

**Aus der Klinik und Poliklinik für Thorax-, Herz-
und Thorakale Gefäßchirurgie der Universität Würzburg**

Direktor: Professor Dr. med. Rainer G. Leyh

**Analyse der mitochondrialen Dysfunktion im
myokardialen Ischämie-Reperfusionsschaden unter Einfluss von
Enoximon im Modell der Langendorffperfusion des Rattenherzens**

**Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
vorgelegt von**

**Christian Peter Moch
aus Würzburg**

Würzburg, den 20.09.2018

Referent: Priv.-Doz. Dr. Sebastian P. Sommer

Korreferent: Prof. Dr. Christoph Maack

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 07.10.2019

Der Promovend ist Arzt.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Mitochondrien.....	1
1.1.1. Subpopulationen	1
1.1.2. Funktion	3
1.1.3. Membrantransport.....	4
1.2. Atmungskette	5
1.2.1. Zustände der Atmungskettengeschwindigkeit.....	7
1.3. Ischämie und Reperfusion (IR).....	9
1.3.1. Klinische Relevanz des IR.....	14
1.3.2. Akute Herzinsuffizienz – Häufige klinische Folge des IR.....	15
1.4. Calcium-Ionen	19
1.5. Oxidativer Stress	20
1.6. Enoximon (Perfan [®])	21
1.7. Forschungsgebiet.....	23
1.8. Ziel und Umfang der vorliegenden Arbeit.....	24
2. Material und Methoden	25
2.1. Verwendete Materialien	25
2.3. Gruppeneinteilung der Versuchstiere.....	27
2.4. Herzpräparation und Vorbereitung für den Langendorff-Versuch	27
2.5. Langendorff-Versuch	28
2.6. Eluat-Bestimmung.....	30
2.7. Isolation der Mitochondrien.....	31
2.8. Bestimmung der cytosolischen Mitochondrienfraktion	32
2.9. Analyse des Proteingehaltes.....	33
2.10. Messung der Atmungskettenaktivität mittels Polarographie.....	33
2.11. Spektrophotometrische Bestimmung der Atmungskettenenzyme	36
2.12. Bestimmung der Ca ²⁺ -induzierten Mitochondrienschwellung.....	37
2.13. Statistik.....	38
3. Ergebnisse	39
3.1. Perfusions- und Druckveränderungen unter IR und Enoximon.....	39
3.2. Labormedizinische Diagnostik	41

3.3. Einfluss des IR auf die Ca ²⁺ -Empfindlichkeit der mPTP.....	45
3.4. Aktivität der Atmungskettenkomplexe	48
4. Diskussion	52
5. Literaturverzeichnis	60
6. Anhang	72
6.1. Abbildungsverzeichnis	72
6.2. Tabellenverzeichnis.....	72
6.3. Abkürzungsverzeichnis	73

1. Einleitung

1.1. Mitochondrien

Vor ca. 1,5 Milliarden Jahren entwickelten sich die ersten Zellen mit Mitochondrien. Der zugrundeliegende evolutionäre Schritt war dabei die Symbiose von Zellen mit anaeroben Archaeobakterien[1]. Als erste Symbiosepartner werden Vertreter der Gattung der Purpurbakterien[2], *Rickettsia prowazekii*[3] oder *Giardia lamblia*[4] vermutet. Mitochondrien stellen mobile und sich morphologisch verändernde Zellorganellen dar. Die ca. 1-5 µm großen Organellen besitzen wie Zellkerne und Chloroplasten eine Doppelmembran. Die Außenmembran ist mittels Porin-Poren für ATP, organische Säuren sowie kleinere Moleküle bis 6 kDa permeabel[5]. Sie wird von der Innenmembran durch den perimitochondrialen Spalt getrennt. Während über die Innenmembran apolare Kleinstmoleküle wie O₂ oder CO₂ frei diffundieren können, stellt sie für polare Moleküle ein nicht-permeables Hindernis dar. Um dennoch einen, für die Mitochondrien-abhängigen Stoffwechselvorgänge nötigen Stoffaustausch zu ermöglichen, stehen spezifische Transportsysteme und Kanäle zur Verfügung[6]. In dem als Matrix bezeichneten Innenraum der Mitochondrien befinden sich die Enzyme für den Citratzyklus und die Pyruvat- und Fettsäure-Oxidation sowie die mitochondrialen Ribosomen, tRNAs und das Genom. Als mitochondriales Leitenzym fungieren die Succinat-Dehydrogenase sowie die Cytochrom-Oxidase (COX). Die COX katalysiert die Oxidation von Cytochrom C innerhalb der Mitochondrien. Als Enzymkomplex der Atmungskette ist sie in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert und nur hier anzutreffen[7].

1.1.1. Subpopulationen

Mitochondrien lassen sich morphologisch in tubuläre und sacculäre Typen einordnen. Während kardiale Mitochondrien dem Typus sacculus angehören, finden sich tubuläre Mitochondrien vor allem in steroidproduzierenden Zellen.

Darüber hinaus berichteten Page und McCallister 1973 über die Existenz von weiteren Mitochondrienunterformen[8]. Nachgewiesen wurden die subsarkolemmalen (SSM) und interfibrillären Mitochondrien (IFM) 1961 von Stenger und Spiro[9]. Seitdem sind sie für zahlreiche Säugetiere inklusive des Menschen beschrieben worden[10-13]. Die beiden Subpopulationen kommen sowohl im Herz- als auch im Skelettmuskel vor und sind ebenso in anderen Gewebetypen (bspw. Neuronen) zu finden[14-16]. Sie unterscheiden sich morphologisch, funktionell sowie in ihrer biochemischen Arbeitsweise. Die Trennung beider Subpopulationen gelang der Arbeitsgruppe Palmer et al. 1977. Unter Verwendung von Poltron lösten sie die SSM, mittels Nargase die IFM aus ihrer Zellbindung[17]. Seitdem sind eine Vielzahl an Studien durchgeführt worden, um die Physiologie der Subpopulationen und ihre Reaktionen auf Stoffwechselveränderungen zu untersuchen[18-20].

Interfibrilläre Mitochondrien

Die 1,5–2,0 µm langen IFM liegen reihenförmig zwischen den Myofibrillen[14]. Sie nehmen den gesamten Raum zwischen den Z-Linien ein[21] und stehen untereinander in Kontakt[22]. Durch ihre Nähe zum junktionalen sarkoplasmatischen Retikulum (SR) sind die IFM der Ca^{2+} -Freisetzung sehr nahe und nehmen Einfluss auf die intrazelluläre Ca^{2+} -Zirkulation[23]. Sie weisen gegenüber den SSM eine erhöhte Ca^{2+} -Konzentration auf. Eine direkte Verbindung zwischen IFM und SR wird angenommen, konnte bisher jedoch nicht nachgewiesen werden[24]. Für die IFM von Myo-, und Kardiomyozyten werden gegenüber den SSM eine signifikant höhere Syntheseleistung beschrieben[13]. Ihre Substratoxidierung durch die Citratsynthase, Glutamatdehydrogenase und Succinatdehydrogenase übertrifft die der SSM etwa um das 1,5-fache[17]. Metabolismus beeinträchtigende Zustände, z.B. ein Hyperthyreoidismus, betreffen so vorrangig die IFM[25].

Die erhöhte Phosphorylierungsrate der IFM könnte dabei laut Alessandro Riva et al. einen morphologischen Ursprung haben. So erscheinen IFM in Rahmen elektronenmikroskopischer Untersuchungen strukturell flexibler als SSM.

Eine Umfangsabnahme der IFM führe so zu einem Anstieg der Protonenkonzentration, welche wiederum eine Aktivitätssteigerung der ATP-Synthase zu Folge hat[26]. Alternativ wird diskutiert, dass die Komplexe der Atmungskette im Rahmen der Membranveränderung als von Schägger et al. beschriebene „Superkomplexe“ interagieren[27].

Subsarkolemmale Mitochondrien

Die stabförmigen 0,4-3,0 µm langen und parallel zueinander liegenden SSM, befinden sich am Unterrand der Zytoplasmamembran im Bereich des Sarkolemm. SSM weisen im Vergleich zu den IFM eine stärkere Proteinsynthese[28] auf. Ihre Biogenese ist durch Ausdauertraining stärker induzierbar[29]. Ferner lassen sich laut Hollander auf Grund der peripheren Lage die Einflüsse von Medikamenten vermehrt in den SSM erkennen[30]. Des Weiteren sind SSM vulnerabler als IFM. Die erhöhte Anfälligkeit isolierter SSM für Apoptosereize und schädigende Stoffwechselprodukte wurde von zahlreichen Arbeitsgruppen beschrieben[13, 20, 31].

1.1.2. Funktion

Die Aufgaben der Mitochondrien im menschlichen Körper sind zahlreich. Neben ihrer Funktion als Träger der Atmungskette übernehmen sie wichtige Funktionen in der Citrat- und Aminosäuresynthese, β -Oxidation von Fettsäuren sowie dem Harnstoffzyklus. Ferner spielen sie eine Rolle in der Ketogenese und Gluconeogenese[32, 33]. Da sie ebenfalls den Raum für die Herstellung der Eisen-Schwefel-Cluster stellen, übernehmen sie auch bei der Biosynthese des Hämoglobins eine bedeutende Funktion[34]. Durch Aufnahme von zytosolischem Ca^{2+} dienen sie ebenfalls der Ca^{2+} -Homöostase[35]. Ferner haben Mitochondrien eine zentrale Rolle in der Entstehung und Bewältigung von Ischämie-Reperfusionsschäden (IR)[36]. Über die Freisetzung von Cytochrom c und Smac/DIABLO können Mitochondrien die Caspase-abhängige Induktion der Apoptose einleiten und forcieren diese im Verlauf Caspase-unabhängig durch Ausschüttung von AIF und Endonuklease G[37]. Des

Weiteren können Mitochondrien auf Grund ihrer dynamischen Struktur beschädigte mtDNA mittels Fusion ersetzen. Sie sind ferner zur Mitophagie fähig[38]. In diesem Kontext konnte im Sinne einer Konditionierung ein protektiver Einfluss gegenüber Zellschäden aufgezeigt werden[39, 40]. Für die IFM und SSM werden unterschiedliche Arbeitsschwerpunkte angenommen, wobei es Hinweise auf eine interzelluläre Kommunikation und dynamische Zusammenarbeit gibt[41, 42]. So könnte den SSM auf Grund ihrer peripheren Lage eine zellprotektive Funktion zukommen. Der in den SSM entstandene elektrochemische Gradient würde dabei nach Skulachev et al. entlang mitochondrialer Filamente an die IFM weitergeleitet werden. In Zellmitte sei es den IFM so möglich, ATP auch unter niedrigeren O₂-Konzentration zu generieren[43]. So würden weniger schädliche reaktive Sauerstoffradikale (ROS) im Bereich des Nukleus anfallen[44]. Ebenso wäre es möglich, dass die SSM im Zuge einer Hochregulierung ihrer Funktion die ATP-Produktion in die Peripherie verlagern. So würde ebenfalls der Großteil der Radikalproduktion vom Zellkern abgewandt entstehen[45].

