  $Na^+$ -Ionen in die Zelle, was im weiteren Verlauf zu

einem Ansteigen der intrazellulären Natriumkonzentration führt (26;27;106). Es folgt der Austausch von intrazellulärem Natrium mit extrazellulärem Kalzium über Kalziumkanäle und  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Transporter, in Verbindung mit der reduzierten Funktion von ATP-abhängigen Transportern, was zu einer erhöhten intrazellulären Kalziumkonzentration (48;91;92) und die wiederum zur Aktivierung von zahlreichen Proteasen führt, darunter auch die Calpaine (102).

Jedoch ist die Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration nur ein Mechanismus in der Kaskade der Calpainaktivierung. Zusätzlich kommt es bei Hypoxie zur autolytischen Konversion des Calpains, was, wie oben beschrieben, ein Schlüsselereignis der Calpainaktivierung darstellt (67). Zusammenfassend kann von einer Überaktivierung von Calpainen bei Hypoxie ausgegangen werden (11). Es wird postuliert, dass in Anbetracht der Tatsache, dass zu den Substraten der Calpaine unter anderem Zytoskelettproteine, Membranproteine, Transkriptionsfaktoren und mehrere regulatorische Enzyme gehören (s.o.), diese Überaktivierung zum Untergang von Zellen führt (84).

## **1.6 Calpaine und therapeutische Inhibition**

Die oben genannten Erkenntnisse über die Mechanismen zur Calpainaktivierung und deren Auswirkungen auf zelluläre Strukturen und Vorgänge führten rasch zum Wunsch nach einer effektiven Hemmung des Calpains zu therapeutischen Zwecken. Der Einsatz des physiologischen Antagonisten Calpastatin, der eine hohe Spezifität und Affinität zum Calpain aufweist scheidet auf Grund seines hohen Molekulargewichts aus. Verabreichtes Calpastatin ist nicht zellgängig, was in den vergangenen Jahren zur Synthetisierung einer Reihe von Calpaininhibitoren geführt

hat und diese in verschiedenen experimentellen Ansätzen auf ihre funktionelle und therapeutische Wirkung hin überprüft wurden.

So konnte zum Beispiel mit Hilfe eines Inhibitors die Ausbildung einer oxidativen Katarakt vermindert werden oder in Degenerationsmodellen das Überleben von Motoneuronen verbessert werden (41;110). Die meisten Ergebnisse und auch größten Erfolge liegen derzeit jedoch im Bereich der Neurodegeneration und Neuroprotektion vor. Eine deutliche protektive Wirkung eines Calpaininhibitors konnte bei zerebralen Ischämie/Reperusionsmodellen ebenso wie bei neurodegenerativen Prozessen dargestellt werden. So konnten Bartus et al. durch eine postischämische Applikation eines Inhibitors eine neuroprotektive Wirkung bei fokalen zerebralen Ischämien erreichen und postulierten einen ähnlichen Effekt bei neurodegenerativen Erkrankungen (9;10). Schon 1986 beschrieben Tolnai und Kollegen eine kalziumabhängige Proteolyse im Myokard der Ratte und deren Inhibition in Ischämie/Reperusionsmodellen. Später veröffentlichten Iwamoto et al. und Saito et al. Ergebnisse ihrer Untersuchungen mit spezifischen Calpaininhibitoren in Ischämie/Reperusionsmodellen am Rattenherzen. Iwamoto zeigte erste Erfolge des Calpaininhibitor I. Dieser wurde den Ratten vor einer 30-minütigen Ischämie und einer anschließenden 6-stündigen Reperusionsphase intravenös verabreicht und konnte die Infarktgröße nach Beendigung des Versuchs um 50% reduzieren (38). Saito et al konnten eine weitere kardioprotektive Wirkung des selben Inhibitors im isoliert perfundierten Rattenherzen zeigen, die sich zudem auch in einer verminderten Freisetzung spezifischer Enzyme wieder fand (85). Neuere Untersuchungen mit dem wasserlöslichen membranpermeablen und selektiven Calpaininhibitor A-705253 zeigten eine Reduktion beider Calpain-Isoformen in einem Rattenmodell (52;86). Neuhof et al. zeigten schließlich eine myokardiale und mitochondriale Protektion in

einem postischämischen Reperfusionmodell am isolierten Herzen. Dennoch fehlt der Nachweis über die Wirksamkeit dieses Inhibitors A-705253 (Abbott, Ludwigshafen, Deutschland (52)) bezüglich der funktionellen und morphologischen Kardioprotektion in einem Großtiermodell. Die vorliegende Arbeit soll in einer randomisierten vehikel-kontrollierten Studie die kardioprotektiven Effekte bei regionaler myokardialer Ischämie und Reperfusion am intakten Schweineherzen zeigen. Insbesondere soll eine durch die Calpaininhibition bedingte Reduktion des Infarktareals und der damit verbundenen verbesserten globalen Hämodynamik untersucht werden.

## 2 Material und Methoden

Die Tierversuche wurden nach Genehmigung des Tierversuchantrages durch die zuständigen Behörden der Regierung von Oberbayern nach dem Tierschutzgesetz (TierSchG) i.d.F. vom 25.05.1998 in München unter dem Aktenzeichen 211-2531-64/2000 durchgeführt und folgen den Richtlinien des *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* der *US National Institutes of Health* (NIH Publication No. 85-23, i.d.F. von 1996).

Die nachfolgenden Versuche fanden in der Zentralen Versuchstierhaltung (ZVH) der Ludwig-Maximilians-Universität (LMU) München unter kontrollierten Bedingungen statt. Als Ischämie/Reperusionsmodell wurden Deutsche Hausschweine verwendet, die vom Lehr- und Versuchgut der Tiermedizinische Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München in Oberschleissheim, Deutschland bezogen wurden. Die Versuchstiere erreichten in Kleingruppen 5-7 Tage vor Versuchsbeginn die Versuchstierhaltung und wurden erst nach einer entsprechenden Eingewöhnungszeit in die Versuche aufgenommen. Neben dem freien Zugang zu Wasser und Trockenfutter wurde ein regelmäßiger 12 Stunden Tag-Nacht-Rhythmus und eine konstante Temperatur eingehalten. Am Vorabend des Versuches wurde den Tieren der freie Zugang zu Trockenfutter, nicht aber zu Trinkwasser entzogen. Bei Lieferung lag das Körpergewicht der Tiere zwischen 18 und 22 kg. Es wurden Schweine beiderlei Geschlechts verwendet, die sich bei Versuchsbeginn alle in bestem Gesundheitszustand befanden.

## 2.1 Vorbereitung und Narkoseeinleitung

Am Versuchstag wurde das für den Versuch vorgesehene Schwein zunächst durch eine intramuskuläre Injektion prämediziert. Dazu wurde 10 bis 15 Minuten vor Einleitung der Narkose eine Kombination aus Azaperon (Stresnil-Janssen<sup>®</sup>, Janssen-Cilag GmbH, Neuss, Deutschland), in einer Dosis von 1,8-2,2 mg/kg KG, Ketamin (Ketavet<sup>®</sup>, Pharmacia & Upjohn, Erlangen, Deutschland) in einer Dosis von 14,0-17,0 mg/kg KG und Atropin (Atropinsulfat., Fresenius Kabi GmbH, Bad Homburg, Deutschland) in einer Dosis von 0,01 mg/kg KG mittels einer Kanüle intramuskulär in den Nacken appliziert. Nach ausreichender Sedierung folgte die Identifizierung des Schweins anhand der Ohrnummer, die Bestimmung des Geschlechts und des Gewichts, sowie der Transfer des Tieres in den Operationssaal. Zur Einleitung der intravenösen Narkose wurde zunächst eine 21-G Venenverweilkanüle in eine laterale Ohrvene gelegt und ein Bolus aus 6,0µg/kg KG Fentanylidihydrogencitrat (Fentanyl I<sup>®</sup>, Curamed Pharma GmbH, Karlsruhe, Deutschland) und 0,4mg/kg KG Midazolam (Midazolam-ratiopharm<sup>®</sup>, Ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland) verabreicht. Im Anschluss daran wurde die orotracheale Intubation (Mallinckrodt<sup>®</sup> oral/nasal I.D 6,0 – 7,5, Mallinckrodt Medical, Athlone, Irland) durchgeführt und das Versuchstier kontrolliert, mechanisch beatmet (900C Ventilator, Siemens Elema AB, Solne, Schweden). Danach folgte die Lagerung des Schweins in Rückenlage auf dem Operationstisch und Fixierung durch Mullbinden an allen vier Extremitäten. Durch die anschließende kontinuierlichen Infusion von 25,0µg/kg/h Fentanyl und 1,0mg/kg/h Midazolam wurde die Narkose aufrechterhalten. Zur Überwachung der Narkosetiefe und einer ausreichenden Analgesierung fand eine kontinuierliche Überwachung der Herzfrequenz und deren Veränderung auf intermittierend gesetzte Schmerzreize, sowie Abwehrbewegungen des Versuchstieres statt. Eine Antikoagulation erfolgte

durch eine Dauerinfusion von unfraktioniertem Heparin (Liquemin Roche<sup>®</sup>, Roche, Basel, Schweiz) in einer Dosis von 100 IU/kg/h. Die Körpertemperatur wurde mittels einer rektalen Sonde kontinuierlich überwacht und durch eine Lagerung des Tieres auf einer Heizmatte in den physiologischen Grenzen gehalten. Zur Regulation des Flüssigkeitshaushaltes während des Experimentes wurde in der ersten Stunde 500 ml und anschließend 250 ml/h Elektrolytlösung (Tutofusin<sup>®</sup>, Pharmacia GmbH, Erlangen, Deutschland) intravenös verabreicht.

## **2.2 Operatives Vorgehen**

Zunächst erfolgte die Kanülierung der rechten Leistengefäße. Nach Hautinzision und Darstellung der Femoralgefäße, wurden dazu die Femoralarterie und -vene angeschlossen, inzidiert und jeweils ein 18-G Katheter (12cm, Baxter GmbH, Unterschleißheim, Deutschland) platziert. Die Medikamenten- und Flüssigkeitsapplikation erfolgte über den venösen Zugang, während der arterielle Katheter der kontinuierlichen Registrierung des Blutdruckes und der Entnahme der Blutproben diente. Zur Urinableitung und Bilanzierung wurde anschließend über eine Minilaparatomie eine Zystostomie durchgeführt und ein 14-F Blasenkatheter (Cystofix Charrier 10, Braun, Melsungen, Deutschland) fixiert.

Zum invasiven kardiovaskulären Monitoring wurden im Anschluss daran die rechtsseitigen Halsgefäße nach Inzision und Darstellung kanüliert. Über die Halsvene erfolgte die Platzierung eines zweilumigen Zentralen Venenkatheters (Arrow<sup>®</sup> International, Reading, PA, USA) zur kontinuierlichen Messung des zentralen Venendruckes, während in der Arteria Carotis communis eine Schleuse angebracht wurde. Über diese Schleuse wurde zur Registrierung der

linksventrikulären Funktion ein 5-F Mikro-Tip<sup>®</sup> Katheter (Millar Inc., USA) in den linken Ventrikel vorgeschoben. Nach Sicherstellung einer ausreichenden Analgosedierung erfolgte die Applikation von Pancuroniumbromid (Pancuronium Curamed<sup>®</sup>, CuraMed Pharma GmbH, Karlsruhe, Deutschland) in einer Dosis von 0,2 mg/kg KG/h zur neuromuskulären Blockade.

Die nun folgende Thorakotomie erfolgte über eine mediane Sternotomie. Anschließend konnte ein Thoraxspreitzer eingebracht und der Restthymus präpariert werden. Der medianen Eröffnung des Perikards folgte das Anlegen mehrerer Hochnähte, mit denen das Perikard zwischen dem eröffneten Thorax aufgespannt wurde und das nun freiliegende Herz tragen konnte. Über das linke Herzohr wurde ein Katheter in den linken Vorhof zur kontinuierlichen Messung des linksatrialen Druckes eingebracht und durch eine Tabaksbeutelnaht fixiert. Mit Abschluss dieses Operationsschrittes war das Ende der operativen Präparation mit dem in Abbildung 2 dargestellten Situs erreicht und eine 30 bis 60 minütige Ruhephase folgte.

Nach ausreichender Stabilisierung der Herzkreislauffunktion konnten die physiologischen Basiswerte erhoben werden.

Zur Induktion einer temporären linksventrikulären Ischämie wurde der Ramus interventrikularis anterior der Arteria coronaria sinistra (left anterior descending artery = LAD) nach Abgang des ersten Diagonalastes temporär verschlossen. Ziel war ein möglichst großes und konstantes Ischämiegebiet, bei geringer Mortalität zu erhalten. Hierzu erfolgte zunächst die Erhebung des individuellen Koronarstatus, sowie die Vermessung der LAD-Gesamtlänge. Die LAD selbst wurde nicht freipräpariert, sondern lediglich im perivaskulären Fettgewebe sorgfältig und ohne Verletzung des Myokards und der Arterie mit einer 3-0 Naht (Vicryl<sup>®</sup>, Ethicon, Deutschland) ohne weitere Manipulation unterstochen. Die beiden Enden des Fadens konnten dann in

einen Silikonschlauch mit 2,8 mm Durchmesser eingefädelt und unter vorsichtiger Kompression bis zum Verschluss der Arterie zugezogen werden.