1.1.3. Membrantransport

Im Rahmen der Glykolyse entsteht im Zytosol NADH. Da die innere Mitochondrienmembran für NADH nicht permeabel ist, nutzt NADH den sog. Malat-Shuttle. Dabei wird im Zytosol Oxalacetat zu Malat reduziert. Das Oxalacetat wird zuvor durch die Aspartat-Aminotransferase (AST) aus Aspartat gewonnen. Im Gegenzug entsteht dabei Glutamat aus α -Ketoglutarat.

Für Malat und α -Ketoglutarat gibt es einen spezifischen Antiporter in der inneren Membran. So gelangt Malat ins Innere des Mitochondriums und wird dort unter Reduktion von NAD⁺ wieder zu Oxalacetat oxidiert. Das Oxalacetat wird anschließend zu Aspartat transaminiert. Die hierfür nötige Aminogruppe liefert das Glutamat. Dabei wird dieses desaminiert und wieder zu α -Ketoglutarat und kann über den Antiporter das Mitochondrium verlassen[46]. Die Bereitstellung ausreichender Mengen von Aspartat und Glutamat auf den jeweiligen Membranseiten wird durch einen Aspartat-Glutamat-Antiporter

gewährleistet. Pyruvat, das während der Glykolyse im Zytosol produziert wird, gelangt durch einen H⁺-Cotransporter in die Matrix. Hier wird es zu Acetyl-CoA decarboxyliert. Das Acetyl-CoA kann die Membran nicht eigenständig überqueren. Um für den Fettstoffwechsel im Zytosol bereit zu stehen, wird es mit Oxalacetat zu Citrat kondensiert. Als dieses passiert es die Membran[47].

1.2. Atmungskette

Während es Lebensformen wie E-coli Bakterien gibt, die sich anstelle von O₂ der Nitrate als Elektronenakzeptoren bedienen, ist die eukaryotische Atmungskette von Sauerstoff abhängig[48]. Über ein System von Redoxreaktionen werden in der Atmungskette schrittweise Elektronen auf ein niedrigeres Energielevel transportiert. Am Ende dieser Kette steht die Oxidation von Wasserstoff zu Wasser. Der wichtigste Elektronen-Donator der Atmungskette ist dabei NADH. Es wirkt auf seine Reaktionspartner reduzierend und entsteht beim Abbau von Aminosäuren, Fetten und Kohlenhydraten. Der die Substrate der Atmungskette oxidierende Sauerstoff stellt den wichtigsten Elektronen-Akzeptor dar. Die Potentialdifferenz zwischen NADH und Sauerstoff treibt den Elektronentransport innerhalb der Atmungskette an. Im Rahmen des Elektronentransports kommt es zu einer Translokation von Protonen aus der mitochondrialen Matrix in den Intermembranraum. Für die sich anschließende ATP-Synthese ist dies von essentieller Bedeutung. Die Atmungskette setzt sich aus den folgenden vier Komplexen zusammen[49]:

In Komplex I, der NADH-Ubichinon-Reduktase, werden zwei Elektronen und zwei Protonen auf Ubichinon übertragen. Dabei werden die Elektronen zunächst von NADH auf Flavinmononukleotide (FMN) befördert. Anschließend gelangen sie über Eisen-Schwefel-Cluster auf Ubichinon (Coenzym Q). Dieses wird dabei zu Ubichinol reduziert. In Komplex I gelangen insgesamt 4 Protonen in den Intermembranraum. Eine Hemmung des Komplex I ist durch Gabe von Rotenon möglich.

Komplex II, die Succinat-Ubichinon-Oxidoreduktase, kann als Quereinstieg für Elektronen in die Atmungskette genutzt werden. Hierbei werden die im Rahmen der Oxidation von Succinat freiwerdenden Elektronen zunächst auf FAD übertragen. Anschließend gelangen sie von FADH₂ über Eisen-Schwefel-Cluster auf Cytochrom b₅₆₀. Am Ende steht wie im Komplex I die Übertragung von zwei Elektronen und zwei Protonen auf Ubichinon. Komplex II transportiert als einziger Komplex keine Protonen über die Innenmembran. Da zwischen Komplex I und II ebenfalls kein Elektronentransfer stattfindet, kommt es in Folge zu einer Reduktion der Energiegewinnung.

Im Komplex III, der Cytochrom-c-Reduktase, überträgt Ubichinol die Elektronen auf Cytochrom c. In seiner oxidierten Form kann Cytochrom c jedoch nur ein einziges Elektron aufnehmen. Im Rahmen des Q-Zyklus werden die beiden Elektronen des Ubichinol auf zwei Moleküle Cytochrom c verteilt. Pro Elektronenpaar gelangen am Ende vier Protonen in den Intermembranraum. Der Komplex III besitzt sowohl eine Ubichinon-Bindestelle an der Innenseite als auch eine Ubichinol-Bindestelle an der Außenseite der Innenmembran. Die Innenseite lässt sich durch Antimycin A, die Außenseite durch Myxothiazol hemmen.

Komplex IV ist die aus zwei Kupfer-Zentren und zwei Häm-Gruppen bestehende Cytochrom-c-Oxidase. Hier übertragen zwei Moleküle Cytochrom c je ein Elektron auf das Kupfer-Zentrum des Komplex IV. Diese werden weiter auf Sauerstoff übertragen. Der Sauerstoff ist dabei zwischen der Häm-a₃-Gruppe und dem Kupfer-Ion gebunden. Diese Bindungsstelle kann durch Cyanid-Ionen blockiert werden. Am Bindungsort des Sauerstoffs entsteht im Rahmen der Elektronen-Übertragung durch den Verbrauch zweier Protonen als Endprodukt Wasser. Außerhalb der Sauerstoffbindungsstelle erreichen pro Elektronenpaar zwei weitere Protonen den Intermembranraum.

Auf Grund des Elektronentransports gelangen so in der Atmungskette unter physiologischen Bedingungen pro Molekül NADH insgesamt 10 Protonen in den Intermembranraum. Durch das Protonenkonzentrationsgefälle kommt es zwischen Matrix (pH-Wert 7,5-8,2) und Zytosol (pH-Wert 7,0) zu einem chemischen Gradienten. Ferner entsteht durch die unterschiedliche Protonenkonzentration ein elektrisches Membranpotential ($\Delta\Psi_m$) von 150-180 mV. Beide Phänomene werden als elektrochemischer Gradient zusammengefasst. Dieser energetisiert die oxidative Phosphorylierung durch die ATP-Synthase, in der aus ADP und anorganischem Phosphat Adenosintriphosphat (ATP) entsteht[50]. Die ATP-Synthase besteht aus einem als F_0 -Untereinheit bezeichneten Protonenkanal und der katalytischen F_1 -Untereinheit. Durch die F_0 -Untereinheit fließen die Protonen vom Intermembranraum zurück in die Matrix. Dabei energetisieren sie die Trennung des ATP vom Enzym[51].

1.2.1. Zustände der Atmungskettengeschwindigkeit

Die Arbeitsgeschwindigkeit der Atmungskette ist abhängig vom Substratangebot und wurde nach Chance et al. in fünf Zustände gegliedert[52]. Diese beruhen auf Experimenten an isolierten Mitochondrien mittels Clark-Type-Elektrode.

Zustand 1 (Z1) stellt die Grundaktivität der Atmungskette unter Ausschluss von Substraten dar. Die Mitochondrien befinden sich nur in einem phosphathaltigen Respirationsmedium, der O_2 -Verbrauch ist gering.

Zustand 2 (Z2) wurde ursprünglich vor Gabe von Atmungsketten-Substraten gemessen. In heutigen Versuchsprotokollen entspricht er dem Zustand nach Gabe von Succinat oder Pyruvat[53]. Hierunter nimmt der O_2 -Verbrauch zu.

Im Zustand 3 (Z3) werden ADP und Phosphat addiert. Es kommt zu einer maximalen Respirationsrate und ATP-Produktion.

Der anschließende Abfall der Respirationsrate in Folge vollständiger ADP-Umsetzung definiert Zustand 4 (Z4).

Im weiteren Verlauf kommt es im Versuchsmedium zu einem O₂-Mangel und so zum Zustand 5.

Zustand	Substrate	Respirationsrate begrenzt durch:	Bedeutung
1	O ₂	ADP und Substrat	Grundaktivität
2	O ₂ + Succinat/Pyruvat	ADP-Mangel	Aktivitätssteigerung
3	O ₂ + Succinat/Pyruvat + ADP	-	Max. ATP-Produktion
4	O ₂ + Succinat/Pyruvat	ADP-Mangel	Aktivitätsabfall
5	ADP + Succinat/Pyruvat	O ₂ -Mangel	Stillstand

Tabelle 1: Zustände der Atmungskettengeschwindigkeit

Als respiratorischer Kontrollindex (RCR) wird das Verhältnis von Z3 zu Z4 definiert. Es liegt der Leistung gesunder Mitochondrien *in vivo* am nächsten und wird als Maß der Atmungskettenfunktion angesehen. Der Umfang der ATP-Produktion kann durch die Relation von ATP pro Molekül O₂ (P/O-Ratio) erfasst werden.

Die Aktivität der Atmungsketten-Komplexe wird durch (De-)Phosphorylierung gesteuert und kann allosterisch durch ATP gehemmt werden[54].

Die Komplexaktivität greift wiederum regulierend in $\Delta\Psi_m$ ein. Die Beziehung zwischen $\Delta\Psi_m$ und der Aktivität der Atmungskette lässt sich in drei Zustände des $\Delta\Psi_m$ gliedern: „hypoaktiv“, „gesund“ und „hyperaktiv“. Im „hypoaktiven“ Zustand führt eine breitflächige Komplex-Phosphorylierung zum Abfall der ATP-Produktion und niedrigem $\Delta\Psi_m$. Im „gesunden“ Zustand führt eine ausgewogene Komplex-Phosphorylierung zu einem $\Delta\Psi_m$ von 100–140 mV. Dies umfasst den Bereich von 100-120 mV, in welchem die ATP-Synthase maximal aktiv ist.

Durch erhöhte Dephosphorylierung kommt es zu einem „hyperaktiven“ Zustand, der ab einem $\Delta\Psi_m > 150$ mV zu keiner Steigerung der ATP-Gewinnung mehr führt[55]. Es resultiert jedoch ein exponentieller Anstieg reaktiver Sauerstoffspezies mit Schädigung der Zellfunktionen[56].

Darüber hinaus kann die oxidative Phosphorylierung auch schlagartig zum Erliegen kommen. Ursächlich hierfür können sog. „Entkoppler“ sein, die zu einem unregulierten Protonenfluss über die Innenmembran führen. Durch den Verlust des elektrochemischen Gradienten kommt es zu einer Hemmung der ATP-Synthase und Energieverlust in Form von Wärme. Gleichzeitig führt das Absinken der ATP-Konzentration über eine forcierte Komplexaktivierung zu einem gesteigertem O_2 -Verbrauch[57]. In Versuchen zur Entkopplung der Atmungskette finden häufig Carbonylcyanid-m-chlorophenylhydrazon (CCCP) sowie Dinitrophenol (DNP) Anwendung[56].

1.3. Ischämie und Reperfusion (IR)

Das Herz benötigt für seine Arbeit ständig ATP. Dies gewinnt es zu mehr als 95% aus der oxidativen Phosphorylierung. Additiv kann aus der anaeroben Substratphosphorylierung von Fettsäuren, Kohlenhydraten und Ketonkörpern ATP gewonnen werden. Neben der geringen quantitativen Bedeutung dieser anaeroben Glykolyse geht diese einher mit einem energetisch ungünstigen Laktatanstieg.

Ohne Resynthese ist der ATP-Vorrat der Myozyten nach knapp 10 Sekunden erschöpft. Somit ist eine adäquate oxidative Phosphorylierung für das Überleben des Organismus unerlässlich[58]. Unter O_2 -Mangel kommt es jedoch zu einer Hemmung der oxidativen Phosphorylierung. Dies führt zu einem Abfall an ATP sowie vermehrten Anfall an NADH und anorganischen Phosphat. Der ATP-Mangel kann mit Hilfe des als Zwischenspeicher und Transportmedium dienenden Kreatinphosphat nur für wenige Sekunden kompensiert werden[59]. Die fallende ATP-Konzentration stimuliert die anaerobe Glykolyse mit verstärktem Abbau von Glukose und Glykogen. Neben ATP und Pyruvat

entsteht dabei im Rahmen der NAD⁺-Regeneration über die Laktat-Dehydrogenase vermehrt Laktat. Dies führt zu einem Abfall des zytosolischen pH-Werts[60]. Unter physiologischen Bedingungen verstärkt der pH-Abfall die Aktivität des zytosolischen Na⁺/H⁺-Antiporters[61]. Dieser wird durch einen Na⁺-Gradienten angetrieben und transportiert H⁺ in den extrazellulären Raum. Der Versuch so das Protonen-Gleichgewicht wiederzuerlangen, scheitert jedoch unter Ischämie an einem intrazellulären Na⁺-Anstieg. Der Na⁺-Anstieg resultiert dabei wahrscheinlich aus einem Aktivitätsverlust der Na⁺-K⁺-ATPase in Folge sinkender ATP-Spiegel[62]. Die erhöhte intrazelluläre Na⁺-Konzentration führt des Weiteren zu einer Richtungsumkehr des Na⁺-Ca²⁺-Antiporters. In Folge strömt extrazelluläres Ca²⁺ in die Zelle ein[63]. Über Ca²⁺-Uniporter kommt es proportional zum $\Delta\Psi_m$ zu einem Anstieg der intramitochondriale Ca²⁺-Konzentration. Der Ca²⁺-Einstrom und ATP-Mangel führt über Ca²⁺-abhängige Proteasen zur Konversion der Xanthin-Dehydrogenase zur Xanthin-Oxidase[64]. Es kommt zu einem Anstieg freier Radikale in der Zelle, wie in Abbildung 1 dargestellt[65]. Des Weiteren führen die Ischämie bedingten Myokard- und Endothelschäden zu einer Migration von Entzündungsmediatoren. Ist die anaerobe Lage durch ein Perfusionshindernis bedingt, können zusätzlich gewebetoxische Stoffwechselprodukte nicht mehr suffizient abtransportiert werden.

Bei Reperfusion kommt es in der Frühphase zu einem rapiden Anstieg der ROS-Produktion. Primärer Entstehungsort ist dabei die Atmungskette der Mitochondrien. Ferner wird der nun wieder vorhandene Sauerstoff von der Xanthin-Oxidase mit Xanthin zu Superoxid-Anionen metabolisiert. Physiologisch ist die Konzentration der Xanthin-Oxidase im Herzgewebe gering. Sie steigt jedoch unter Ischämie und speziell unter Reperfusion an, und ist maßgeblich an der Produktion des ROS beteiligt[64].

Ein weiterer zentraler Faktor in der Entstehung von Reperfusionsschäden stellt die Öffnung sogenannter „Mitochondrial Permeability Transition Pores“ (mPTP)

dar. Diese unspezifischen Poren der inneren Mitochondrienmembran öffnen sich 2–3 min nach Beginn der Reperfusion[66]. Steigende Konzentrationen an ROS, Phosphat und mitochondrialem Ca^{2+} sowie der Abfall von Adeninnukleotiden gelten als Auslöser der mPTP-Öffnung. Durch die Öffnung der mPTP können Moleküle $<1,5$ kDa die Membran überwinden. Vergleichend zur Entkopplergabe, führt diese sog. „Mitochondrial Permeability Transition“ (MPT) zu einem unkontrollierten Protonenfluss mit Verlust des mitochondrialen $\Delta\Psi_m$ [67]. Die ATP-Synthese sistiert daraufhin. In dem Versuch das Membranpotential zu stabilisieren, kommt es durch die hydrolytische Funktion der F_1F_0 -ATPase zu einem zusätzlichen Verbrauch an ATP[68]. Die Öffnung einer mPTP reicht dabei aus, um durch die Destabilisierung des Membranpotentials weitere Poren zu öffnen. Die Poren können dabei zwischen ihrem jeweiligen Funktionszustand wechseln. Hieraus entstehende kurzfristige Schwankungen des Membranpotentials können im Rahmen einer Signal-Transmission fungieren[69]. In deren Folge kann es in anderen Zellen ebenfalls zu einer mPTP-Öffnung sowie ROS-induzierter ROS-Freisetzung kommen[70].

Die mPTP-Öffnung lässt sich experimentell durch verschiedene Stoffe (z.B. Pyruvat oder Propofol) hemmen[71]. Auch führen pH-Werte <7 auf Grund einer Protonen- Ca^{2+} -Konkurrenz zu Inhibition der mPTP[72]. Somit kommt es unter den sauren Ischämiebedingungen trotz der Anwesenheit von Triggerfaktoren nicht zu einer Öffnung der mPTP[73]. Erst nach Wiedererlangen der aeroben Stoffwechsellage im Rahmen der Reperfusion, führen der intrazelluläre Laktatabfall, die Aktivierung des Na^+/H^+ -Austauschers sowie Bikarbonat-assoziiert Vorgänge zu einem Anstieg des pH-Werts und Öffnung der mPTP[74].

Abseits der ROS-Produktion und mPTP-Öffnung kommt es im Rahmen der Reperfusion zusätzlich zu einer Expression von Adhäsionsproteinen auf den Endothelzellen. Begleitet wird dies durch die Ausschüttung von Zytokinen und den Abfall der endothelialen NO-Konzentration. In Folge kommt es zur Invasion und Adhäsion von neutrophilen Granulozyten an die Gefäßwände. Die hieraus resultierende Perfusionsbehinderung und der inflammatorisch bedingte

Permeabilitätsanstieg des Gefäßendothels führen zu interstitiellen Ödemen[75]. Gewebekontraktionen, der ödematös-bedingte Druck sowie die Störung des Kapillarflusses durch die Lumenverengung aggravieren die O₂-Minderversorgung des Gewebes[76]. Es kommt zum Untergang von Zellen. Hierbei sind die im IR dominierenden Nekrosen von der zellregulierten, ATP-abhängigen Apoptose zu unterscheiden. Die Apoptose beschränkt sich folglich auf Gewebe mit noch suffizientem ATP-Gehalt[72]. Hier kommt es durch ein Übergewicht an pro-apoptischen Bcl-2 Proteinen wie BAX zu einer Permeabilitätssteigerung der äußeren Mitochondrienmembran. Dieser als „Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization“ (MOMP) bezeichnete Vorgang führt durch einen Ausstrom pro-apoptischer Proteine ins Zytosol zur Induktion der Apoptose[77]. Dagegen führt die Öffnung der mPTP hauptsächlich zur Entstehung von Nekrosen[78]. Auf Grund der hohen Proteindichte der Matrix kommt es nach Öffnung der mPTP zu einem osmotischen Einstrom von Wasser. Die damit einhergehende Schwellung der Mitochondrien resultiert in einer Ruptur der äußeren Membran und einem nekrotischen Zelluntergang. Über den begleitenden Austritt von Cytochrom c ins Zytosol sowie Interaktion mit sog. „mitochondrial apoptosis-induced channels“, kommt es in begrenztem Umfang jedoch auch zu einer Induktion der Apoptose [69].