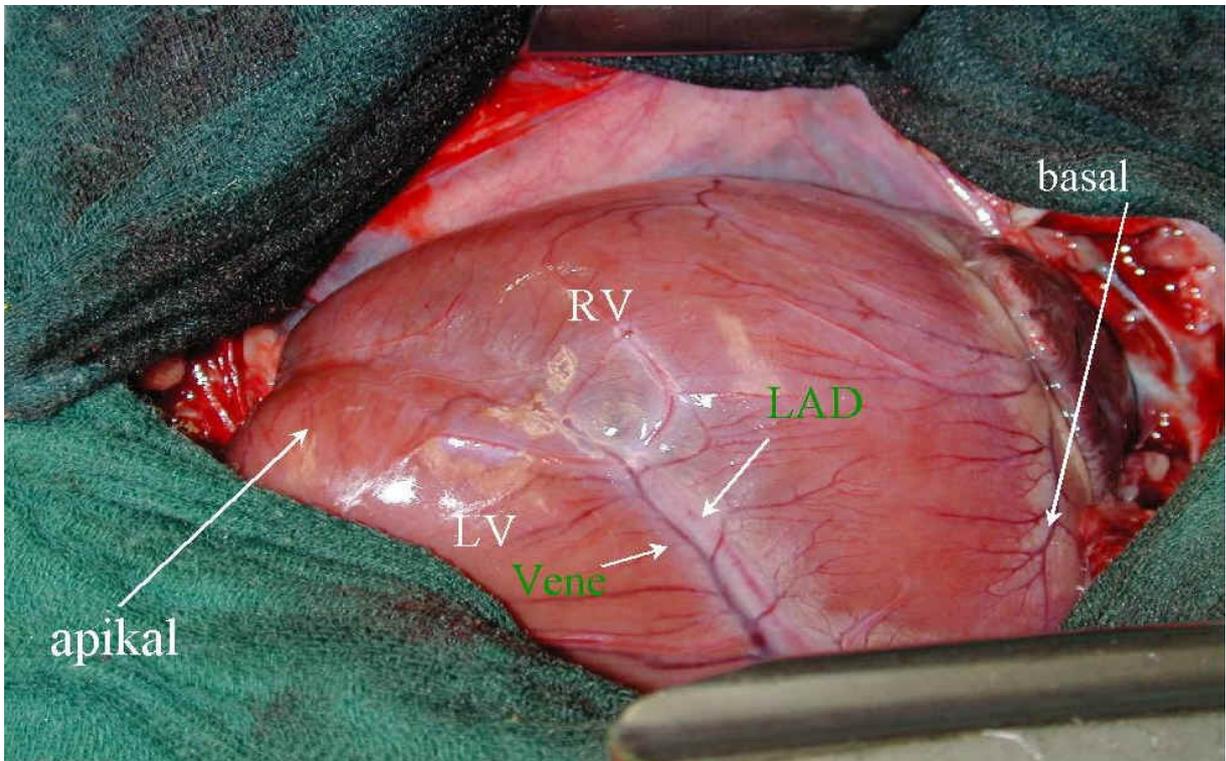


Abbildung 2: Operativer Situs nach Abschluß der Präparationsphase. Gekennzeichnet sind der rechte Ventrikel (RV), der linke Ventrikel (LV), der Ramus interventricularis anterior der Arteria coronaria sinistra (LAD) und die parallelverlaufende Vene.

Diese Phase der Ischämie wurde für 45 Minuten aufrechterhalten. Die Einleitung der anschließenden Reperfusionphase erfolgte durch vorsichtiges Wiedereröffnen der Ligatur. Während der ersten Reperfusionsminuten wurden zur Prophylaxe eines LAD-Vasospasmus intermittierend einige Tropfen Lidocainhydrochlorid (Xylocain® 1%, Astra Zeneca GmbH, Wedel, Deutschland) auf die Stelle der LAD appliziert, an der die Manipulationen zu deren Verschluss durchgeführt worden sind.

Während des Versuches aufgetretene Kammer- oder Vorhoffarrhythmien wurden nicht medikamentös behandelt. Jedoch wurde die Möglichkeit der direkten

Defibrillation herangezogen um ventrikuläres Flimmern zu beenden. Mit pädiatrischen Defibrillationspaddeln konnten dazu mehrere Defibrillationsversuche mit aufsteigenden Energien (10 bis 30 Joules) durchgeführt werden (CodeMaster 100, Hewlett Packard, CA, USA). Dazu wurden die Paddels strikt außerhalb der *area at risk* platziert, um eine mögliche Schädigung des oberflächlichen Myokards und somit eine akzidentielle Vergrößerung des Infarktareals zu verhindern.

Nach sechs Stunden Reperfusion wurde das Versuchstier in tiefer Analgosedierung mittels Infusion von 20%iger Kaliumchloridlösung getötet und das Herz entnommen. Abbildung 3 zeigt den schematischen Überblick eines Versuches von der Einleitung und Präparation bis zum Ende der Reperfusion.



Abbildung 3: Zeitliche Übersicht eines Versuches

## 2.3 Monitoring

Während des Versuches unterlagen folgende Parameter einer kontinuierlichen Messung: der aortale Blutdruck, der linksatriale Druck, der linksventrikuläre Blutdruck und dessen erste Ableitung  $dP/dt_{\max}$  (RS Transducer and –Differentiator, Gould-Statham Instruments, USA), der zentrale Venendruck, Standard EKG, rektale Körpertemperatur, die Sauerstoffsättigung über ein Pulsoxymeter und, zur Überwachung der Ventilation, der endexpiratorische  $CO_2$ -Gehalt und die

Atemfrequenz. (Statham<sup>®</sup> Pressure Transducer, Viggo-Spectramed, Ohmeda, Deutschland; Sirecust Monitor Einheit, Siemens, Deutschland).

Der aortale Blutdruck wurde über den in der Leistenarterie plazierten Katheter kontinuierlich gemessen und wenn nötig durch Veränderung der Flüssigkeitszufuhr oder durch kurzzeitige Kopf-Tief-Lagerung des Versuchstieres reguliert. Der zentrale Venendruck konnte über einen Katheter in der Vena jugularis kontinuierlich gemessen werden. Sank dieser unter 5 cm H<sub>2</sub>O wurde die Flüssigkeitszufuhr ebenfalls erhöht. Ein Standard-3-Kanal-EKG (Sirecust 402 Monitor, Siemens, München, Deutschland) wurde an der Brust und den Extremitäten des Tieres befestigt und die Veränderungen besonders nach Beginn der Ischämie- und Reperfusionphase aufgezeichnet und im Verlauf beobachtet. Beim Auftreten von Komplikationen wie Kammerflimmern oder elektromechanischer Entkoppelung wurde damit der Erfolg der durchgeführten Defibrillation kontrolliert. Zum Monitoring der Ventilation wurde an der Zunge des Tieres ein Pulsoxymeter angebracht und in Kombination mit der Überwachung des endexpiratorischen CO<sub>2</sub>-Gehaltes konnte bei Absinken der Sauerstoffsättigung der O<sub>2</sub>-Gehalt gesteigert oder bei Schwankungen des CO<sub>2</sub>-Gehaltes die Atemfrequenz oder die Atemvolumina adaptiert werden. Blutgas- und Elektrolytanalysen wurden während des Versuches zu festgelegten Zeitpunkten durchgeführt und je nach Bedarf durch weitere ergänzt. Dazu wurden arteriell Blutproben entnommen und sofort mit Hilfe eines I-STAT<sup>®</sup> portable clinical analyser (I-Stat Corporation, East Windsor, NJ, USA) analysiert (siehe Tabelle 2). Gemessen und überprüft wurde der Elektrolythaushalt mit Natrium-, Kalium- und Chloridkonzentrationen, Hämatokrit und Hämoglobin, die activated clotting time (ACT) zur Überwachung der Heparinisierung, sowie Blutgasanalysen mit pO<sub>2</sub>, pCO<sub>2</sub>, Bikarbonat und Baseexcess. Bei Bedarf wurde die Kaliumkonzentration korrigiert,

eine Pufferung mit Natriumbikarbonatlösung zur Vermeidung einer Azidose vorgenommen und verlorenes Volumen substituiert.

1.	1 Minute nach arteriellem Zugang
2.	10 Minuten vor Sternotomie
3.	10 Minuten vor Beginn der Ischämie
4.	nach 20 Minuten Ischämie
5.	nach 40 Minuten Ischämie
6.	nach 45 Minuten Ischämie
7.	nach 15 Minuten Reperfusion
8.	nach 30 Minuten Reperfusion
9.	nach 60 Minuten Reperfusion
10.	nach 120 Minuten Reperfusion
11.	nach 180 Minuten Reperfusion
12.	nach 240 Minuten Reperfusion
13.	nach 300 Minuten Reperfusion

Tabelle 2: Entnahmezeitpunkte der arteriellen Blutanalysen.

Als eine der wichtigsten Zielgrößen in der vorliegenden Studie wurde die linksventrikuläre Kontraktilität angesehen. Diese wurde als erste Ableitung des linksventrikulären Blutdrucks über den im linken Ventrikel platzierten 5-F Mikro-Tip<sup>®</sup> Katheter (Millar Inc., USA) gemessen und mit Hilfe des Statham<sup>®</sup> Pressure Transducer (Viggo-Spectramed, Ohmeda, Deutschland; Sirecust Monitor Einheit, Siemens, Deutschland) berechnet und während des Versuches im Verlauf aufgezeichnet.

## 2.4 Ischämie- und Reperfusionskriterien

Zur Beurteilung einer suffizienten Ischämie nach Verschluss der LAD wurden folgende Kriterien herangezogen:

- kein residueller Blutfluss im Verlauf der LAD distal der Okklusion
- kein sichtbarer Kollateralfluss in die *area at risk* nach LAD-Verschluss
- Abblassen des Myokards in der *area at risk*
- prästenotische Dilatation der LAD
- Reduktion der sichtbaren myokardialen Kontraktilität

Daraus ergaben sich auch die Kriterien, die nach dem Öffnen der Ligatur für eine suffiziente Reperfusion erfüllt sein mussten:

- Wiederaufnahme des Blutflusses in der LAD distal der Okklusionsstelle
- Rückgang der prästenotischen Dilatation
- Rekoloration des Myokards in der *area at risk*

## 2.5 Präparation des entnommenen Herzens

Nach der Explantation des Herzens wurden die rechte und die linke Koronararterie inklusive eines kleinen Sicherheitsabstandes um das jeweilige Koronaratrium aus der Aortenwand herauspräpariert und jeweils mit einer Metallkanüle versehen (2.0mm, Portex Ltd., Hythe Kent, England), die zwischen 5 und 10 Millimetern in die Gefäße eingeführt und mit einem Tourniquet gesichert wurden. Über diese beiden Zugänge konnte das Herz mit insgesamt 1,0 l einer 0,9-prozentigen NaCl-Lösung gespült werden. Um die *area at risk* vom übrigen Myokard abzugrenzen wurde die

LAD im Anschluss mit der verbliebenen Ligatur wieder verschlossen. Mit einer 10ml-Spritze konnte jetzt die 0,5-prozentige Evans Blue Lösung (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) über die eingebrachten Kanülen, unter druckkontrollierten Bedingungen (100 mmHg), infundiert, und die *non risk region* blau angefärbt werden. Die Perfusion von Evans Blue wurde gestoppt, wenn eine vollständige Färbung dieser Region erreicht war. Die Abbildung 4 veranschaulicht den Zustand des explantierten Herzens vor und nach Färbung mit Evans Blue-Lösung.

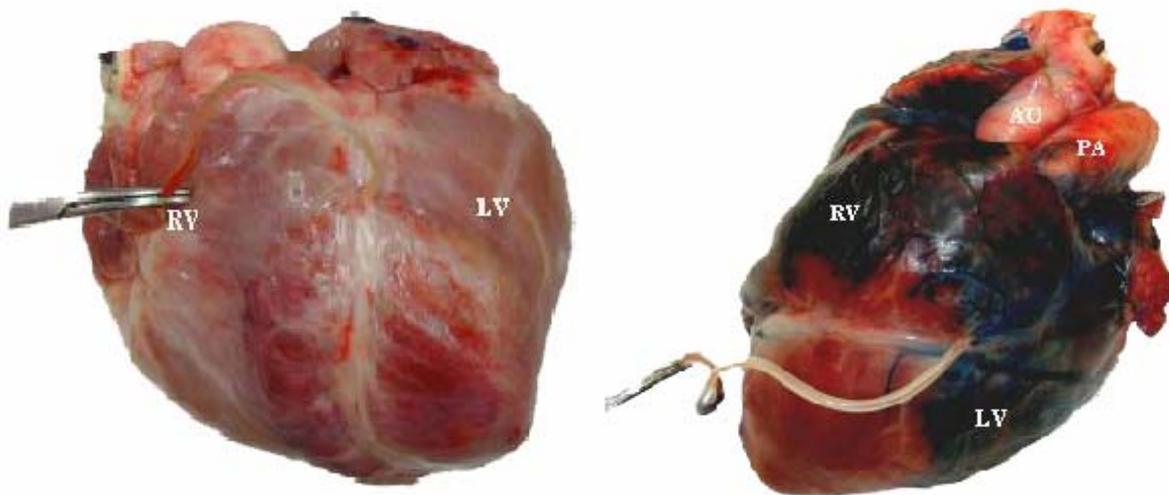


Abbildung 4: Explantiertes Herz mit Ligatur vor (links) und nach Färbung mit Evans Blue (rechts). (LV: linker Ventrikel, RV: rechter Ventrikel, PA: Pulmonalarterie, AO: Aorta)

Im nächsten Schritt wurden die Koronarien am Coronaratrium mit einer 3-0 Vicryl-Naht ligiert, das linke und das rechte Atrium eröffnet und mit 0,9-prozentiger NaCl-Lösung gespült, um eine Verunreinigung durch überschüssige Farblösung zu vermeiden. Während des nun folgenden 24-stündigen Gefrierzyklus bei  $-20^{\circ}\text{C}$  wurde das Herz zum Schutz vor Gefrierbrand durch das Verpacken in einen einfachen Gefrierbeutel und einer zusätzlichen Baumwollschicht geschützt. Im Anschluss daran

konnte das Herz in halbgefrorenem Zustand in 5mm dicke Scheiben geschnitten werden, von der Herzspitze bis zum atrioventrikulären Übergang.