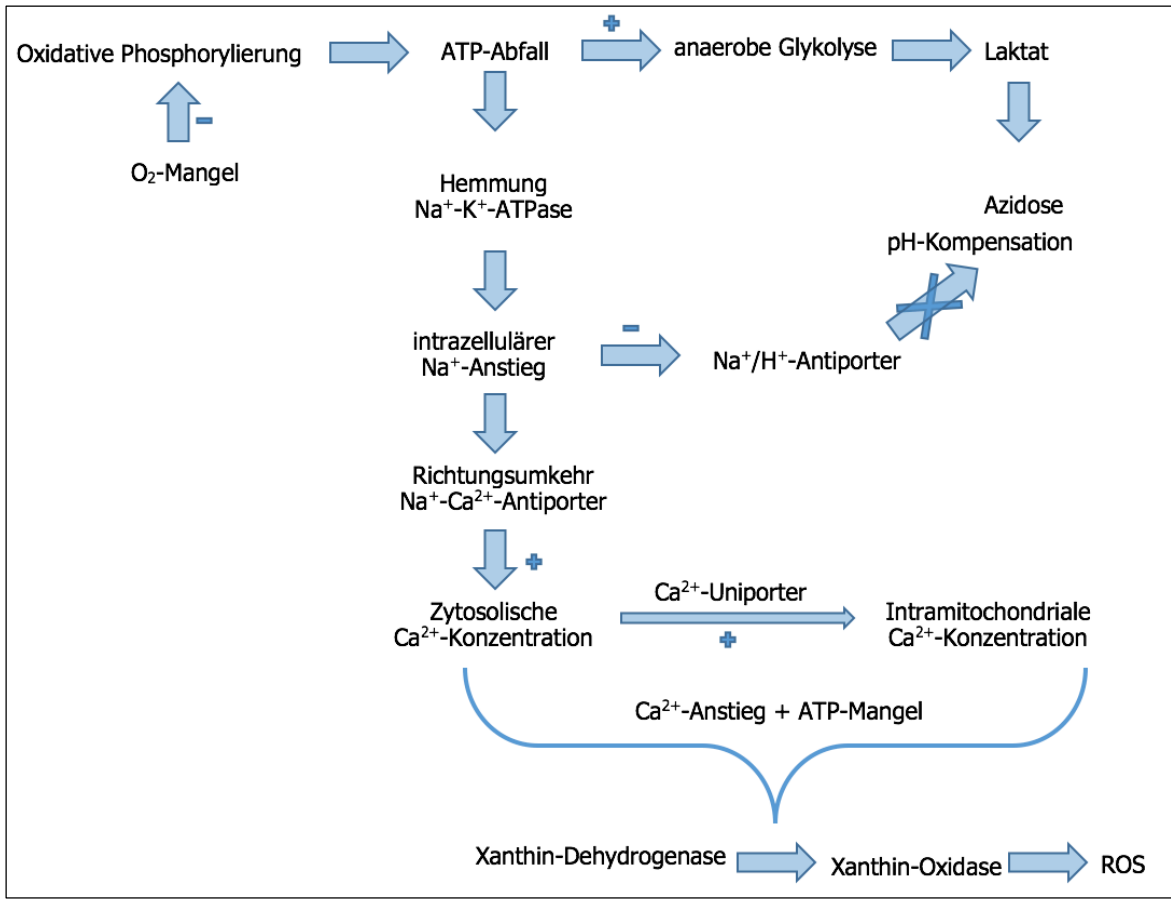


Abbildung 1: ROS-Entstehung unter Ischämie: O_2 -Mangel hemmt die oxidative Phosphorylierung. NADH und anorganische Phosphate steigen an, ATP fällt ab. Dies stimuliert die anaerobe Glykolyse, der Abbau von Glukose und Glykogen wird gefördert. Dabei entsteht Laktat, der zytosolische pH-Wert sinkt. Ein Na^+ -Anstieg resultiert aus dem Aktivitätsverlust der $Na^+-K^+-ATPase$ in Folge sinkender ATP-Spiegel und führt zu einer Richtungsumkehr des Na^+-Ca^{2+} -Antiporters. Eine Kompensation über den zytosolischen Na^+/H^+ -Antiporters ist durch die Ischämie erschwert. Extrazelluläres Ca^{2+} strömt in die Zelle ein. Der Ca^{2+} -Einstrom und ATP-Mangel führt über Ca^{2+} -abhängige Proteasen zur Konvention der Xanthin-Dehydrogenase. Ein Anstieg freier Radikale ist die Folge.

1.3.1. Klinische Relevanz des IR

Die Größe eines aus einer Myokardischämie resultierenden Infarktes ist abhängig von der Ischämiedauer sowie den Umfang des betroffenen Gewebes. Nur eine rechtzeitige Reperfusion kann den Erhalt des Gewebes sicherstellen[79]. In Folge einer sofortiger Reperfusion kann ein sog. „stunning“ beobachtet werden. Dies stellt eine reversible, postischämische Funktionseinschränkung des Myokards dar. Hierbei ist die Substrat- und O₂-Ausschöpfung des Gewebes über die Dauer der Reperfusion hinaus insuffizient[80]. Unter diesem Phänomen summiert sich eine Vielzahl unterschiedlicher Einschränkungen des Herzkreislaufsystems. So kommt es neben einer ventrikulären Dysfunktion auch zu einer metabolischen, elektrophysiologischen sowie endothelialen Funktionsstörung. Apoptose- oder Nekrosevorgänge sind dabei nicht zu finden[81]. In Folge des „stunning“ kann es jedoch zur Entwicklung ischämischer Kardiomyopathien kommen[82].

Verzögert sich die chirurgische oder medikamentöse Intervention, so addieren sich zu den Ischämie-bedingten Schäden jene der Reperfusion hinzu. Diese sind für bis zu 50% der experimentell induzierten Infarktgröße verantwortlich[83].

Unter Reperfusion kommt es zu einem ausgeprägten Abfall der Ventrikel-Compliance und Anstieg des enddiastolischen Ventrikeldrucks. Ebenfalls nimmt die Elastizität der Ventrikelwand ab. Es kommt zu einem systolischen und diastolischen Funktionsverlust[84]. Ursächlich hierfür sind Hyperkontraktionen der Kardiomyozyten[84]. Diese resultieren aus einem Zusammenspiel niedriger Mengen an ATP (<100 µM) und einer erhöhten Ca²⁺-Konzentration. Die dabei entstehenden zytoskelettalen Defekte machen die Myozyten anfälliger gegenüber Belastungen und führen zu sog. Bandnekrosen. Als histologisches Korrelat lassen sich stark kontrahierte Sarkomere und zerstörte Sarkolemm darstellen. Durch eine Beeinflussung der Na⁺- und Ca²⁺-Konzentrationen kommt es über Gap Junctions zur Ausdehnung der Nekrose auf Nachbarzellen[84]. Während dieser initialen Phase der Reperfusion korreliert der Umfang der Kontraktion mit der Ausschüttung von Herzenzymen. Unter Ischämie treten die

Kontraktionen ebenfalls auf. Sie sind dort jedoch schwächer ausgeprägt, da das Zeitintervall, in welchem noch genügend ATP zu Verfügung steht, kürzer ist. Auch lösen sich diese Kontraktionen unter Reperfusion meist wieder. Kommt es jedoch im Rahmen einer langandauernden globalen Ischämie zu einer umfassenden Kontraktur des Myokards, so spricht man von einem sog. „stone heart“[84]. Bedingt durch die starke Muskelkontraktion und den Verlust intrazellulärer Proteinen, erscheint hier das Herz morphologisch steif und blass. Eine im Rahmen der Reperfusion unvollständige Erholung der Zirkulation, wird in der Transplantationschirurgie als „no-reflow“-Phänomen bezeichnet[82]. Postinterventionell zeigt sich dieses beispielsweise in einer inkompletten Rückbildung einer ST-Streckenveränderung[82].

Des Weiteren führen die IR-Schäden zu einem linksventrikulärem Remodelling sowie einer Erhöhung der Letalität auf Grund von (Re)Infarkten und Rupturen. Basierend auf einer reduzierten ATP-Synthese, erhöhtem ROS-Anfall und Ca²⁺-Dysregulation, verschlechtern Reperfusionarrhythmien die Prognose der Patienten weiter. Endotheliale Dysfunktionen führen auf Grund von Vasokonstruktion und Aggregation von Thrombozyten und Granulozyten zu einer Gefäßverengung. Eine Minderperfusion und Freisetzung gewebetoxischer Substanzen sind die Folge[82]. Es kommt zu organübergreifenden Schäden, die in einem „Systemic inflammatory response syndrome“ (SIRS) und Multiorganversagen münden können[81]. Der gesamte Umfang des Gewebeuntergangs ist frühestens zwei Stunden nach Reperfusionbeginn erkennbar[75].

1.3.2. Akute Herzinsuffizienz – Häufige klinische Folge des IR

Pathophysiologisch stellt eine Herzinsuffizienz das kardiale Unvermögen dar, bei normalem Füllungsdruck ein für die Gewebepfusion notwendiges Herzzeitvolumen (HZV) aufrechtzuerhalten[85]. In der westlichen Welt ist die akute Herzinsuffizienz (AHF, acute heart failure) die häufigste Ursache einer Hospitalisierung älterer Patienten[86]. Die AHF unterscheidet sich von der chronischen Herzinsuffizienz durch das unmittelbare Einsetzen oder der akuten

Progredienz von Symptomen. Neben einer neu auftretenden „de novo“-Herzinsuffizienz, kommt es in $\frac{1}{3}$ der Fälle zu einer akut dekompensierten chronischen Herzinsuffizienz (ADCHF) mit schlechterer Prognose[87]. Für eine Erstmanifestation einer AHF sind primär die IR-bedingten Schäden in Rahmen akuter Koronarsyndrome (42%), Arrhythmien (30%) oder Klappendysfunktionen (21%) ursächlich. Auslöser einer ADCHF können Rhythmusstörungen oder eine Volumenbelastung auf Grund einer abgesetzten Diuretikatherapie sein. Ferner kommen schwere hypertone Entgleisungen, Infektionen oder Lungenembolien in Frage[88]. Bei stationärer Aufnahme weisen AHF-Patienten zu 89% Luftnot auf. Pulmonale Rasselgeräusche ließen sich bei 68%, periphere Ödeme bei 66% der Patienten finden[89]. Gestaute Halsvenen, Pleuraergüsse sowie Tachykardien sind weitere Symptome. Im Rahmen einer akuten AHF kommt es zum Anstieg von kardialen und renalen Laborparametern ((NT)pro-BNP, Troponin, Kreatinin). Ferner führt der Abfall der Gewebepfusion zu weiteren ischämiebedingten Schäden. IR-Schäden können somit Ursache wie auch Folge der AHF darstellen[90]. Als Sonderform der AHF wird das Postkardiotomie-Versagen beschrieben, das bei 2-6% der kardiochirurgischen Eingriffe auftritt. Es beschreibt eine akute therapierefraktäre Herzinsuffizienz, die sich während oder direkt nach einem kardiochirurgischen Eingriff unter Einsatz einer Herz-Lungen-Maschine (HLM) zeigt. Die Patienten lassen sich nicht von der HLM entwöhnen oder erleiden unmittelbar postoperativ eine akute kardiale Dysfunktion[91].

Therapie

Initiales Therapieziel ist eine Symptomverbesserung. Die Langzeittherapie dient der Senkung der Rehospitalisierungsrate. Komorbiditäten wie KHK, Vorhofflimmern, Diabetes oder Nephropathien erschweren die Behandlung. Basismaßnahmen sind die bedarfsgerechte Lagerung sowie O₂-Gabe bei inadäquater systemischer Oxygenierung. Grundsätzlich ist eine Thromboembolieprophylaxe mit hoch- oder niedermolekularem Heparin im

Rahmen von Immobilisation, Lungenstauung oder Vorhofflimmern indiziert. Abhängig von der Ursache der AHF variieren die therapeutischen Richtlinien der European Society of Cardiology (ESC)[85]:

Akutes Koronarsyndrom

Unter perkutaner Koronar-Intervention (PCI) lässt sich bei Patienten mit ST-Hebungsinfarkt eine signifikante Senkung der Letalität erkennen. Alternativ ist eine Bypassoperation oder intravenöse Thrombolyse indiziert. Patienten mit EF \leq 40% profitieren von Aldosteron-Antagonisten wie Eplerenon.

Postinterventionell werden Betablocker und ACE-Hemmer (bzw. Angiotensin-Renin-Blocker) zur Senkung von Mortalität und Reinfarktrate empfohlen. Auch bei NSTEMI oder einem im Rahmen eines akuten Koronarsyndrom neu aufgetretenen Linksschenkelblock wird eine zeitnahe PCI oder Bypassoperation angeraten.

Arrhythmien

Hämodynamisch relevante Tachyarrhythmien sind zügig mittels Elektrokardioversion zu terminieren. Bei refraktären Arrhythmien wird zum Einsatz von Amiodaron oder einer Katheterablation geraten. Bei hämodynamisch wirksamen Bradykardien wird eine Schrittmachertherapie empfohlen.

Lungenödem

Patienten mit Lungenödem bedürfen einer i.v.-Therapie mit Schleifendiuretika (Furosemid). Bei Luftnot sollte zusätzlich O_2 , bei Agitation ggf. ein Opioid (z.B. Morphin) appliziert werden. Bei $RR_{sys} > 110$ mmHg seien Vasodilatoren (Glyceroltrinitrat, Natriumnitroprussid) zu ergänzen.

Die NO-vermittelte Aktivierung des zyklischen Guanosin-Monophosphats (cGMP) führt zum Tonusverlust der Gefäßwände mit Reduktion von Vor- und Nachlast.

Akute kardiogene Dekompensation

Unter Schocksymptomatik und/oder bei $RR_{sys} < 85$ mmHg ist die Perfusion der Endorgane akut gefährdet. Bei solch kritischen Patienten können Inotropika die Hämodynamik verbessern. Bevorzugt wird hier Dobutamin verwendet, das vor allem bei Patienten mit Nierendysfunktion und systemischer Hypotension anderen inotropen Medikamenten überlegen ist. Auf Grund der arrhythmie- und ischämiebedingten Erhöhung der Mortalität, ist die Indikation für Inotropika jedoch eng zu stellen. Bei Nichtansprechen der Inotropika empfiehlt die ESC die additive Gabe von Vasopressoren wie Dopamin oder Norepinephrin. Bei therapierefraktärer Hypotension soll Levosimendan eingesetzt werden. Der Kalzium-Sensitizer Levosimendan führt zu inotropen und vasodilatatorischen Effekten durch Öffnung zellulärer Kalium-Kanäle. Alternativ sollen Phosphodiesterase Hemmer der Klasse IIIc (Enoximon, Milrinon) verwendet werden. Der Einsatz von Levosimendan und Phosphodiesterase-Hemmern wird laut ESC speziell dann empfohlen, wenn die Hypoperfusion durch eine Beta-Blockade bedingt ist und diese antagonisiert werden muss (Evidenzgrad C / Empfehlungsgrad IIb). Bei Versagen der medikamentösen und interventionellen Therapie, können Patienten im kardiogenen Schock bis zu einer chirurgischen Intervention durch eine intraaortale Ballongegenpulsation stabilisiert werden. Operative Optionen stellen die Herztransplantation sowie Implantation eines ventrikulären Unterstützungssystems dar.

Leitsymptom	Primärtherapie	Sekundärtherapie	Anmerkungen
Akutes Koronarsyndrom	perkutane Koronar-Intervention (PCI)	Bypassoperation oder intravenöse Thrombolyse ^a	Bei EF ≤ 40% Aldosteron-Antagonisten ^b (Eplerenon) Postinterventionell Betablocker ^b und ACE-Hemmer ^b (bzw. Angiotensin-Renin-Blocker)
Hämodynamisch relevante Tachyarrhythmie	Elektrokardioversion	Amiodaron, Katheterablation	
hämodynamisch relevante Bradykardie	Schrittmachertherapie		
Lungenödem	Schleifendiugetika (Furosemid)	Bei RR _{sys} > 110 mmHg Vasodilatoren (Glyceroltrinitrat, Natriumnitroprussid)	Bei Luftnot zusätzlich O ₂ , bei Agitation ggf. Opioid (Morphin)
Schocksymptomatik und/oder RR _{sys} < 85 mmHg	Inotropika (Dobutamin)	Vasopressoren (Dopamin, Norepinephrin)	Bei Therapieversagen: intraaortale Ballongegenpulsation bis zur operativen Versorgung (Herztransplantat oder ventrikuläre Unterstützungssysteme)
therapierefraktäre Hypotension	Kalzium-Sensitizer (Levosimendan)	Phosphodiesterase IIIc-Hemmer ^d (Enoximon, Milrinon)	

Tabelle 2: Therapie der AHF - Modifiziert nach ESC-Guideline 2012

Anmerkungen: ^a Falls PCI nicht verfügbar; ^b Senkt die Mortalität; ^c Bei Versagen der Inotropika; ^d speziell wenn Hypoperfusion durch Beta-Blockade bedingt ist

1.4. Calcium-Ionen

Physiologisch kommt es im Rahmen der Muskelkontraktion in den Kardiomyozyten zu einem Anstieg der freien zytosolischen Ca²⁺-Konzentration. Hierbei öffnen sich Aktionspotential-getriggert die spannungsabhängigen L-Typ Ca²⁺-Kanäle der Zellmembran. Der Einstrom extrazellulärem Ca²⁺ führt über die Aktivierung von Ryanodin-Rezeptoren des sarkoplasmatischen Retikulum (SR) zu einer zusätzlichen Ca²⁺-induzierten Ca²⁺-Freisetzung aus dem SR[92]. Im kontraktilem Apparat bindet Ca²⁺ an Troponin C und führt so zur Initiierung der Muskelkontraktion. Anschließend dissoziiert Ca²⁺ wieder von Troponin C. Die Wiederaufnahme in das SR wird über die Aktivierung der Ca²⁺-ATPase 2a (SERCA2a) vermittelt.

Ferner kann Ca^{2+} auch über einen $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Antiporter (NCX) wieder nach extrazellulär transportiert werden[93, 94]. Neben seiner Bedeutung für die Muskelkontraktur, übernimmt Ca^{2+} weitere wichtige zellspezifische Funktionen. Über die (De-)Phosphorylierung von Proteinen kann es Proteasen und Phosphatasen (de-)aktivieren. So führt Ca^{2+} in der mitochondrialen Matrix über die Aktivierung der Pyruvat-, α -Ketoglutarat- und Isocitrat-Dehydrogenase zur Stimulation der Glykolyse und Acetyl-CoA-Bildung[95]. Des Weiteren führt ein Anstieg der mitochondrialen Ca^{2+} -Konzentration zu einer erhöhten ROS-Produktion und Öffnung der mPTP[96]. Zusätzlich kommt es zu einer Ca^{2+} -abhängigen Aktivierungen von Calpain. Im Rahmen von IR-Intervallen nehmen Calcium-Ionen so eine zentrale Rolle in der Induktion von Nekrose- und Apoptosevorgängen ein.[97]

1.5. Oxidativer Stress

Die freien Elektronen in der Außenhülle machen anatomischen Sauerstoff anfällig für die Entstehung von Radikalen. Durch homolytische Spaltung sauerstoffhaltiger Verbindungen fallen so reaktive Sauerstoffspezien (ROS) an[98]. Die Hauptmasse der ROS machen dabei Superoxidradikale (O_2^-) aus[99]. Diese entstehen zu etwa 90% in der Atmungskette (ETC). In der ETC sind es primär die Komplexe I und III, die an der ROS-Produktion beteiligt sind[100]. O_2^- hat selber nur eine geringe oxidative Potenz, stellt aber Vorstufe und Induktor weiterer Radikale dar[98]. So reduziert es Übergangsmetalle wie Fe^{2+} und reagiert mit Stickstoffmonoxid (NO) zu stark oxidativem Peroxynitrit (ONOO^-)[101]. NO repräsentiert dabei den Großteil der reaktiven Stickstoffspezien (RNS), die mehrheitlich der NO-Synthase entstammen.