In einem 37° C warmen, beweglichen Wasserbad wurden die Herzscheiben dann für 20 Minuten in 500ml gepuffertem (pH=7,4) TTC 10 % (2,3,5-triphenyl-tetrazolium chloride, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany) inkubiert, wobei die einzelnen Scheiben vollständig bedeckt waren und minütlich gewendet wurden. Anschließend folgte bei Zimmertemperatur die 30 minütige Fixierung in 4-prozentiger Formaldehyd-Lösung (Merck, Darmstadt, Germany). Abbildung 5 zeigt exemplarisch einen Schnitt eines auf diese Weise gefärbten Herzens.

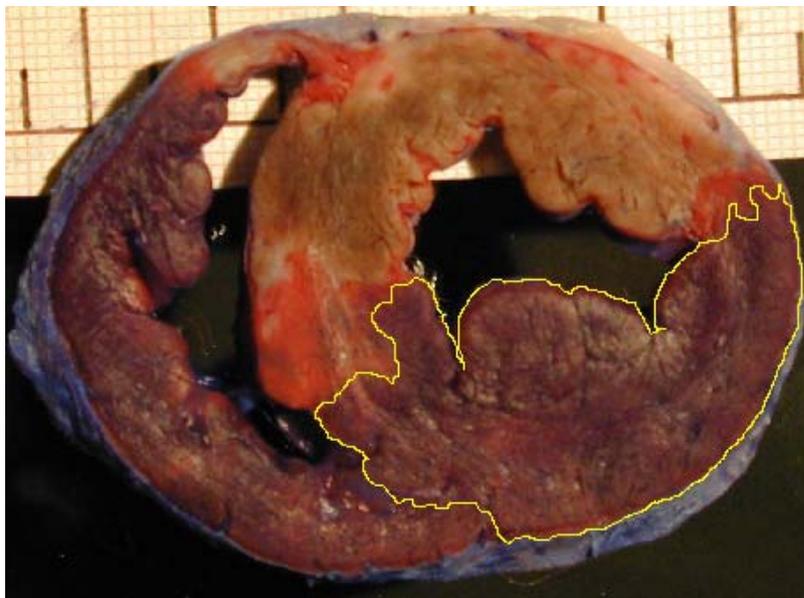


Abbildung 5: Repräsentativer Schnitt eines Herzens nach erfolgter Färbung und Präparation.

## 2.6 Definition der myokardialen Regionen

Nach oben beschriebenem Versuchsaufbau kann das Myokard in 3 verschiedene Regionen eingeteilt werden. Da in der vorliegenden Studie nur der linke Ventrikel als Messgröße in Betracht gezogen wurde, beziehen sich folgende Regionen ebenfalls nur auf diesen:

1. **Non Risk Region (NRR):** der Bereich des Myokards, der während des gesamten Experiments vollständig durchblutet wurde und so kein „Ischämierisiko“ trug. Der Versorgungsbereich der LAD proximal der Ligatur, des Ramus circumflexus der Arteria coronaria dexter (RCX) und der Arteria coronaria dexter (RCA) (Abb. 6).



2. **Area At Risk (AAR):** der Bereich des Myokards, der während der Ischämiephase nicht durchblutet wurde und so dem „Risiko“ der Ischämie ausgesetzt war. Der Versorgungsbereich der LAD distal der Ligatur (Abb. 7).



3. **Infarct Region (IR):** der Anteil der area at risk, der nach Abschluss der Reperfusionphase avital bleibt (Abb. 8).



## 2.7 Photographie und Planimetrie

Die Schnitte wurden, zusammen mit einer geeigneten Messskala, mit einer auf einem Stativ befestigten Digitalkamera (Coolpix 950, Nikon, Japan) photographiert und dann für folgende Untersuchungen (z.B. Apoptosefärbung) bei -20° C eingefroren.

Photographiert und planimetrisch vermessen wurden alle Schnitte von der Herzspitze bis einschließlich eines Schnittes oberhalb der Ligatur, wobei von allen Schnitten beide Ansichten (apikal und basal) getrennt voneinander ausgewertet wurden. Lediglich die basale Ansicht der Herzbasis und die apikale Ansicht der Herzspitze wurden ausgeschlossen.

Gegenüber dem Studienprotokoll verblindet wurde dann mit Hilfe des *Image Tool 2.0 software package* (University of Texas, San Antonio, USA) in allen diesen Herzschnitten je drei Flächen planimetrisch vermessen: die *infarct region*, die *area at risk* und die *non risk region* des linken Ventrikels (siehe Abbildungen 6-8). Aus diesen Werten wurde dann die Gesamtfläche des linken Ventrikels bestimmt. Um die Volumina dieser Größen zu erhalten wurden sie mit der Dicke der einzelnen Schnitte (5mm) multipliziert und gingen so in die Statistik ein.

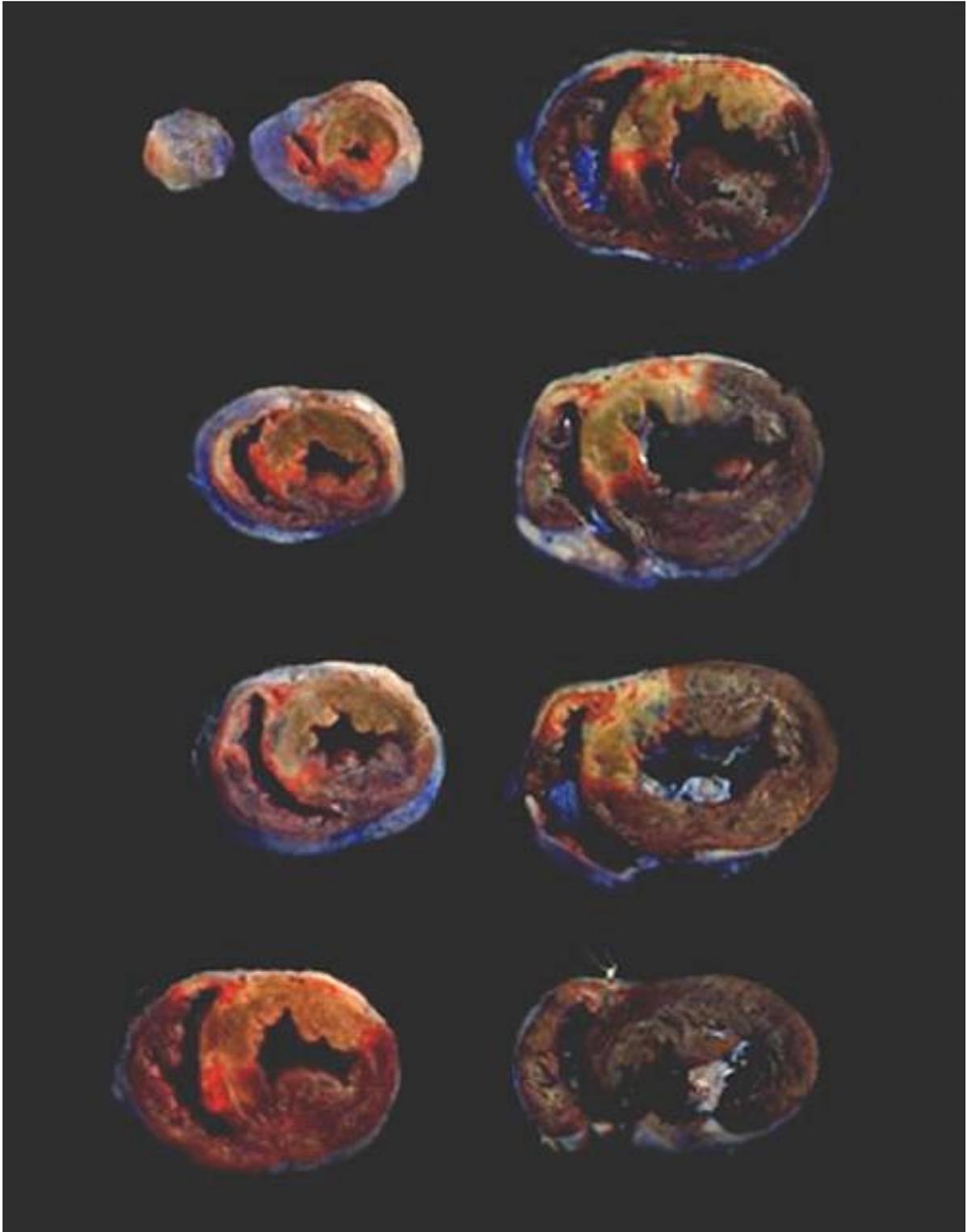


Abbildung 9: Komplettierte Schnitte eines Herzens (apikale Ansicht) nach Präparation und Färbung.

## 2.8 Mikromorphometrische Korrelation der histochemischen Ergebnisse

Um die histochemischen Ergebnisse zu überprüfen, wurden Schnitte aus insgesamt 6 Versuchen (4 aus der Verum- und 2 aus der Placeboreihe) ausgewählt und zu mikroskopischen Untersuchungen herangezogen. Aus den Übergangsbereichen *infarct region/area at risk* und *area at risk/non risk region* jedes Schnittes wurden Proben entnommen, in Paraffin eingebettet, geschnitten und mit Hämatoxylin und Eosin (HE) gefärbt. Abbildung 10 zeigt die genaue Position der Übergangsbereiche.

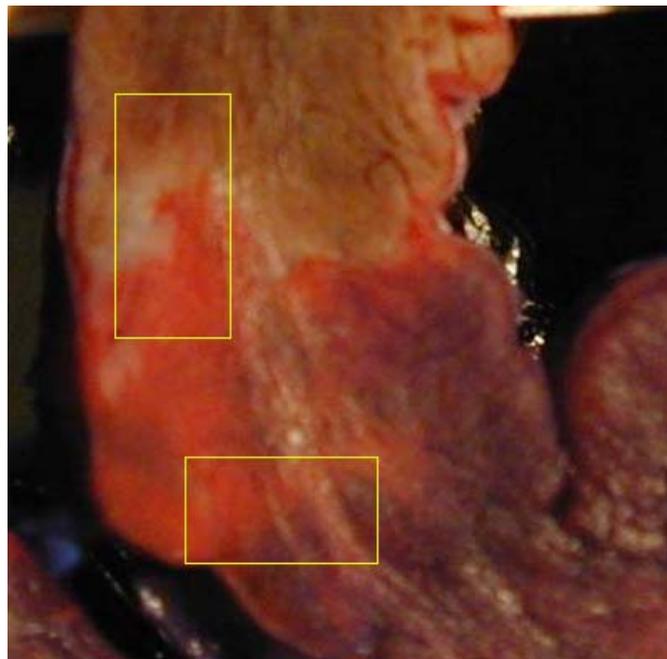


Abbildung 10: Entnahmestellen der Probeexzisionen zur histologischen Untersuchung. Gewählt wurden die Übergangsbereiche zwischen AAR und IR (oben) und AAR und NNR (unten).

## 2.9 In Situ Darstellung der apoptotischen Zellen

Über die Methode der DNA-Fragmentierung mittels Tunel-Test (ApopTag® Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit, Intergene Company, Großbritannien) konnten die bereits vorliegenden paraffinierten Schnitte auf das Vorliegen apoptotischer Zellen untersucht werden.

## 2.10 Protokoll der Wirkstoffverabreichung

Der verwendete Calpaininhibitor A-705253 (ca. 1725 Da) ist ein selektiver Ketoamidinhibitor mit einem  $K_i$ -Wert für Calpain I von 27,0nM (52).

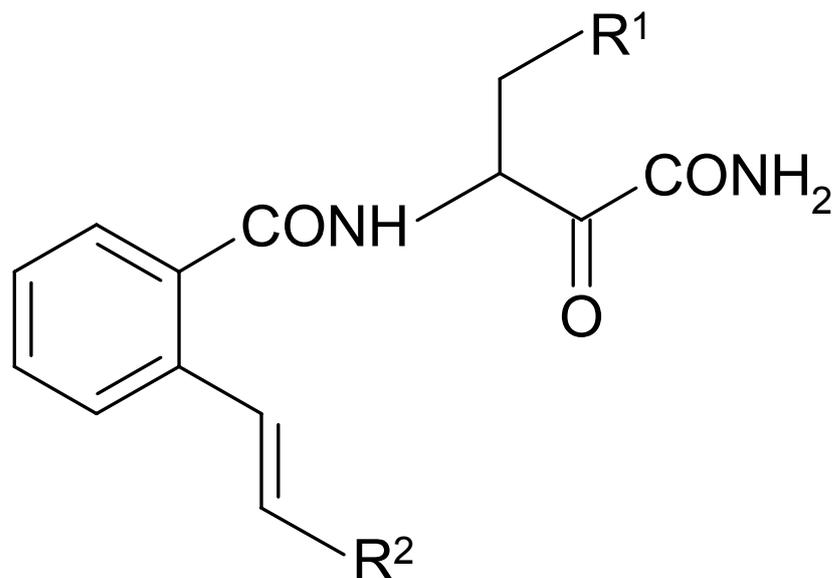


Abbildung 11: Strukturformel des Calpaininhibitors A-705253

Er wurde gemäß den Herstelleranweisungen in pyrogenfreiem, destilliertem Wasser gelöst und mit Natriumbikarbonat gepuffert. In Pilotexperimenten des Herstellers (Abbott, Ludwigshafen, Deutschland) an Deutschen Hausschweinen wurde der Plasma- und Myokardgewebespiegel von A-705253 mittels high performance liquid

chromatography (HPLC) untersucht. Der Plasmaspiegel des Inhibitors betrug eine Stunde nach intravenöser Gabe von 1mg/kg Körpergewicht 0,16 $\mu$ g/ml und nach zwei und vier Stunden 0,12  $\mu$ g/ml. Die gemessenen Gewebespiegel des Inhibitors im linken Ventrikel der Versuchstiere betragen nach einer Stunde 1,5  $\mu$ g/g, nach zwei Stunden 1,1  $\mu$ g/g, sowie nach drei Stunden 0,7  $\mu$ g/g Herzmuskelgewebe (siehe Abbildung 12). Nach Angaben des Herstellers ist ab einem Gewebespiegel von über 1,0  $\mu$ g/g von einer signifikanten Reduktion des kardialen Calpains auszugehen.