O_2^- wird durch die Superoxiddismutase zu Hydrogenperoxid (H_2O_2) und mit Hilfe der Glutathion-Peroxidase weiter in H_2O und O_2 gespalten[102]. Eine Hemmung der Glutathion-Peroxidase durch die reduzierten Übergangsmetalle führt im Sinne der Fenton-Reaktion zur Entstehung extrem reaktiver Hydroxylradikale ($\text{OH}\bullet$)[68]. In geringen Mengen entstehen ROS auch an membrangebundenen Proteinen. So fallen an der Zellmembran neutrophiler Granulozyten unter

Aktivität der NADPH-Oxidase ebenfalls ROS an[103]. Auch an zytosolständigen Enzymen wie der Cyclooxygenase oder den im Fettstoffwechsel wichtigen Peroxisomen entstehen reaktive Oxidantien[100]. Ebenso tragen die α -Ketoglutarat-Dehydrogenase und die Glycerol-3-Phosphatdehydrogenase sowie zahlreiche weitere Enzyme zur ROS-Entstehung bei[104, 105].

ROS und RNS sind nachgewiesenermaßen stark zellschädigend. Sie können auf direktem Wege DNA-, RNA- und Proteinstrukturen schädigen. Hierbei ist die mitochondriale DNA auf Grund ihrer räumlichen Nähe zur ETC und fehlenden stabilisierenden Histone besonders anfällig[98]. Durch Triggerung der mPTP-Öffnung beeinflussen ROS ebenfalls das Zellüberleben.

Über die Peroxidation von ungesättigten Fettsäuren kommt es außerdem zur Funktionseinschränkung von Phospholipiden sowie des für die Aktivität des Atmungskomplex I wichtigen Cardiolipins[106].

Auf einen Anstieg der ROS/RNS-Konzentration reagiert die Zelle in den betroffenen Zellkompartimenten mittels anti-oxidativer Maßnahmen. Hierfür stehen Glutathionperoxidasen, Superoxiddismutasen, Katalasen sowie DNA-Reperaturenzyme zu Verfügung[98]. Abseits der schädigenden Wirkung können Konzentrationsschwankungen der ROS auch ein Bestandteil intrazellulärer Kommunikation sein[107]. Ferner nehmen ROS auch in Alterungsprozessen der Zelle eine zentrale Rolle ein[108].

1.6. Enoximon (Perfan®)

Enoximon (Perfan®) ist ein Phosphodiesterasehemmer. Es ist ein nicht-glykosidisches, nicht-katecholaminerges Imidazolderivat. Unabhängig von der Stimulation adrenerger Rezeptoren führt es über eine Hemmung der Phosphodiesterase III zu einer Erhöhung der intrazellulären zyklischen AMP-Konzentration (cAMP). An der glatten Gefäßmuskulatur bedingt cAMP die Phosphorylierung der Myosin-Leichtketten-Kinase. Die hieraus resultierende Vasodilatation führt zur Senkung von Vor- und Nachlast[113-115]. Über die Nachlastsenkung kommt es ferner zu einer Verbesserung der diastolischen Myokardentspannung. Des Weiteren führt die steigende cAMP-Konzentration zu

einer verstärkten Aktivierung der Proteinkinase A. Diese phosphoryliert langsame L-Typ-Ca²⁺-Kanäle, die sich daraufhin öffnen. Durch das nun vermehrt von extrazellulär einströmende und zusätzlich aus dem SR freigesetzte Ca²⁺, beschleunigt Enoximon die Aktionspotential-abhängige intrazelluläre Ca²⁺ Erhöhung in der Plateauphase der Herzaktion. Zusätzlich kommt es während der Relaxationsphase zu einer forcierten Wiederaufnahme von Ca²⁺ in das SR[116, 117]. Hieraus resultiert eine leichte Zunahme der Kontraktionskraft. Unter intravenöser Gabe von Enoximon kommt es so zu einer Erhöhung des kardialen Index, einem Anstieg des mittleren arteriellen Drucks (MAD) sowie einem Abfall des Wedge- und rechtsatrialen Drucks[118, 119]. Dabei beruhen diese Veränderungen primär auf den vasodilatativen Eigenschaften von Perfan®. Enoximon wird bei akuter schwerer Herzinsuffizienz zur Kurzzeittherapie eingesetzt. Die Applikation erfolgt über eine Spritzenpumpe. Die Dosis für Enoximon sollte möglichst gering sein, da die gefäßerweiternde Wirkung die der Inotropie überwiegt. Bei hypovolämen Patienten besteht so die Gefahr einer Hypotonie mit reaktiver Tachykardie. Da Enoximon auch die atriale und ventrikuläre Refraktärzeit verkürzt, ist hinsichtlich potentieller ventrikulärer Arrhythmien und Blutdruckabfälle eine durchgängige Überwachung des Patienten erforderlich[120].

Laut Hersteller ist Enoximon im Blut zu fast 85% an Proteine gebunden. Die Eliminationshalbwertszeit gesunder Probanden wird mit 4,2 Stunden angegeben. Der hauptsächliche Metabolisierungsweg von Enoximon ist die hepatorenale Oxidation zu Sulfoxid, bei einem renalen Eliminationsanteil von 70 – 80%. Bei der Verwendung ist daran zu denken, dass Enoximon in Kunststoffbehältnissen nur mit isotonischer Natriumchloridlösung verdünnt und nicht länger als 24h bei Raumtemperatur gelagert werden darf.

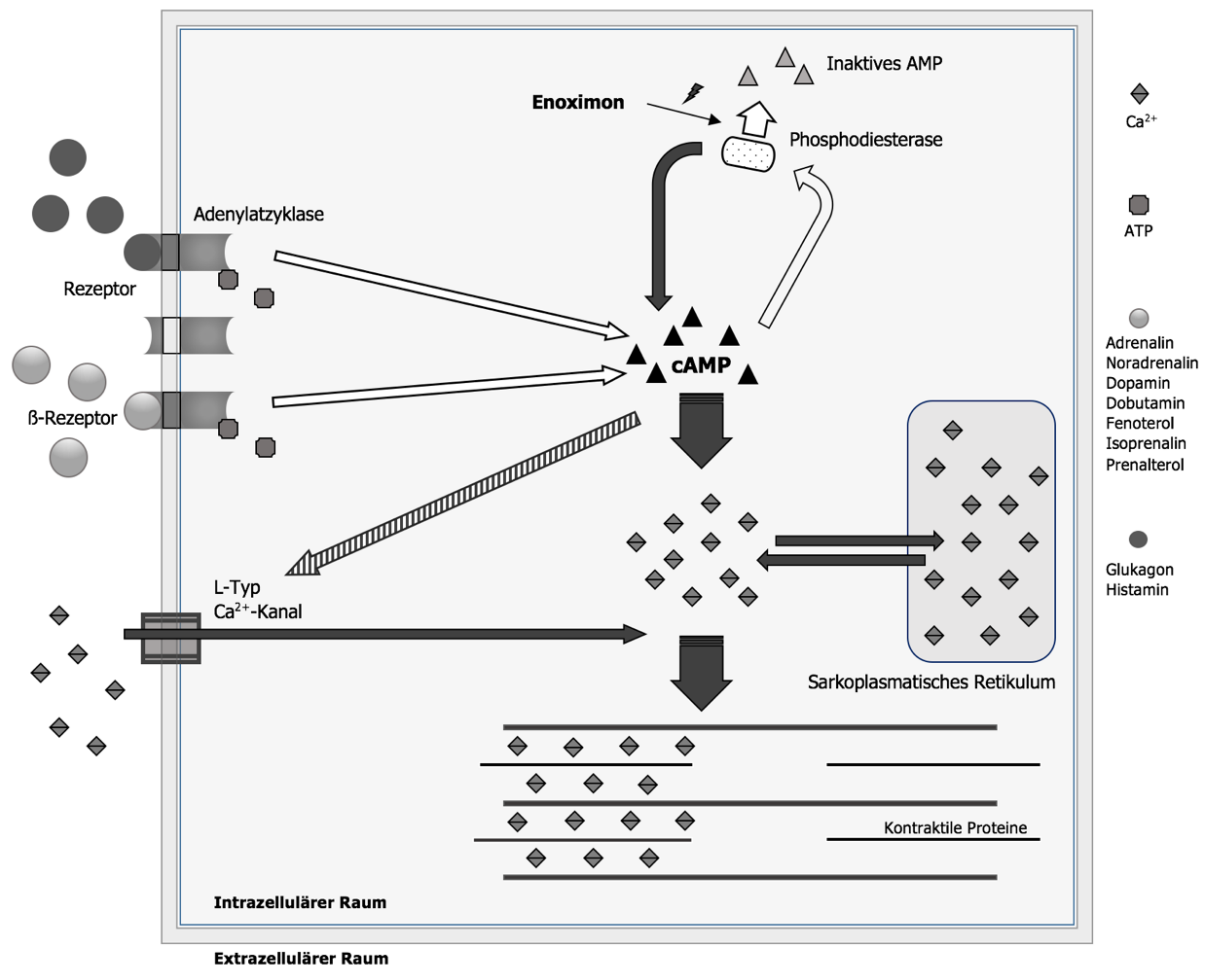


Abbildung 2: Inotropischer Wirkmechanismus von Enoximon, modifiziert nach „Enoximone in the clinical daily routine“[121]: Die Bindung von Inotropika an Betarezeptoren führt zur Ausschüttung von cAMP. Enoximon hemmt dessen Abbau über die Phosphodiesterase III, die intrazelluläre Konzentration an cAMP steigt weiter. Über die Phosphorylierung der Myosin-Leichtketten-Kinase resultiert eine Vasodilatation, Vor- und Nachlast sinken. Die Phosphorylierung und Öffnung langsamer L-Typ-Ca²⁺-Kanäle durch die Proteinkinase A nimmt zu, die Aktionspotential-abhängige intrazelluläre Ca²⁺ Erhöhung in der Plateauphase der Herzaktion verstärkt sich. Zusätzlich steigt die Kontraktionskraft durch forcierte Wiederaufnahme von Ca²⁺ in das SR in Relaxationsphase.

1.7. Forschungsgebiet

Enoximon wird im klinischen Alltag häufig zur Behandlung eines akuten myokardialen Versagens verwendet. Auf Grund seiner vasodilatierenden sowie positiv ino- und chronotropen Wirkung, führt es bei schwerer myokardialer Insuffizienz zu einer Steigerung der Herzleistung. Das klinische Augenmerk der

kardioprotektiven Therapie liegt dabei auf einer Drosselung der Progression der IR-Schäden. Die klinische Wirksamkeit von Enoximon konnte in diesem Zusammenhang in mehreren Studien beschrieben werden[118, 122, 123]. Ob Enoximon den IR-Schäden dabei auf einer mitochondrialen Ebene entgegenwirkt, wurde bereits in früheren Versuchen unseres Labors untersucht. So konnten Untersuchungen unseres Labors zeigen, dass Enoximon die Atmungsketten-Aktivität und das Schwellungsverhalten der Mitochondrien beeinflusst. In beiden mitochondrialen Subpopulationen hatte Enoximon nach 15-minütiger Ischämie einen stabilisierenden Einfluss auf die Mitochondrien in der Reperfusionphase. In wie weit diese Ergebnisse reproduzierbar und auch unter länger andauernder Ischämiezeit Bestand haben, bleibt aufzuklären.

1.8. Ziel und Umfang der vorliegenden Arbeit

Die vorliegende Arbeit hat eine zellbiologische Bewertung der myokardialen Ischämie-Reperfusionsschäden zum Ziel. In Rahmen dieser wird untersucht, in wie weit sich die Wirkung von Enoximon bei Herz- und Mitochondrienleistung bemerkbar macht. Besonderes Interesse liegt dabei auf dem Vergleich der Wirkung von Enoximon unter mitochondrialer Dysfunktion zur Wirkung unter nicht-ischämischen Bedingungen. Anhand des Modells der Langendorffperfusion werden hierfür 4 Versuchsgruppen in ihren Ergebnissen verglichen. Die Gruppen unterscheiden sich hinsichtlich der Kombination von Gebrauch bzw. Nichtgebrauch der Ischämiezeit und des Enoximon. Nach Erfassung der kardialen Leistungsparameter innerhalb des Langendorff-Versuchs, soll die anschließende Isolation der Mitochondrien weitere Erkenntnisse liefern. Durch eine Ca^{2+} -induzierte Mitochondrienschwellung wird hierbei eine Aussage zur Vitalität der Mitochondrien getroffen. Störungen innerhalb der Atmungskette werden durch die Messung des O_2 -Verbrauchs der Mitochondrien dargestellt.

2. Material und Methoden

2.1. Verwendete Materialien

Sofern in der nachfolgenden Tabelle nicht anders angeben, kamen alle Substanzen von der Sigma-Aldrich GmbH (München, Deutschland).

Material	Zusammensetzung / Herkunft
Krebs-Henseleit-Lösung	180 mmol NaCl, 4,7 mmol KCl, 1,2 mmol MgSO ₄ , 1,25 mmol CaCl ₂ , 1,2 mmol KH ₂ PO ₄ , 25 mmol NaHCO ₃ , 11 mmol D-Glucose
Kardioplege-Lösung	10 mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), 180 mM KCl, pH 7,4
Isolationspuffer (Puffer 1)	0,225 mol/l Mannitol, 0,005 mol/l 3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure, 0,075 mol/l Sucrose, 0,002 mol/l EDTA, 1 mg/ml bovines Serumalbumin, pH 7,4
Waschpuffer (Puffer 2)	0,225 mol/l Mannitol, 0,075 mol/l Sucrose, 20 mmol/l Tris/HCl, pH 7,4
Calciumpuffer (Puffer 3)	145 mM KCl, 5 mM KH ₂ PO ₄ , 20 mM Tris, pH 7,2
Respirationspuffer (Puffer 4)	0,3 mol/l Mannitol, 10 mmol/l KH ₂ PO ₄ , 10 mmol/l KCl, 5 mmol/l MgCl ₂ , pH 7,2
Schwellungspuffer (Puffer 5)	250 mmol/l Sucrose, 5 mmol/l KH ₂ PO ₄ , 3 µmol/l Rotenone
KP-Puffer	Kalium-Phosphat (0.5 M, pH 7,5)
T-Puffer	Tris (200 mM, pH 8.0) mit Triton X-100 (0.2 % (vol/vol))
BSA	60 µl fettsäurefreies bovines Serumalbumin (50 mg/ml)
Proteinase	Sigma-Aldrich GmbH (München, Deutschland)
Custodiol	Dr. Franz Köhler Chemie GmbH, Deutschland
Perfan [®] (Enoximon)	Carinopharm GmbH
Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific, Waltham, USA
PBS (Phosphat gepufferte Saline)	Firma Invitrogen (Life Technologies), Darmstadt, Deutschland

Pyruvat, Malat, ADP, G3P, Succinat, Rotenone, CaCl ₂ , Oligomycin, CCCP, DUQH ₂ , Antimycin, TMPD, Cytochrome C, Ascorbat	Sigma-Aldrich GmbH (München, Deutschland)
Langendorff-Apparatur	Föhr Medical Instruments GmbH, Seeheim, Deutschland
Alaris GH Spritzenpumpe	Cardinal Health, Dublin, Irland
Herzschrittmacher	Osyka Medical GmbH, Berlin, Deutschland
Nu-5500 Autoflow IR Direct Heat CO ₂ Inkubator	Integra Bioscience GmbH, Fernwald, Deutschland
Titramax 100 T Orbital Shaker SLT	Labinstruments GmbH, Crailsheim, Deutschland
Tecan Spectra II Photometer	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim, Deutschland
SAB 71 Waage	Integra Bioscience GmbH, Fernwald, Deutschland
Wärmeschrank	Memmert, Schwabach, Deutschland
IKA® VORTEX GENIUS 5	IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
IKA® T25 digital ULTRA TURRAX®	IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
5 ml Glaspotter Duall 22	Omnilab, Bremen, Deutschland
Rotanta 46 R Zentrifuge	Hettich, Tuttlingen, Deutschland
Multifuge 1 S-R	Kendro Laboratory, Osterode, Deutschland
Oxytherm Elektrodeneinheit	Hansatech Instruments Ltd., Norfolk, UK
Ultrospec 3000® Photometer	Pharmacia Biotech, Stockholm, Schweden

Tabelle 3: Materialliste

2.2. Versuchstiere und Tierhaltung

Männliche 280-320g schwere Wistar Unilever Ratten wurden von der Firma Charles River Laboratories (Sulzfeld, Deutschland) bezogen. Die Tiere wurden entsprechend der europäischen Tierschutzvorgaben sowie der Bestimmungen der Julius-Maximilians-Universität Würzburg gehalten. Sie wurden mit Wasser und Fertigfutter ernährt und in einem 12h-Tag/12h-Nachtzyklus zu je 5-6 Tieren in ihren Käfigen gehalten. Dem Tierversuch wurde unter dem Aktenzeichen 31/11 durch die Bezirksregierung von Unterfranken stattgegeben.

2.3. Gruppeneinteilung der Versuchstiere

Diese Arbeit gliedert sich in 4 verschiedene Gruppen mit einem Umfang von je 8 Tieren (n=8/Gruppe). Die Extraktion sowie die spätere Präparation der Herzen waren in allen Gruppen identisch. Im Langendorff-Versuch unterschieden sich die Gruppen wie folgt:

Gruppe	Bezeichnung	Merkmal
Kontrollgruppe	IR 0/30 (Kontrolle)	30 min Perfusion
Versuchsgruppe 1	IR 40/30	40 min Ischämie, 30 min Reperfusion
Versuchsgruppe 2	Enox-IR 0/30	30 min Perfusion, Perfan [®] -Applikation
Versuchsgruppe 3	Enox-IR 40/30	40 min Ischämie, 30 min Reperfusion, Perfan [®] -Applikation

Tabelle 4: Gruppeneinteilung

2.4. Herzpräparation und Vorbereitung für den Langendorff-Versuch

Die Versuchstiere wurden in einem Isofluranbad (5% Isofluran, 95% Sauerstoff) betäubt. Anschließend wurden sie gewogen und der Thorax und das Abdomen rasiert. Die Ratten wurden in Rückenlage fixiert. Die Brusthöhle wurde durch eine mediane Sternotomie eröffnet und Thymus, Pleura sowie Perikard entfernt.

Nach Absetzen der Gefäßversorgung, wurde das Herz-Lungenpaket vorsichtig entlang des Ösophagus freipräpariert und aus der Brusthöhle entfernt. Durch Immersion des Herzens in eisgekühlter, Phosphat gepufferter Saline (PBS) wurde ein initialer Herzstillstand hervorgerufen.