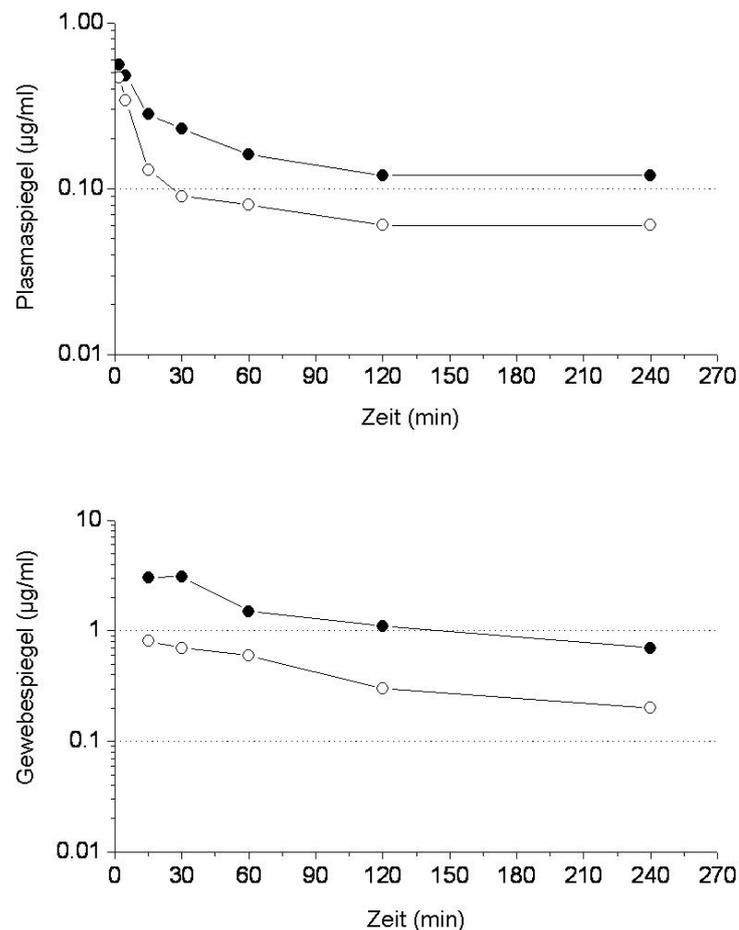


Abbildung 12: Darstellung der Konzentrationen des Calpaininhibitors A-705235 im Plasma (oben) und myokardialen Gewebe (unten) beim Deutschen Hausschwein nach intravenöser Applikation von 1,0 mg/kg (●) oder 0,3 mg/kg (○).

Die Ergebnisse dieser Pilotstudie führten zu folgender Wirkstoffverabreichung. Die Schweine der Calpaininhibitorgruppe wurde der Hemmstoff 15 Minuten vor Beginn der Ischämie in einer Dosis von 1mg/kg Körpergewicht als Bolus und zusätzlich während der Reperfusion in einer kontinuierlichen Dosierung von 1mg/kgKG/h intravenös verabreicht. Die Tiere der Placebogruppe erhielten nur den Trägerstoff. In beiden Protokollen wurde die Testlösung unmittelbar vor der Anwendung hergestellt.

## **2.11 Zielgrößen und Voraussetzungen**

Zur Beurteilung der kardioprotektiven Effekte des Calpaininhibitors A-705253 wurden folgende Zielgrößen beobachtet:

- Histochemisch: Infarktgröße
- Funktionell: linksventrikuläre Kontraktilität, globale Hämodynamik, Auftreten von ventrikulären Fibrillationen

## **2.12 Gruppengröße**

Die Gruppengröße wurde nach Daten aus eigenen vorangegangenen Versuchen am isolierten Kaninchenherzen und am Schwein und der gängigen Literatur auf 10 überlebende Tiere pro Gruppe in einem randomisierten Vergleich festgelegt.

## 2.13 Validierung des Versuchsprotokolls

Sechs Versuchstiere wurden verwendet um eine Validierung des Versuchsprotokolls zu erreichen. Bei dreien wurde der Versuch bis zur myokardialen Ischämie ohne und bei dreien mit nachfolgender Reperfusion durchgeführt um dabei den Einfluss der jeweiligen Prozedur auf die globale Hämodynamik und die resultierende Infarktgröße zu ermitteln.

## 2.14 Statistik

Die Ergebnisse der Messungen wurden auf Normalverteilung geprüft und, falls zutreffend, die Mittelwerte beider Gruppen in einem zweiseitigen t-Test verglichen und als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung dargestellt.

Die Daten der Planimetrie wurden mittels Kovarianzanalyse untersucht. Dabei wurden folgende Größen des linken Ventrikels gegeneinander aufgetragen. Das Volumen der *infarct region* gegen das Volumen der *area at risk*, sowie das Volumen der *area at risk* gegen das Gesamtvolumen des linken Ventrikels, wobei die *area at risk* bzw. der gesamte linke Ventrikel als Kovariate dienten (ANOVA (analysis of variance)).

Der Vergleich von  $dP/dt_{max}$  wurde ebenfalls mit ANOVA durchgeführt.

Erreichte ein zweiseitiger t-Test ein  $\alpha$ -Niveau von 0,5 oder weniger, wurde die Alternativhypothese abgelehnt und als statistisch signifikant eingestuft.

Für die Auswertung wurde SPSS (*Statistical Package for the Social Science*, version 10.1, USA) und für die graphische Darstellung der Ergebnisse Origin (*Software for Scientific Graphing*, Version 6.1, USA) verwendet.

### 3 Ergebnisse

Zum Zeitpunkt der Versuche waren alle 21 Tiere in gutem Gesundheitszustand. Aufgrund technischer Probleme verstarb ein Tier vor Beginn der Ischämie, die verbliebenen 20 Schweine überlebten den Versuch und konnten der Evaluation zugeführt werden.

	Calpaininhibitor A-705235	Plazebo
Tiere pro Gruppe	11	10
Tiere verstorben	1	0
Anzahl der evaluierten Tiere	10	10

Tabelle 3: Überleben

#### 3.1 Validierung des Versuchprotokolls

In den durchgeführten Vorversuchen zeigte sich die Sicherheit des operativen Vorgehens bezüglich Arrhythmien und hämodynamischen Veränderungen. Ebenso konnte der Prozess des LAD-Verschlusses ohne Induktion einer myokardialen Ischämie bzw. Nekrose vorgenommen werden. Eine auf diese Weise verschlossene LAD führte ohne Reperfusion zu einer nahezu vollständigen Infarzierung des betroffenen Myokardareals und zu einer dramatischen Abnahme der globalen Hämodynamik.

#### 3.2 Arrhythmien

Die aufgetretenen Rhythmusstörungen äußerten sich durch einen plötzlichen Anstieg der Herzfrequenz gegen Ende der Ischämie und zu Beginn der Reperfusion. In den

meisten Experimenten kam es auch zu Tachyarrhythmien, die durch die einsetzende Reperfusion induziert wurden, jedoch keiner weiteren Behandlung bedurften. Bei 2 von 10 Versuchstieren der Kontrollgruppe sowie bei 3 von 10 Tieren der Verumgruppe kam es zu Episoden ventrikulärer Fibrillationen. In all diesen Fällen konnte der Sinusrhythmus mit Hilfe der direkten Defibrillation unmittelbar wieder hergestellt werden. Die verwendeten pädiatrischen Defibrillationspaddels wurden außerhalb der *area at risk* angesetzt, um die zwischen 10 und 30 Joule starken Elektroschocks zu applizieren.

	Calpaininhibitor A-705235	Plazebo
Auftreten von Kammerflimmern	3	2
Tödliches Kammerflimmern	0	0
Nicht tödliches Kammerflimmern	3	2
davon während der Ischämie	2	1
davon während der Reperfusion	1	1
Defibrillationsversuche	7	3
Verwendete Energien (J)	10, 20, 30	10, 20

Tabelle 4: Kammerflimmern und Defibrillation

### 3.3 Effekte der Calpaininhibition auf die Globale Hämodynamik

Die Daten der globalen Hämodynamik inklusive Herzfrequenz (HF), systolischer arterieller Druck (SAD) und mittlerer Aortendruck (MAD) sowie zentralvenöser Druck (ZVD) und linksatrialer Druck (LAD) sind in Abbildung 13 zusammengefasst.

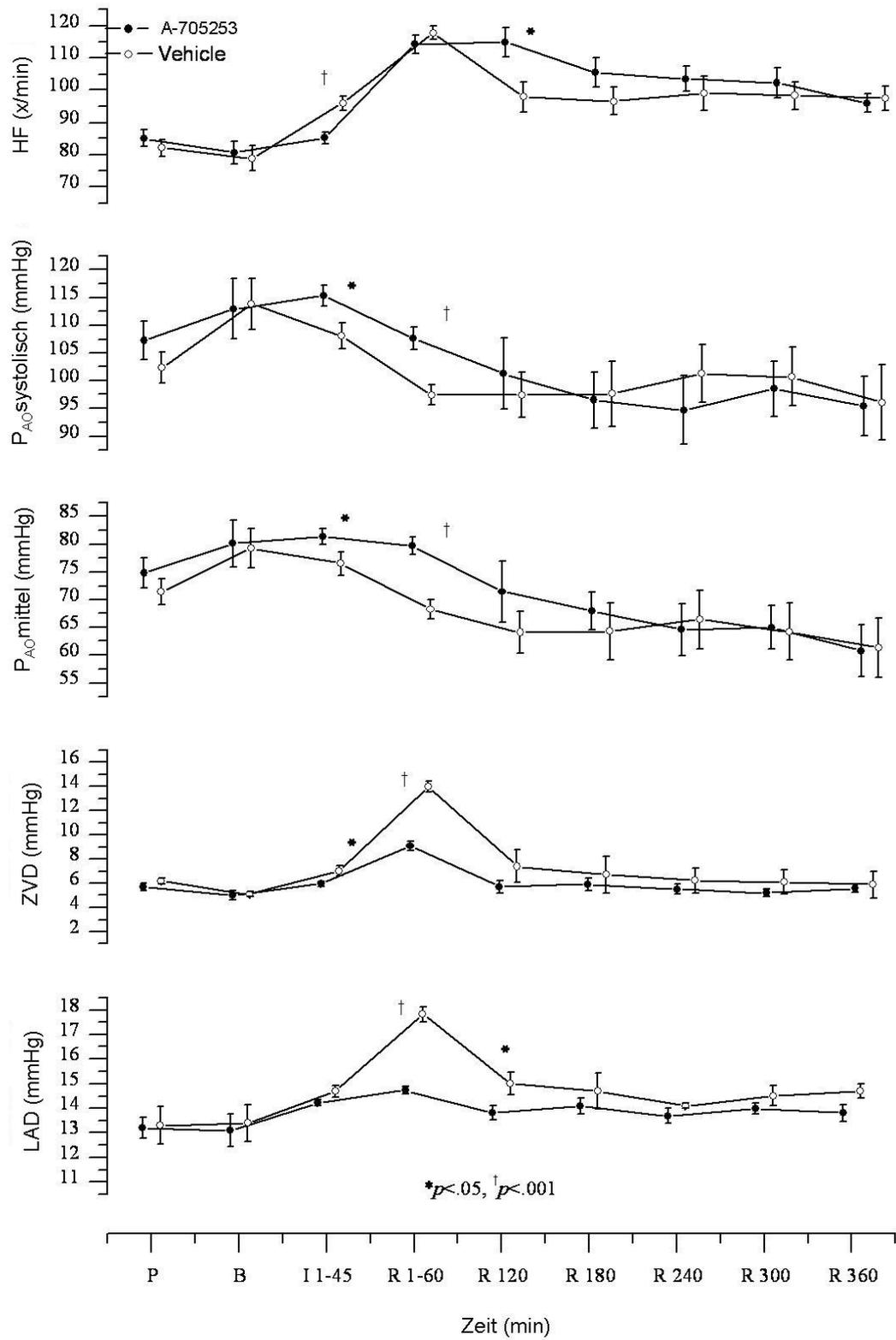


Abbildung 13: Effekte der Calpaininhibition auf die globale Hämodynamik

Während der Präparation und zum Zeitpunkt des Baseline-Wertes unterscheiden sich die Variablen beider Gruppen nicht voneinander.

Nach 45 Minuten Ischämie und 6 Stunden Reperfusion resultierte für beide Gruppen eine eingeschränkte kardiale Funktion. Folgende Beobachtungen konnten für beide Gruppen im Vergleich zum Baseline-Wert gemacht werden:

1. die HF blieb auf einem signifikant erhöhtem Niveau ( $p < .001$ )
2. SAD und MAD blieben auf einem signifikant reduziertem Niveau ( $p < .05$ )
3. ZVD und LAD erreichten nahezu den Baseline-Wert ( $p < .1$ ).

Zu Unterschieden zwischen den Gruppen kam es insbesondere während der Ischämie und den ersten beiden Stunden der Reperfusion. Der Anstieg der HF während der Ischämie fiel in der Verumgruppe geringer aus als in der Placebogruppe ( $p < 0,001$ ). Der SAD und der MAD erreichten während der Ischämie (SAD:  $p < 0,05$ ; MAD:  $p < 0,05$ ) und der ersten Stunde der Reperfusion (SAD:  $p < .001$ ; MAD:  $p < 0,001$ ) in der Behandlungsgruppe signifikant höhere Werte. Ähnliche Ergebnisse stellten sich für den ZVD und LAD jedoch zu späteren Zeitpunkten dar.

Die  $dP/dt_{\max}$  Baseline-Werte beider Gruppen unterschieden sich nicht voneinander, jedoch konnte nach 6 Stunden Reperfusion eine Reduktion von  $dP/dt_{\max}$ , als Maß für eine verminderte Kontraktilität, in beiden Gruppen ( $p < 0,001$ ) festgestellt werden und dabei mit einem signifikant höheren Wert in der Verumgruppe ( $p < 0,003$ ), (Abbildung 14).

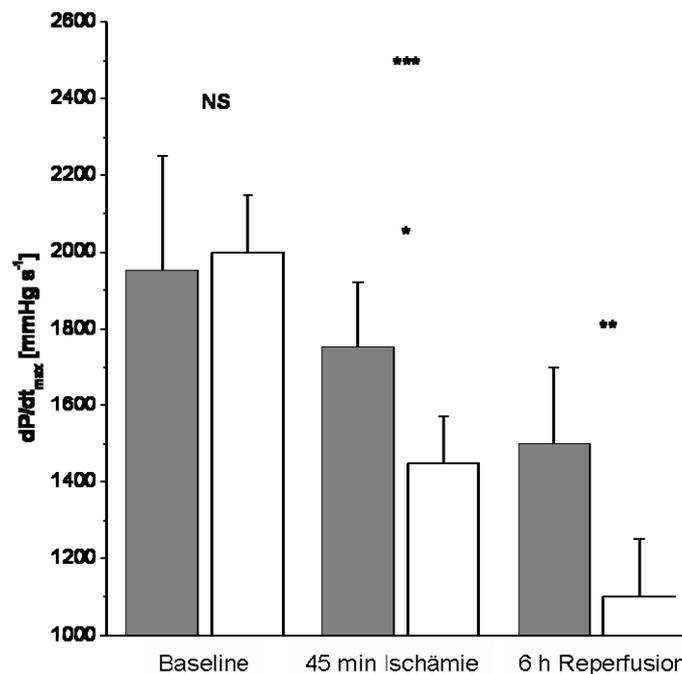


Abbildung 14: Effekt der Calpaininhibition auf die linksventrikuläre Kontraktilität nach 45 Minuten Ischämie und 6 Stunden Reperfusion (n=10). Als erste Ableitung des linksventrikulären Druckes ist  $dP/dt_{max}$  Maß für die Kontraktilität. Grau dargestellt sind die Werte des Calpaininhibitors A-705253 und weiß die der Kontrollgruppe. Die Werte werden als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben (\*\*\*)  $p > 0,001$ ; \*\*  $p > 0,003$ ; \*  $p > 0,05$ ; NS nicht signifikant).

### 3.4 Effekte der Calpaininhibition auf die Infarktgröße

Das mittlere Gewicht der Herzen der beiden Gruppen unterschied sich nicht voneinander ( $113,3 \pm 3,7$  gegen  $119,5 \pm 2,6$  g,  $p > 0,1$ ). Die Ligatur der LAD wurde im Mittel nach 44,2 Prozent ihrer Gesamtlänge ab dem Ostium vorgenommen ( $p > 0,2$ ). Die Messungen der drei verschiedenen Volumina des linken Ventrikels (*infarct region*, *area at risk* und *non risk region*), wurden an allen Schnitten mit Gewebeanteilen des linken Ventrikels durchgeführt (durchschnittlich 13,35 Schnitte

pro Herz), wobei in 9-12 Herzschnitten Anteile der *area at risk* enthalten waren. Die Volumina der linken Ventrikel der Gruppen unterschieden sich nicht ( $87,813 \pm 6,268$  gegen  $91,485 \pm 8,100 \text{ mm}^3$ ,  $p > 0,7$ ). Ebenso die Volumina der *area at risk* ( $30,254 \pm 2,269$  gegen  $29,330 \pm 3,033 \text{ mm}^3$ ,  $p > 0,8$ ). Die Volumina der *area at risk* wurden auch gegen die Volumina des linken Ventrikels aufgetragen, wobei keine Unterschiede zwischen den beiden Gruppen zu sehen waren ( $p > 0,8$ ). Die Auswertung der totalen Infarkt volumina zeigte jedoch mit einem mittleren Volumen von  $6,820 \text{ mm}^3$  in der Calpaingruppe und  $10,549 \text{ mm}^3$  in der Plazebogruppe einen signifikanten Unterschied ( $p < 0,05$ ) und verdeutlichte eine Reduktion der *infarct area* an der *area at risk* um 33% ( $p = 0,009$ ) wie in Abbildung 15 und 16 dargestellt.

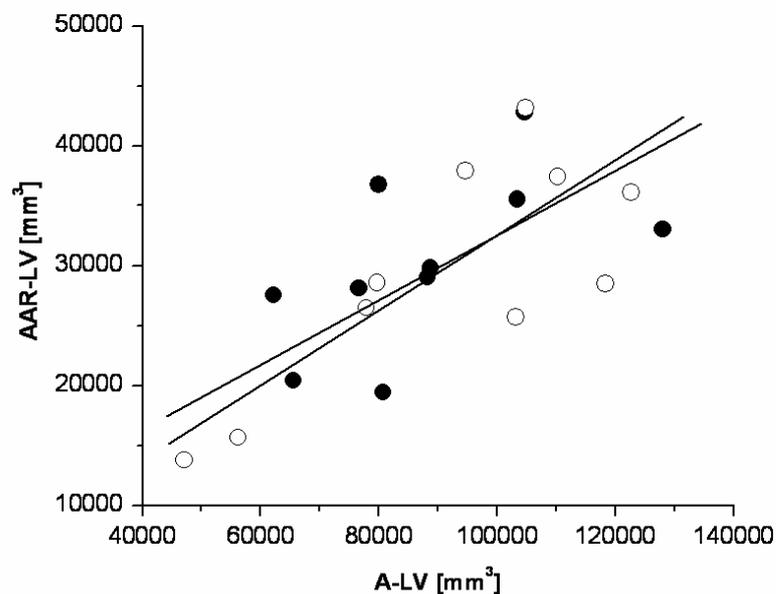


Abbildung 15: Kovarianzanalyse aller *area at risk*-Volumina gegen die Volumina des gesamten linken Ventrikels. (Calpaininhibitor A-705235  $y = 0,21x + 2366,8$ ,  $R^2 = 0,34$ ; Plazebo  $y = 0,30x + 509,1$ ,  $R^2 = 0,61$ )

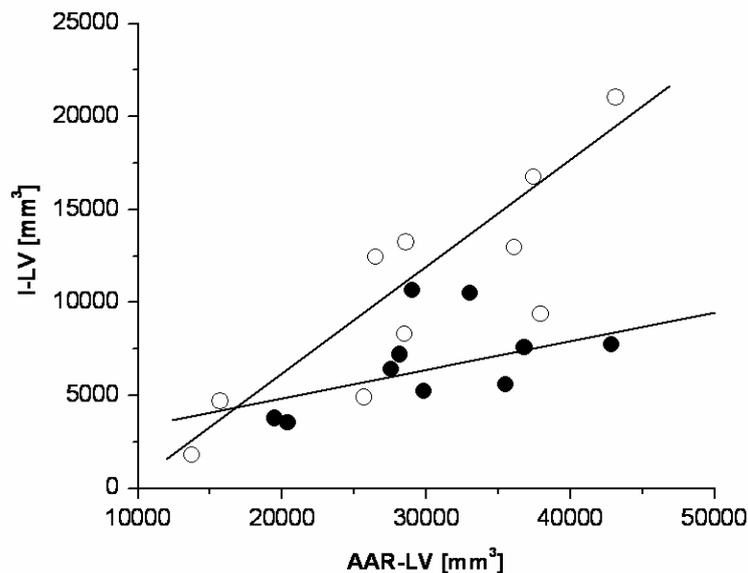


Abbildung 16: Kovarianzanalyse aller *infarct area*-Volumina gegen die Volumina der *area at risk*. (Plazebo  $y=0,52x+969,81$ ,  $R^2=0,73$ ; Calpaininhibitor A-705235  $y=0,18x+292,73$ ,  $R^2=0,27$ )

### 3.5 Präparation des explantierten Herzens

Mit der Spülung des Herzens mit 0,9-prozentiger NaCl-Lösung gelang eine nahezu vollständige Entfernung des verbliebenen intravasalen Blutes und erlaubte so eine klare Abgrenzung der *infarct region* zur *area at risk*. Das Rot des Hämoglobins kann dabei eine entscheidende Störgröße sein, weil es dem Rot der TTC-Färbung sehr ähnelt.

Die gewählte Evans Blue-Konzentration von 0,5 Prozent wurde in Vorversuchen ermittelt. Eine höhere Konzentration erbrachte keine Verbesserung der Färbeergebnisse.

Der Perfusionsdruck von 100 mmHg ermöglichte eine suffiziente Anfärbung des Herzmuskels direkt proximal der Okklusion und wurde für ca. 3 Minuten aufrechterhalten bis die epikardiale Umgebung vollständig gefärbt war. Zudem

ermöglicht die druckkontrollierte Applikation auch einen einwandfreien Vergleich durch gute Reproduzierbarkeit der Methode aller Färbungen und somit aller Herzen. Das nochmalige Spülen der eröffneten Vorhöfe mit NaCl-Lösung entfernt überschüssiges Evans Blue und verhindert beim Schneiden des Herzens eine Verunreinigung der Schnittflächen.

### 3.6 Mikromorphometrische Korrelation

Die histologische Auswertung der Übergangszonen *infarct region/area at risk* und *area at risk/non risk region* bestätigte die makroskopischen histochemischen Befunde der durchgeführten TTC-Färbung. Eine eindeutige Abgrenzung der verschiedenen Bereiche mit der gewählten Methode war möglich. Auch hatte der Einsatz des Inhibitors keinen Einfluss auf die TTC-Reaktion (Abbildung 17).

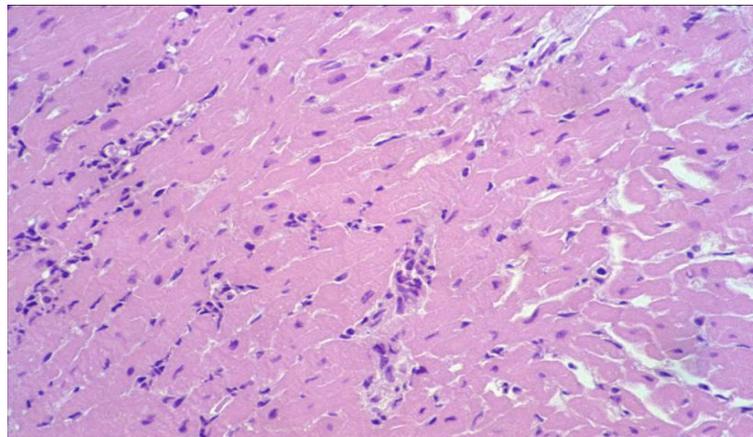


Abbildung 17: Die H/E-Färbung eines paraffin-gebetteten Schnittes aus dem Übergangsbereich *area at risk / infarct area* zeigt die leukozytäre Infiltration in der rechten Bildhälfte als Zeichen der Bildung eines leukozytären Randsaumes (Vergrößerung 400-fach).

### 3.7 In Situ Nachweis apoptotischer Zellen

Tunel-positive Zellen konnten ausschließlich in den *infarct regions* beider Gruppen gefunden werden. Eine Quantifizierung der apoptotischen Zellen zum Vergleich der beiden Gruppen wurde nicht durchgeführt.

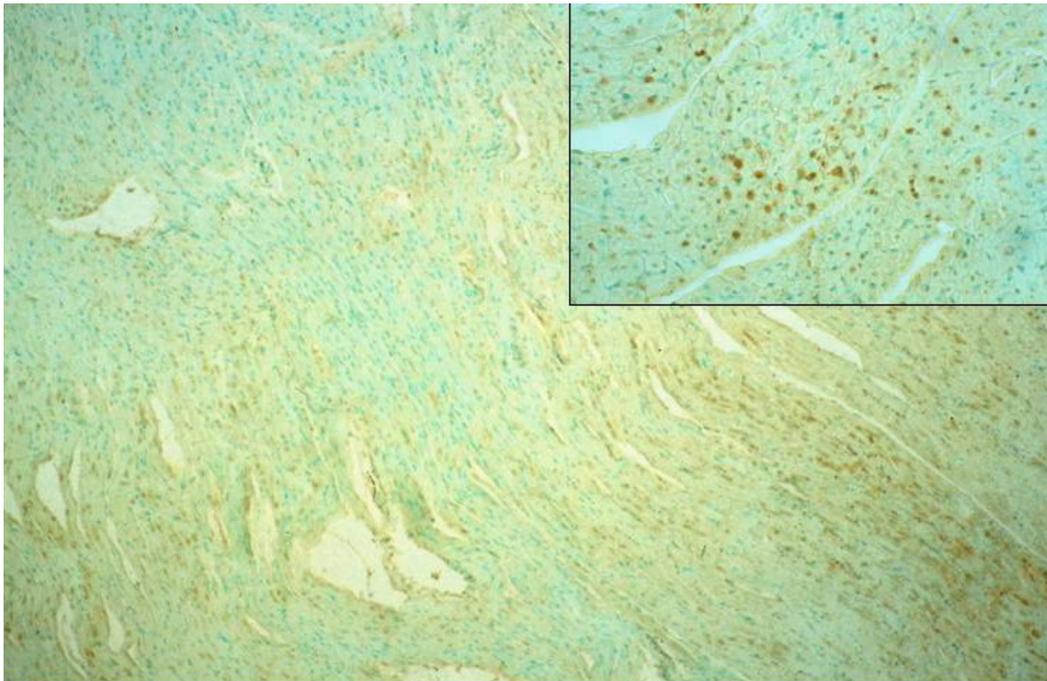


Abbildung 18: Tunel-Färbung eines paraffin-gebetteten Schnittes aus der *infarct region* zeigt bräunlich gefärbte Nucleus der Apoptose-positiven Kardiomyozyten (Vergrößerung 200-fach).

## 4 Diskussion

Mit der vorliegenden Untersuchung wurde das protektive Potential einer selektiven Calpaininhibition auf die Entstehung des Myokardinfarktes und die damit verbundenen hämodynamischen Veränderungen im Ischämie-/ Reperusionsmodell am Schwein untersucht.

Die Infarktgröße in solch einem Modell wird bekanntermaßen von verschiedenen Faktoren beeinflusst, unter anderem von der Dauer der Ischämie und/oder der Reperfusion, der Kern- und Myokardtemperatur, der gewählten Größe des Ischämiegebietes, der Vorlast des Herzens und dem verwendeten Modell selber (22;75;99). Diese Größen wurden bei allen unseren Versuchen konstant gehalten, um eine größtmögliche Standardisierung der Versuche in beiden Versuchsgruppen zu erhalten. Ein zusätzlicher Vorteil eines Schweinmodells ist der sehr geringen residuale Blutfluss in die *area at risk* über kollaterale Gefäße (88).

Verglichen mit in der Literatur beschriebenen Ischämie modellen ohne residualen Blutfluss am Schweineherzen, ist die gewählte Größe des Ischämiegebietes in der vorliegenden Studie sehr groß und dabei das Auftreten ventrikulärer Fibrillationen sehr gering (siehe oben). Zudem ist die Anzahl der ausgewerteten Herzschnitte mit durchschnittlich 13,35 pro Herz größer als in der Literatur empfohlen (4-6), was größere Zielgrößen (AAR und IR) und damit eine sicherere Aussage ermöglicht (75;81).

Die bei 5 Versuchstieren durchgeführte Defibrillation mit pädiatrischen Defibrillatorpaddels führte nicht zur Beeinflussung der Größe des Infarktareals, solange die verwendeten Paddels außerhalb dieser Zone angesetzt wurden (45). Das

Auftreten dieser ventrikulären Fibrillationen wurde deshalb auch nicht als Ausschlusskriterium gewertet.

Für die Markierung der *infarct region* wurde die Färbung mit Triphenyltetrazolium herangezogen, eine Methode, die in der Literatur umfassend beschrieben ist und weitläufig angewendet wird. Die Ergebnisse dieser Färbemethode wurden auch durch das untersuchte Medikament nicht verfälscht, was durch die histologische Untersuchung gezeigt werden konnte (21;62).

Ein zuverlässigeres Anfärben der *non risk region* mit Evans Blue konnte erzielt werden, indem man die Färbung erst am explantierten Herzen und unter druck- und volumenkontrollierten Bedingungen durchführte und dabei den Farbstoff direkt in die Koronarstümpfe injizierte.

Rappaport zufolge sind Calpaine an der myofilamentären Proteolyse infolge von Ischämie und Reperfusion beteiligt (78). Zusätzlich haben elektronenmikroskopische Untersuchungen ergeben, dass die strukturellen Veränderungen in ischämischem Myokard, denen, die durch Calpain-Proteolyse entstehen, sehr ähneln und folgerte daraus, dass der Hauptteil des Zellschadens in infarziertem Myokard auf eine unregulierte Aktivierung von Calpainen zurückzuführen sei.

Tatsächlich sind in der Literatur eine Reihe von Calpaineffekte in verschiedenen *in vivo* und *in vitro* Modellen zu finden. Papp und Mitarbeiter zeigten an Kardiomyozyten eine, von Calpainen verursachte, erhebliche Reduktion der maximalen isometrischen Kraft und den Abbau von Desmin (72). In einer anderen Studie konnte an ischämischen Rattenherzen gezeigt werden, dass eine Calpaininhibition dem Abbau von Troponin I vorbeugt (29). Gao und Kollegen konnten am islorierten Herzmuskel mit Hilfe von Calpain I eine Senkung der maximalen kalziumaktivierten Kraft und der Kalziumsensitivität erreichen (30). Eine gegensätzliche Studie, allerdings bei

metabolisch gehemmten Kardiomyozyten konnte einerseits eine Aktivierung und Hochregulierung von Calpain zeigen, ein gegebener Hemmstoff konnte andererseits den herbeigeführten Zelltod im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht verzögern (6).

Ein Charakteristikum bei myokardialen Ischämien ist der Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration. Zudem ist seit langem der protektive Effekt einer prophylaktischen Gabe von Kalziumantagonisten nicht nur bei myokardialen Ischämie/Reperfusionmodellen und arterieller Hypertension, sondern auch in der humanen Therapie dieser Erkrankungen bekannt. Dabei kommt es zur Reduktion der Infarktgröße und zur Vermeidung einer linksventrikulären Hypertrophie (49;50). Zusätzlich konnte kürzlich gezeigt werden, dass sich eine Blockade von Kalziumkanälen positiv auswirkt und zu einer Abnahme des myokardialen nekrotischen und apoptotischen Zelltodes führt (28;51). Da Calpaine durch eine Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration aktiviert werden, wird ihnen auch bei myokardialen Ischämie/Reperfusionseignissen eine entscheidende Rolle zugeschrieben (5;33;112).

In den vergangenen Jahren wurden einige Calpaininhibitoren auf ihren potentiellen therapeutischen Nutzen hin untersucht, scheiterten aber meistens an ihrer geringen Spezifität und einer geringen Permeabilität in die Zellen. In ischämisch-reperfundierten Rattenherzen erreichte der Calpaininhibitor I eine Reduzierung der Infarktgröße bei Gabe vor Beginn der Ischämie, konnte aber keine hämodynamischen Verbesserungen gegenüber der Kontrollgruppe erbringen (107). Mit dem gleichen Inhibitor zeigten Saito et al. kardioprotektive Effekte am isoliert perfundierten Rattenherzen und konnten zudem eine geringere Freisetzung von herzspezifischen Enzymen (LDH, Kreatinphosphokinase, etc.) beweisen (85). Urthaler et al. zeigten durch Calpaininhibition im perfundierten Frettchenherzen eine

Verzögerung der Proteolyse und Verminderung der myokardialen Hypomotilität (105). Es existieren Ansätze die guten experimentellen Erfolge dieser Inhibitoren durch molekulare Veränderungen im Sinne einer erhöhten Spezifität und Permeabilität zu verbessern. So gelang erst kürzlich Fiorino et al. die Verbindung eines Calpaininhibitors mit Penetratin, einem Peptid, das schon länger als Vektor für bioaktive Moleküle bekannt ist. Dieser Prozess resultierte in einer erhöhten Zellpermeabilität des Inhibitors unter Erhalt der vollständigen inhibitorischen Funktion (23).

Der in den vorliegenden Versuchen von uns untersuchte, spezifische Calpaininhibitor A-705235 erzielte in kürzlich durchgeführten Untersuchungen an isolierten perfundierten Herzen einen protektiven Effekt der myokardialen und mitochondrialen Funktion in einem Ischämie/Reperusionsmodell (65;66).

Nach unserem Wissen liefert die vorliegende Studie die ersten direkten Beweise für kardioprotektive Effekte der Calpaininhibition in Bezug auf die Infarktgrösse und globale Hämodynamik in einem intakten Großtierversuch. Die Infarktgrösse wurde signifikant um ca. 33% reduziert und die Werte von  $dp/dt_{max}$  nach 6 Stunden Reperfusion konnten, gemessen an der Kontrollgruppe, auf einem signifikant höherem Niveau, gehalten werden ( $p < .05$  bzw.  $p < .003$ ). Auch unsere Untersuchungen zu den hämodynamischen Veränderungen verdeutlichen, dass die myokardiale Protektion, nicht Prävention, zumindest während der frühen Reperfusion von Bedeutung ist. Die Reduktion des SAD, des MAD und des ZVD fielen in der Calpaingruppe während der ersten 60 Minuten der Reperfusion, der LAD sogar während der ersten 120 Minuten, signifikant geringer aus als in der Kontrollgruppe ( $p < 0,001$  bzw.  $p < 0,05$ ).

Die Calpaininhibition hatte in unserer Versuchsreihe keinen Einfluss auf das Auftreten von Tachyarrhythmien und ventrikulären Fibrillationen.

Das Protokoll der vorliegenden Studie sah eine Applikation des Inhibitors 15 Minuten vor Beginn der Ischämie und während des gesamten Versuchverlaufes vor, um einen eindeutigen kardioprotektiven Effekt zu veranschaulichen. Diese Applikationsform zeigt in aktuellen Untersuchungen den größten therapeutischen Nutzen mit Vorteilen gegenüber einer einmaligen Gabe (115). Um den dargestellten Effekt dieses Inhibitors auch therapeutisch nach Einsetzen der Ischämie nützen zu können ist eine Prüfung in weiteren Modellen nötig.

Verschiedene Studien über zerebrale Ischämien und den dabei gemessenen Calpainspiegeln geben jedoch Hinweise auf ein bestehendes therapeutisches Fenster für einen möglichen Einsatz der Inhibitoren. So konnten Barnik et al. nach Rückenmarksverletzungen signifikant erhöhte Calpainspiegel nach 1 Stunde (70%) mit einem Maximum nach 4 Stunden (90%) messen. Auch bei infarzierten Rattenherzen zeigten sich die höchsten Calpain I- und Calpain II-Aktivitäten nach 4 Stunden bzw. 3 Tagen (8). Diese Informationen führten zu Untersuchungen bei zerebralen Ischämien und der Wirksamkeit einer Calpaininhibition nach Eintritt des Ereignisses. Dabei empfehlen Markgraf et al. die Beachtung eines sechsständigen therapeutischen Fensters, in dem eine Calpaininhibition einen positiven Effekt haben kann (53).

Diese Erkenntnis eines therapeutischen Fensters, das eine Verminderung des ischämischen und reperfusioninduzierten Zellschadens ermöglicht ist der größte Vorteil der Calpaininhibition im Vergleich zu anderen Stoffen. Bei diesen ist in den bisherigen Studien eine Gabe vor oder während des Ereignisses nötig, um einen protektiven Effekt zu erhalten.

## 5 Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden randomisierten, plazebo-kontrollierten Studie war die Untersuchung der kardioprotektiven Effekte einer Calpaininhibition mit dem spezifischen Calpaininhibitor A-705235 in einem myokardialen Ischämie-/Reperusionsmodell am Schwein. Ischämische Prozesse führen unter anderem über eine erhöhte intrazelluläre Kalziumkonzentration zu einer Überaktivierung von Calpainen. Diese ubiquitären Proteasen, zu deren Substraten nicht nur Zytoskelett- und Membranproteine, sondern auch metabolische Enzyme und Transkriptionsfaktoren zählen, spielen eine entscheidende Rolle bei der Entstehung der postischämischen Nekrose- und Apoptosevorgänge. In den durchgeführten Experimenten wurde der Inhibitor 15 Minuten vor Beginn der 45-minütigen Ischämiephase, die durch einen temporären Verschluss der LAD induziert wurde, intravenös appliziert und während der sechsstündigen Reperusionsphase kontinuierlich fortgesetzt. Im Vergleich zur Kontrollgruppe konnten wir bei den Tieren der Inhibitorgruppe vor allem in der Phase der Ischämie und der frühen Reperusionsphase eine Verbesserung der globalen Hämodynamik zeigen. Im Einzelnen sprechen die signifikant höheren Werte des systolischen arteriellen Druckes, des mittleren Aortendruckes sowie des zentralvenösen und des linksatrialen Druckes für eine verbesserte kardiale Funktion der behandelten Gruppe. Zusätzlich zeigte sich am Ende des Versuches eine signifikant reduzierte linksventrikuläre Kontraktilität der Herzen der Plazebogruppe im Vergleich zur Inhibitorgruppe. Das Korrelat dieser verminderten Hämodynamik konnten wir mit Hilfe der beschriebenen Färbung mit Tetrazolium und Evans Blue sichtbar machen, welche eine postmortale Differenzierung von infarziertem und vitalem Myokard

ermöglicht. Die Weiterentwicklung und Standardisierung dieser Reaktion zeigte eine signifikante Reduktion des Infarktareals um 33% in den mit A-705235 behandelten Herzen. Zukünftige Studien müssen nun die Wirksamkeit des Calpaininhibitors A-705235 bei einer Applikation nach der Ischämie zeigen, um letztendlich eine Kardioprotektion klinisch zu verwirklichen. Vorangegangene Untersuchungen beschreiben ein therapeutisches Fenster von sechs Stunden nach zerebralen und myokardialen ischämischen Ereignissen und geben diesen Untersuchungen einen hoffnungsvollen Rahmen.

## 6 Literatur

- (1) A prospective trial of intravenous streptokinase in acute myocardial infarction (I.S.A.M.). Mortality, morbidity, and infarct size at 21 days. The I.S.A.M. Study Group. *N Engl J Med* 1986; 314(23):1465-1471.
- (2) Abdulla J, Barlera S, Latini R et al. A systematic review: Effect of angiotensin converting enzyme inhibition on left ventricular volumes and ejection fraction in patients with a myocardial infarction and in patients with left ventricular dysfunction. *Eur J Heart Fail* 2006.
- (3) Anderson JL, Marshall HW, Bray BE et al. A randomized trial of intracoronary streptokinase in the treatment of acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 1983; 308(22):1312-1318.
- (4) Andresen K, Tom TD, Strand M. Characterization of cDNA clones encoding a novel calcium-activated neutral proteinase from *Schistosoma mansoni*. *J Biol Chem* 1991; 266(23):15085-15090.
- (5) Arthur GD, Belcastro AN. A calcium stimulated cysteine protease involved in isoproterenol induced cardiac hypertrophy. *Mol Cell Biochem* 1997; 176(1-2):241-248.
- (6) Atsma DE, Bastiaanse EM, Jerzewski A, van d, V, van der LA. Role of calcium-activated neutral protease (calpain) in cell death in cultured neonatal rat cardiomyocytes during metabolic inhibition. *Circ Res* 1995; 76(6):1071-1078.
- (7) Baki A, Tompa P, Alexa A, Molnar O, Friedrich P. Autolysis parallels activation of mu-calpain. *Biochem J* 1996; 318 ( Pt 3):897-901.
- (8) Banik NL, Matzelle DC, Gantt-Wilford G, Osborne A, Hogan EL. Increased calpain content and progressive degradation of neurofilament protein in spinal cord injury. *Brain Res* 1997; 752(1-2):301-306.
- (9) Bartus RT, Baker KL, Heiser AD et al. Postischemic administration of AK275, a calpain inhibitor, provides substantial protection against focal ischemic brain damage. *J Cereb Blood Flow Metab* 1994; 14(4):537-544.
- (10) Bartus RT, Elliott PJ, Hayward NJ et al. Calpain as a novel target for treating acute neurodegenerative disorders. *Neurol Res* 1995; 17(4):249-258.

- (11) Blomgren K, McRae A, Elmered A et al. The calpain proteolytic system in neonatal hypoxic-ischemia. *Ann N Y Acad Sci* 1997; 825:104-119.
- (12) Buki A, Farkas O, Doczi T, Povlishock JT. Preinjury administration of the calpain inhibitor MDL-28170 attenuates traumatically induced axonal injury. *J Neurotrauma* 2003; 20(3):261-268.
- (13) Carragher NO, Fonseca BD, Frame MC. Calpain activity is generally elevated during transformation but has oncogene-specific biological functions. *Neoplasia* 2004; 6(1):53-73.
- (14) Carragher NO, Frame MC. Calpain: a role in cell transformation and migration. *Int J Biochem Cell Biol* 2002; 34(12):1539-1543.
- (15) Choi YH, Lee SJ, Nguyen P et al. Regulation of cyclin D1 by calpain protease. *J Biol Chem* 1997; 272(45):28479-28484.
- (16) Cottin P, Brustis JJ, Poussard S, Elamrani N, Broncard S, Ducastaing A. Ca<sup>2+</sup>-dependent proteinases (calpains) and muscle cell differentiation. *Biochim Biophys Acta* 1994; 1223(2):170-178.
- (17) Cottin P, Vidalenc PL, Ducastaing A. Ca<sup>2+</sup>-dependent association between a Ca<sup>2+</sup>-activated neutral proteinase (CaANP) and its specific inhibitor. *FEBS Lett* 1981; 136(2):221-224.
- (18) Crawford C, Brown NR, Willis AC. Studies of the active site of m-calpain and the interaction with calpastatin. *Biochem J* 1993; 296 ( Pt 1):135-142.
- (19) Delaney SJ, Hayward DC, Barleben F, Fischbach KF, Miklos GL. Molecular cloning and analysis of small optic lobes, a structural brain gene of *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88(16):7214-7218.
- (20) Denison SH, Orejas M, Arst HN, Jr. Signaling of ambient pH in *Aspergillus* involves a cysteine protease. *J Biol Chem* 1995; 270(48):28519-28522.
- (21) DOERR W. [Use of triphenyltetrazolium chloride as a reduction indicator in histology and histophysiology.]. *Frankf Z Pathol* 1950; 61(4):557-573.
- (22) Duncker DJ, Klassen CL, Ishibashi Y, Herrlinger SH, Pavek TJ, Bache RJ. Effect of temperature on myocardial infarction in swine. *Am J Physiol* 1996; 270(4 Pt 2):H1189-H1199.
- (23) Fiorino F, Machleidt W, Moroder L. A new cell-permeable calpain inhibitor. *J Pept Sci* 2006; 13:70-73.

- 
- (24) Fox JE, Reynolds CC, Phillips DR. Calcium-dependent proteolysis occurs during platelet aggregation. *J Biol Chem* 1983; 258(16):9973-9981.
  - (25) Fox JE, Taylor RG, Taffarel M, Boyles JK, Goll DE. Evidence that activation of platelet calpain is induced as a consequence of binding of adhesive ligand to the integrin, glycoprotein IIb-IIIa. *J Cell Biol* 1993; 120(6):1501-1507.
  - (26) Frelin C. [Intracellular pH and its regulation]. *Biochimie* 1984; 66(5):VII-VIX.
  - (27) Frelin C, Vigne P, Lazdunski M. The role of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange system in cardiac cells in relation to the control of the internal Na<sup>+</sup> concentration. A molecular basis for the antagonistic effect of ouabain and amiloride on the heart. *J Biol Chem* 1984; 259(14):8880-8885.
  - (28) Gao F, Gong B, Christopher TA, Lopez BL, Karasawa A, Ma XL. Anti-apoptotic effect of benidipine, a long-lasting vasodilating calcium antagonist, in ischaemic/reperfused myocardial cells. *Br J Pharmacol* 2001; 132(4):869-878.
  - (29) Gao WD, Atar D, Liu Y, Perez NG, Murphy AM, Marban E. Role of troponin I proteolysis in the pathogenesis of stunned myocardium. *Circ Res* 1997; 80(3):393-399.
  - (30) Gao WD, Liu Y, Mellgren R, Marban E. Intrinsic myofilament alterations underlying the decreased contractility of stunned myocardium. A consequence of Ca<sup>2+</sup>-dependent proteolysis? *Circ Res* 1996; 78(3):455-465.
  - (31) Gasparetto C, Malinverno A, Culacciati D et al. Antioxidant vitamins reduce oxidative stress and ventricular remodeling in patients with acute myocardial infarction. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2005; 18(3):487-496.
  - (32) Harwood SM, Yaqoob MM, Allen DA. Caspase and calpain function in cell death: bridging the gap between apoptosis and necrosis. *Ann Clin Biochem* 2005; 42(Pt 6):415-431.
  - (33) Iizuka K, Kawaguchi H, Kitabatake A. Effects of thiol protease inhibitors on fodrin degradation during hypoxia in cultured myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 1993; 25(9):1101-1109.
  - (34) Imajoh S, Suzuki K. [Structure and function of calcium-activated neutral protease]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso* 1987; 32(2):96-115.
  - (35) Imajoh S, Suzuki K. Reversible interaction between Ca<sup>2+</sup>-activated neutral protease (CANP) and its endogenous inhibitor. *FEBS Lett* 1985; 187(1):47-50.

- 
- (36) Inazawa J, Nakagawa H, Misawa S et al. Assignment of the human calpastatin gene (CAST) to chromosome 5 at region q14---q22. *Cytogenet Cell Genet* 1990; 54(3-4):156-158.
- (37) Ishiura S, Murofushi H, Suzuki K, Imahori K. Studies of a calcium-activated neutral protease from chicken skeletal muscle. I. Purification and characterization. *J Biochem (Tokyo)* 1978; 84(1):225-230.
- (38) Iwamoto H, Miura T, Okamura T et al. Calpain inhibitor-1 reduces infarct size and DNA fragmentation of myocardium in ischemic/reperfused rat heart. *J Cardiovasc Pharmacol* 1999; 33(4):580-586.
- (39) Kawasaki H, Emori Y, Imajoh-Ohmi S, Minami Y, Suzuki K. Identification and characterization of inhibitory sequences in four repeating domains of the endogenous inhibitor for calcium-dependent protease. *J Biochem (Tokyo)* 1989; 106(2):274-281.
- (40) Keira Y, Noguchi S, Minami N, Hayashi YK, Nishino I. Localization of calpain 3 in human skeletal muscle and its alteration in limb-girdle muscular dystrophy 2A muscle. *J Biochem (Tokyo)* 2003; 133(5):659-664.
- (41) Kieran D, Greensmith L. Inhibition of calpains, by treatment with leupeptin, improves motoneuron survival and muscle function in models of motoneuron degeneration. *Neuroscience* 2004; 125(2):427-439.
- (42) Klein HH, Bohle RM, Pich S, Lindert-Heimberg S, Wollenweber J, Nebendahl K. Time delay of cell death by Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-exchange inhibition in regionally ischemic, reperfused porcine hearts. *J Cardiovasc Pharmacol* 1997; 30(2):235-240.
- (43) Klein HH, Bohle RM, Pich S et al. Time-dependent protection by Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange inhibition in a regionally ischemic, reperfused porcine heart preparation with low residual blood flow. *J Mol Cell Cardiol* 1998; 30(4):795-801.
- (44) Klein HH, Pich S, Bohle RM, Lindert-Heimberg S, Nebendahl K. Na<sup>(+)</sup>/H<sup>(+)</sup> exchange inhibitor cariporide attenuates cell injury predominantly during ischemia and not at onset of reperfusion in porcine hearts with low residual blood flow. *Circulation* 2000; 102(16):1977-1982.
- (45) Klein HH, Pich S, Bohle RM, Schuff-Werner P, Schorling M, Nebendahl K. Failure of iloprost to protect the regionally ischemic, reperfused porcine heart. *J Mol Cell Cardiol* 1991; 23(8):963-972.

- 
- (46) Klein HH, Pich S, Bohle RM, Wollenweber J, Nebendahl K. Myocardial protection by Na(+)-H<sup>+</sup> exchange inhibition in ischemic, reperfused porcine hearts. *Circulation* 1995; 92(4):912-917.
- (47) Kloner RA, Rezkalla SH. Cardiac protection during acute myocardial infarction: where do we stand in 2004? *J Am Coll Cardiol* 2004; 44(2):276-286.
- (48) Lazdunski M, Frelin C, Vigne P. The sodium/hydrogen exchange system in cardiac cells: its biochemical and pharmacological properties and its role in regulating internal concentrations of sodium and internal pH. *J Mol Cell Cardiol* 1985; 17(11):1029-1042.
- (49) Lefer AM, Polansky EW, Bianchi CP, Narayan S. Influence of verapamil on cellular integrity and electrolyte concentrations of ischemic myocardial tissue in the cat. *Basic Res Cardiol* 1979; 74(5):555-567.
- (50) Linz W, Schaper J, Wiemer G, Albus U, Scholkens BA. Ramipril prevents left ventricular hypertrophy with myocardial fibrosis without blood pressure reduction: a one year study in rats. *Br J Pharmacol* 1992; 107(4):970-975.
- (51) Liu HR, Tao L, Gao E et al. Anti-apoptotic effects of rosiglitazone in hypercholesterolemic rabbits subjected to myocardial ischemia and reperfusion. *Cardiovasc Res* 2004; 62(1):135-144.
- (52) Lubisch W, Beckenbach E, Bopp S et al. Benzoylalanine-derived ketoamides carrying vinylbenzyl amino residues: discovery of potent water-soluble calpain inhibitors with oral bioavailability. *J Med Chem* 2003; 46(12):2404-2412.
- (53) Markgraf CG, Velayo NL, Johnson MP et al. Six-hour window of opportunity for calpain inhibition in focal cerebral ischemia in rats. *Stroke* 1998; 29(1):152-158.
- (54) Mellgren RL. Calcium-dependent proteases: an enzyme system active at cellular membranes? *FASEB J* 1987; 1(2):110-115.
- (55) Mellgren RL, Lane RD, Mericle MT. The binding of large calpastatin to biologic membranes is mediated in part by interaction of an amino terminal region with acidic phospholipids. *Biochim Biophys Acta* 1989; 999(1):71-77.
- (56) Mellgren RL, Lu Q, Zhang W, Lakkis M, Shaw E, Mericle MT. Isolation of a Chinese hamster ovary cell clone possessing decreased mu-calpain content and a reduced proliferative growth rate. *J Biol Chem* 1996; 271(26):15568-15574.

- 
- (57) Melloni E, Michetti M, Salamino F, Pontremoli S. Molecular and functional properties of a calpain activator protein specific for mu-isoforms. *J Biol Chem* 1998; 273(21):12827-12831.
- (58) Melloni E, Michetti M, Salamino F, Sparatore B, Pontremoli S. Mechanism of action of a new component of the Ca(2+)-dependent proteolytic system in rat brain: the calpain activator. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 249(3):583-588.
- (59) Mercken M, Grynspan F, Nixon RA. Differential sensitivity to proteolysis by brain calpain of adult human tau, fetal human tau and PHF-tau. *FEBS Lett* 1995; 368(1):10-14.
- (60) Molinari M, Anagli J, Carafoli E. Ca(2+)-activated neutral protease is active in the erythrocyte membrane in its nonautolyzed 80-kDa form. *J Biol Chem* 1994; 269(45):27992-27995.
- (61) Mouatt-Prigent A, Karlsson JO, Agid Y, Hirsch EC. Increased M-calpain expression in the mesencephalon of patients with Parkinson's disease but not in other neurodegenerative disorders involving the mesencephalon: a role in nerve cell death? *Neuroscience* 1996; 73(4):979-987.
- (62) NACHLAS MM, SHNITKA TK. Macroscopic identification of early myocardial infarcts by alterations in dehydrogenase activity. *Am J Pathol* 1963; 42:379-405.
- (63) Nakamura M, Inomata M, Imajoh S, Suzuki K, Kawashima S. Fragmentation of an endogenous inhibitor upon complex formation with high- and low-Ca<sup>2+</sup>-requiring forms of calcium-activated neutral proteases. *Biochemistry* 1989; 28(2):449-455.
- (64) Neely JR, Feuvray D. Metabolic products and myocardial ischemia. *Am J Pathol* 1981; 102(2):282-291.
- (65) Neuhof C, Fabiunke V, Deibele K et al. Reduction of myocardial infarction by calpain inhibitors A-705239 and A-705253 in isolated perfused rabbit hearts. *Biol Chem* 2004; 385(11):1077-1082.
- (66) Neuhof C, Gotte O, Trumbeckaite S et al. A novel water-soluble and cell-permeable calpain inhibitor protects myocardial and mitochondrial function in postischemic reperfusion. *Biol Chem* 2003; 384(12):1597-1603.
- (67) Neumar RW, Hagle SM, DeGracia DJ, Krause GS, White BC. Brain mu-calpain autolysis during global cerebral ischemia. *J Neurochem* 1996; 66(1):421-424.

- 
- (68) Nishimura T, Goll DE. Binding of calpain fragments to calpastatin. *J Biol Chem* 1991; 266(18):11842-11850.
- (69) Nishiura I, Tanaka K, Yamato S, Murachi T. The occurrence of an inhibitor of Ca<sup>2+</sup>-dependent neutral protease in rat liver. *J Biochem (Tokyo)* 1978; 84(6):1657-1659.
- (70) Ojha M, Barja F. Spatial and cellular localization of calcium-dependent protease (CDP II) in *Allomyces arbuscula*. *J Cell Sci* 2003; 116(Pt 6):1095-1105.
- (71) Ono Y, Sorimachi H, Suzuki K. *Calpain: Pharmacology and Toxicology of Calcium-dependent Protease*. 1999. Taylor & Francis.  
Ref Type: Generic
- (72) Papp Z, van d, V, Stienen GJ. Calpain-I induced alterations in the cytoskeletal structure and impaired mechanical properties of single myocytes of rat heart. *Cardiovasc Res* 2000; 45(4):981-993.
- (73) Parr T, Bardsley RG, Gilmour RS, Buttery PJ. Changes in calpain and calpastatin mRNA induced by beta-adrenergic stimulation of bovine skeletal muscle. *Eur J Biochem* 1992; 208(2):333-339.
- (74) Patel B, Kloner RA. Analysis of reported randomized trials of streptokinase therapy for acute myocardial infarction in the 1980s. *Am J Cardiol* 1987; 59(6):501-504.
- (75) Pich S, Klein HH, Lindert S, Nebendahl K, Kreuzer H. Cell death in ischemic, reperfused porcine hearts: a histochemical and functional study. *Basic Res Cardiol* 1988; 83(5):550-559.
- (76) Pontremoli S, Viotti PL, Michetti M, Sparatore B, Salamino F, Melloni E. Identification of an endogenous activator of calpain in rat skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; 171(2):569-574.
- (77) Potter DA, Tirnauer JS, Janssen R et al. Calpain regulates actin remodeling during cell spreading. *J Cell Biol* 1998; 141(3):647-662.
- (78) Rappaport L. Ischemia-reperfusion associated myocardial contractile dysfunction may depend on Ca<sup>(2+)</sup>-activated cytoskeleton protein degradation. *Cardiovasc Res* 2000; 45(4):810-812.
- (79) Reddy PA, Anandavalli TE, Anandaraj MP. Calcium activated neutral proteases (milli- and micro-CANP) and endogenous CANP inhibitor of muscle in Duchenne muscular dystrophy (DMD). *Clin Chim Acta* 1986; 160(3):281-288.

- 
- (80) Richard I, Broux O, Allamand V et al. Mutations in the proteolytic enzyme calpain 3 cause limb-girdle muscular dystrophy type 2A. *Cell* 1995; 81(1):27-40.
- (81) Rohmann S, Weygandt H, Minck KO. Preischemic as well as postischemic application of a Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange inhibitor reduces infarct size in pigs. *Cardiovasc Res* 1995; 30(6):945-951.
- (82) Rupprecht HJ, vom DJ, Terres W et al. Cardioprotective effects of the Na<sup>(+)</sup>/H<sup>(+)</sup> exchange inhibitor cariporide in patients with acute anterior myocardial infarction undergoing direct PTCA. *Circulation* 2000; 101(25):2902-2908.
- (83) Saido TC, Shibata M, Takenawa T, Murofushi H, Suzuki K. Positive regulation of mu-calpain action by polyphosphoinositides. *J Biol Chem* 1992; 267(34):24585-24590.
- (84) Saido TC, Sorimachi H, Suzuki K. Calpain: new perspectives in molecular diversity and physiological-pathological involvement. *FASEB J* 1994; 8(11):814-822.
- (85) Saito T, Mishima A, Asano M et al. Protective effects of calpain inhibitor for prolonged hypothermic cardiac preservation. *Jpn J Thorac Cardiovasc Surg* 1999; 47(4):145-152.
- (86) Sandmann S, Prenzel F, Shaw L, Schauer R, Unger T. Activity profile of calpains I and II in chronically infarcted rat myocardium--influence of the calpain inhibitor CAL 9961. *Br J Pharmacol* 2002; 135(8):1951-1958.
- (87) Simoons ML, Serruys PW, van den BM et al. Early thrombolysis in acute myocardial infarction: limitation of infarct size and improved survival. *J Am Coll Cardiol* 1986; 7(4):717-728.
- (88) Sjoquist PO, Duker G, Almgren O. Distribution of the collateral blood flow at the lateral border of the ischemic myocardium after acute coronary occlusion in the pig and the dog. *Basic Res Cardiol* 1984; 79(2):164-175.
- (89) Sorimachi H. [Tissue-specific calpain and ubiquitous calpain]. *Seikagaku* 1993; 65(9):1170-1174.
- (90) Sorimachi H, Saido TC, Suzuki K. New era of calpain research. Discovery of tissue-specific calpains. *FEBS Lett* 1994; 343(1):1-5.
- (91) Steenbergen C, Murphy E, Levy L, London RE. Elevation in cytosolic free calcium concentration early in myocardial ischemia in perfused rat heart. *Circ Res* 1987; 60(5):700-707.

- 
- (92) Steenbergen C, Murphy E, Watts JA, London RE. Correlation between cytosolic free calcium, contracture, ATP, and irreversible ischemic injury in perfused rat heart. *Circ Res* 1990; 66(1):135-146.
- (93) Suzuki K. Nomenclature of calcium dependent proteinase. *Biomed Biochim Acta* 1991; 50(4-6):483-484.
- (94) Suzuki K, Sorimachi H. A novel aspect of calpain activation. *FEBS Lett* 1998; 433(1-2):1-4.
- (95) Suzuki K, Sorimachi H. A novel aspect of calpain activation. *FEBS Lett* 1998; 433(1-2):1-4.
- (96) Takano E, Ma H, Yang HQ, Maki M, Hatanaka M. Preference of calcium-dependent interactions between calmodulin-like domains of calpain and calpastatin subdomains. *FEBS Lett* 1995; 362(1):93-97.
- (97) Takano E, Maki M. [Calpastatin: molecular mechanism of calpain inhibition]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso* 1997; 42(14 Suppl):2181-2188.
- (98) Takano E, Yumoto N, Kannagi R, Murachi T. Molecular diversity of calpastatin in mammalian organs. *Biochem Biophys Res Commun* 1984; 122(3):912-917.
- (99) Taylor IM, Shaikh NA, Downar E. Ultrastructural changes of ischemic injury due to coronary artery occlusion in the porcine heart. *J Mol Cell Cardiol* 1984; 16(1):79-94.
- (100) Tidball JG, Spencer MJ. Calpains and muscular dystrophies. *Int J Biochem Cell Biol* 2000; 32(1):1-5.
- (101) Tokmakova M, Solomon SD. Inhibiting the renin-angiotensin system in myocardial infarction and heart failure: lessons from SAVE, VALIANT and CHARM, and other clinical trials. *Curr Opin Cardiol* 2006; 21(4):268-272.
- (102) Tolnai S, Korecky B. Calcium-dependent proteolysis and its inhibition in the ischemic rat myocardium. *Can J Cardiol* 1986; 2(1):42-47.
- (103) Tompa P, Baki A, Schad E, Friedrich P. The calpain cascade. Mu-calpain activates m-calpain. *J Biol Chem* 1996; 271(52):33161-33164.
- (104) Ueda Y, Wang MC, Ou BR et al. Evidence for the participation of the proteasome and calpain in early phases of muscle cell differentiation. *Int J Biochem Cell Biol* 1998; 30(6):679-694.

- 
- (105) Urthaler F, Wolkowicz PE, Digerness SB, Harris KD, Walker AA. MDL-28170, a membrane-permeant calpain inhibitor, attenuates stunning and PKC epsilon proteolysis in reperfused ferret hearts. *Cardiovasc Res* 1997; 35(1):60-67.
- (106) Vigne P, Frelin C, Lazdunski M. The Na<sup>+</sup>-dependent regulation of the internal pH in chick skeletal muscle cells. The role of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange system and its dependence on internal pH. *EMBO J* 1984; 3(8):1865-1870.
- (107) Wang KK, Yuen PW. Calpain inhibition: an overview of its therapeutic potential. *Trends Pharmacol Sci* 1994; 15(11):412-419.
- (108) Wells A, Huttenlocher A, Lauffenburger DA. Calpain proteases in cell adhesion and motility. *Int Rev Cytol* 2005; 245:1-16.
- (109) Wu HY, Lynch DR. Calpain and synaptic function. *Mol Neurobiol* 2006; 33(3):215-236.
- (110) Xu W, Yao K, Wang KJ, Wu RY, Sun ZH. [Prevention of oxidative cataract by PD150. *Zhonghua Yan Ke Za Zhi* 2003; 39(7):400-405.
- (111) Yokota M, Saido TC, Kamitani H, Tabuchi S, Satokata I, Watanabe T. Calpain induces proteolysis of neuronal cytoskeleton in ischemic gerbil forebrain. *Brain Res* 2003; 984(1-2):122-132.
- (112) Yoshida K, Sorimachi Y, Fujiwara M, Hironaka K. Calpain is implicated in rat myocardial injury after ischemia or reperfusion. *Jpn Circ J* 1995; 59(1):40-48.
- (113) Yoshizawa T, Sorimachi H, Tomioka S, Ishiura S, Suzuki K. Calpain dissociates into subunits in the presence of calcium ions. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 208(1):376-383.
- (114) Yoshizawa T, Sorimachi H, Tomioka S, Ishiura S, Suzuki K. A catalytic subunit of calpain possesses full proteolytic activity. *FEBS Lett* 1995; 358(1):101-103.
- (115) Yu CG, Geddes JW. Sustained Calpain Inhibition Improves Locomotor Function and Tissue Sparing Following Contusive Spinal Cord Injury. *Neurochem Res* 2007.
- (116) Zeymer U, Suryapranata H, Monassier JP et al. The Na<sup>(+)</sup>/H<sup>(+)</sup> exchange inhibitor eniporide as an adjunct to early reperfusion therapy for acute myocardial infarction. Results of the evaluation of the safety and cardioprotective effects of eniporide in acute myocardial infarction (ESCAMI) trial. *J Am Coll Cardiol* 2001; 38(6):1644-1650.

Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen wurden bisher wie folgt veröffentlicht:

1. Khalil PN, Siebeck M, Huss R, Pollhammer M, Khalil MN, Neuhof C, Fritz H.: Histochemical assesment of myocardial infarction using 2,3,5 triphenyltetrazolium chloride in blood-perfused porcine hearts. J Pharmacol Methods. 2006 Nov-Dec;54(3):307-12. Epub 2006 Mar 3.
2. Khalil PN, Neuhof C, Huss R, Pollhammer M, Khalil MN, Neuhof F, Fritz H, Siebeck M.: Calpain inhibition reduces infarct size and omproves global hemodynamics and left ventricular contractility in a porcine myocardial ischemia/reperfusion model. Eur J Pharmacol. 2005 Dec 28;528(1-3):124-31. Epub 2005 Dec 1.
3. Khalil PN, Siebeck M, Pollhammer M, Huss R, Neuhof C, Möller A, Neuhof H, Fritz H.: Einfluss der Calpaininhibition auf den durch Ischämie und Reperfusion induzierten myokardialen Zellschaden im Schweinemodell. Vortrag, 121. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie, Berlin, 27.-30.04.04. In: Ulrich B, Lauch KW, Bauer H (Hrsg.): Chirurgisches Forum 2004 für experimentelle und klinische Forschung. Springer, Berlin u.a., 2004, S.297-300, ISBN 2-540-20027-4
4. Khalil PN, Siebeck M, Pollhammer M, Huss R, Neuhof C, Neuhof H, Fritz H.: Einfluss der Calpaininhibition auf den durch Ischämie und Reperfusion induzierten myokardialen Zellschaden im Schweinemodell. Vortrag, 80. Jahrestagung der Vereinigung der Bayerischen Chirurgen, München, 17.-19.07.03
5. Khalil PN, Siebeck M, Pollhammer M, Huss R, Scheuber HP, Fritz H.: Makroskopischer Nachweis des frischen Myokardinfarktes durch Triphenyltetrazolium – ein methodischer Ansatz. Poster, 80. Jahrestagung der Vereinigung der Bayerischen Chirurgen, München, 17.-19.07.03

## Lebenslauf

### ■ Persönliche Daten

Name: Matthias Johann Pollhammer  
 Geburtsdaten: 11.01.1977 in München  
 Anschrift: Atzelsberg 7a  
 91080 Marloffstein  
 Telefon: 09131 / 5301503  
 E-Mail: matthias.pollhammer@web.de

### ■ Schule

1983 – 1987 John F. Kennedy-Grundschule in Unterschleissheim  
 1987 – 1996 Carl-Orff-Gymnasium in Unterschleissheim  
 Februar bis Mai `93 Oxley-College in Melbourne/Australien  
 1996 Abitur

### ■ Bundeswehr

1.7.1996 bis 30.4.1997 Grundwehrdienst in Germersheim und Erding

### ■ Universität

seit November 1997 Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität in München  
 5.5.2004: Ärztliche Prüfung

### ■ Praktikum und Famulatur

August/September 1998 Krankenpflegepraktikum im Städt. Krankenhaus München-Schwabing (Nephrologie)  
 März/April 2000 1. Famulatur im Städt. Krankenhaus München-Schwabing (Onkologie und Hämatologie)  
 März/April 2001 2. Famulatur im Städt. Krankenhaus München-Bogenhausen (Unfallchirurgie)  
 August/September 2001 3. Famulatur im Cornwall Regional Hospital in Montego Bay / Jamaica (Anästhesie, Geburtshilfe, Notfallaufnahme)  
 Juli/August 2002 4. Famulatur in der Praxis von Dr. Nowikow in Hamburg (Pulmonologie)

### ■ Praktisches Jahr ( 4/03 bis 3/04)

1.Tertial – Chirurgie Jimma University Hospital / Äthiopien  
 Chirurgische Klinik und Poliklinik Innenstadt, LMU  
 2.Tertial – Augenheilkunde Augenklinik der Universität München  
 3.Tertial – Innere Medizin Klinikum Traunstein, Lehrkrankenhaus der LMU

### ■ Weiterbildung

Seit 1.7.2004 Augenklinik der Universität Erlangen-Nürnberg