Zur Vorbereitung für den Langendorff Versuch legten wir das Herz auf einer feuchten und gekühlten Gaze ab. Die Aorta wurde auf eine Länge von ca. 1 cm gekürzt, die Perfusionskanüle in die Aorta eingesetzt und mittels chirurgischem Knoten fixiert. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Kanüle nicht durch ein zu weites Verschieben die Ostien verlegte oder die Klappe verletzte. Die Perfusionskanüle wurde zum Entlüften mit eiskaltem PBS gefüllt und an die Spritzenpumpe (Alaris GH Spritzenpumpe, Cardinal Health, Dublin, Irland) angeschlossen. Die Lunge, das dem Herz anhaftende Bindegewebe sowie zu- und abführende Herzgefäße mit Ausnahme der Aorta wurden entfernt und auf Lungenvenenebene abgesetzt. Anschließend wurde über die Mitralklappe ein Zugang zum linken Ventrikel geschaffen, um den Ballonkatheter der Langendorff-Apparatur (Föhr Medical Instruments GmbH, Seeheim, Deutschland) in der linken Herzkammer platzieren zu können.

Um eventuell auftretende Rhythmusstörungen während der späteren Versuche zu terminieren, wurde epikardial eine Herzschrittmacherelektrode (Osyka Medical GmbH, Berlin, Deutschland) platziert. Bei der Präparation wurde darauf geachtet, dass alle Kanülen und Schläuche luftfrei waren. Analog zu Hearse and Sutherland wurde das Herz von Präparationsbeginn, über das Einbringen der Aortenkanüle bis hin zum Einbau in die Langendorff-Apparatur für 2 Minuten mit 10 ml/min eisgekühlter Custodiollösung perfundiert[124].

2.5. Langendorff-Versuch

Nach Anschluss der Perfusionskanüle an die Langendorffanlage (Föhr Medical Instruments GmbH, Seeheim, Deutschland) wurde das Herz über einen Zulauf mit 1 ml 37°C-warmer Custodiol®-Lösung gespült. Anschließend starteten wir die Perfusion mit einer Krebs-Henseleit Lösung. Dieser wurde Carbogen

(Dräger, Lübeck, Deutschland, 5 Vol.-% CO₂, 95 Vol.-% O₂) hinzugefügt. Mit Hilfe eines Steigrohres wurde ein konstanter Perfusionsdruck von 73,6 mmHg im System etabliert.

Die Schrittmacherelektrode wurde an einen externen Schrittmacher angeschlossen, der mit einer Frequenz von 100/min bei Bradykardie eingesetzt wurde. Zum Aufbau eines konstanten diastolischen Drucks wurde ein Ballon im evakuierten Zustand in den linken Ventrikel platziert und mit H₂O entsprechend eines Drucks von 18 mmHg luftblasenfrei gefüllt. Mit Beginn der Herzperfusion wurde so bei einem LVEP von 18 mmHg und einem Perfusionsdruck von 73,6 mmHg in allen Gruppen zunächst eine 5-minütige Stabilisierungsphase abgewartet. Bei den Versuchsgruppen mit Ischämie wurde diese als globale normotherme Ischämie durchgeführt, indem nach der Stabilisationsphase die Perfusion des Herzens eingestellt wurde. In dieser Zeit verblieb das Herz an der Langendorff-Apparatur und wurde durch eine Plastikverkleidung vor Wärmeverlust geschützt. Der Ballon war über die Ischämiedauer entleert und wurde für die Phase der Reperfusion wieder über eine Hamiltonspritze auf 18 mmHg aufgedehnt. Die Applikation von 0,17 µg/min Enoximone (Perfan®) in den Enoximon-Gruppen erfolgte mittels Spritzenpumpe (Alaris GH Spritzenpumpe, Cardinal Health, Dublin, Irland). Sie wurde 5 min nach Reperfusionbeginn über eine Dauer von 20 min durchgeführt.

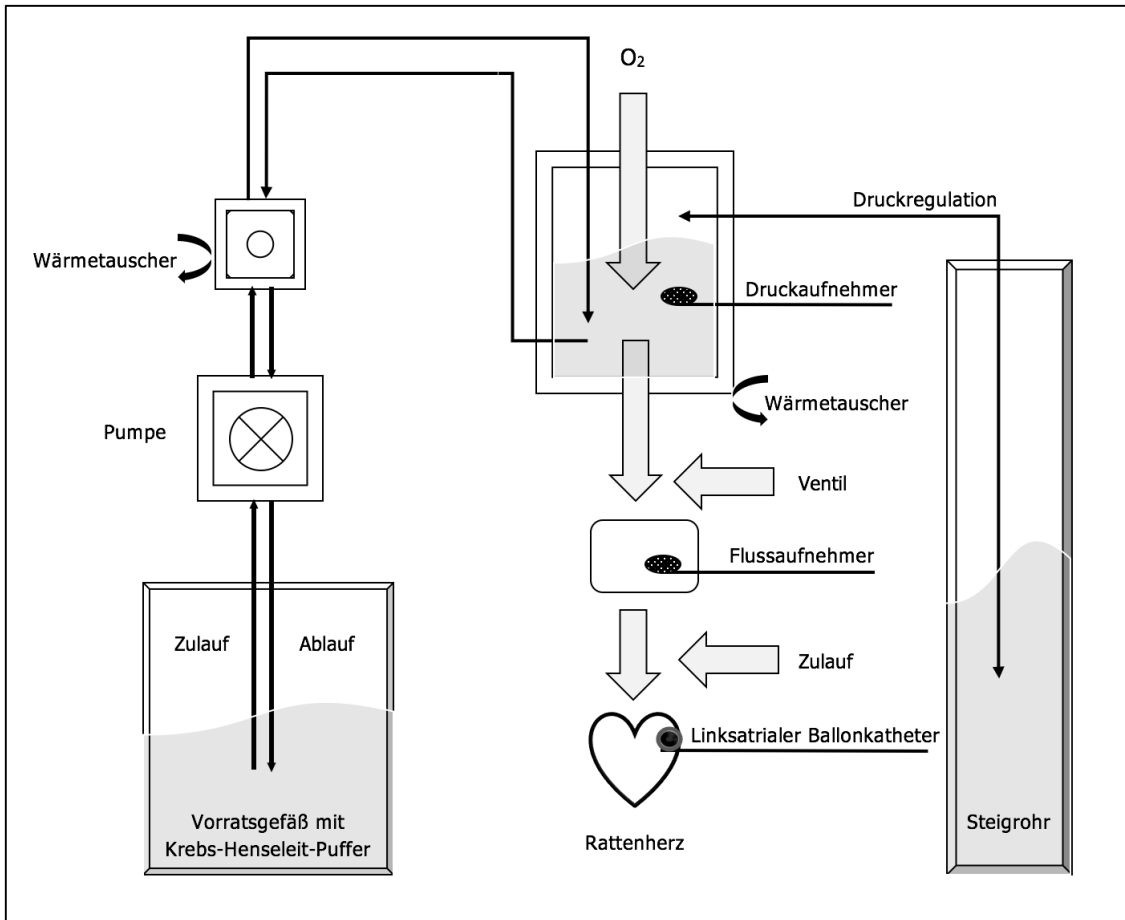


Abbildung 3: Aufbauskitze der Langendorffanlage

	Zeit	Aortendruck	LVEDP	LVP	LVdp/dt _{max}
Perfusion	5 min	73,6mmHg	73,6mmHg	Zu bestimmende Werte	
Ischämie	40 min	73,6mmHg	0 mmHg		
Reperfusion	30 min	73,6mmHg	73,6mmHg		

Tabelle 5: Messverlauf

2.6. Eluat-Bestimmung

Zur Bestimmung von Troponin T, CK, CK-MB sowie LDH und HFABP wurden während des Versuches 1 ml Perfusat nach Durchfluss durch das Herz entnommen und bei -80°C eingefroren. Dies geschah sowohl vor der Stabilisierungsphase (0-0), direkt nach der 5 min-Stabilisierungsphase (0) sowie

nach 15 min (15) und 30 min (30).

Im Perfusionseluat wurde das Heart Fatty Acid Binding Protein (HFABP) mit Hilfe eines rattenspezifischen Sandwich-ELISA Kit HK414 (Hycult Biotech, Uden, Niederlande) analog der Herstelleranleitung quantifiziert und bei 450 nm mit einem Tecan Spectra II Photometer gemessen. Die Berechnung erfolgte anhand einer Standardreihe. Ferner wurde der Proteingehalt im Eluat an Hand eines BCA Test bestimmt, um den HFABP-Gehalt auf den entsprechenden Proteingehalt normieren zu können. Diese Messungen fanden mit Ausnahme des HFABP im Zentrallabor der Universität Würzburg statt.

2.7. Isolation der Mitochondrien

Im Anschluss an die Reperfusion bereiteten wir das Herz histologisch auf, um getrennt nach subsarkolemmalen (SSM) und interfibrillären (IFM) Mitochondrien, eine Bewertung der Auswirkungen von Ischämie und Reperfusion vorzunehmen.

Nach Beendigung des Langendorff-Versuchs wurde die Perfusion gestoppt, der linksventrikuläre Ballon entfernt und das Herz von der Langendorffanlage diskonnektiert. Schrittmacher und Perfusionskanüle wurden entfernt und die Vorhöfe reseziert. Für die Mitochondrienisolation wurden ca. 580-610 mg des Kammermyokards verwendet. Die Herzspitze wurde bis zur Einbettung in Paraffin in Formalin verwahrt. Das restliche Gewebe wurde zerkleinert bei -80°C für die spätere Durchführung kolorimetrischer Tests eingefroren.

Nach einem modifizierten Protokoll von Palmer, Tandler et.al wurde die Mitochondrienisolation durchgeführt[17]. Hierfür wurde das Herzgewebe zuerst für 2 Sekunden mit einer kardioplegen Lösung bestehend aus 10 mM EDTA und 180 mM KCl umspült. Anschließend wurde es auf einer gekühlten Petrischale mit Schere und Pinzette zerkleinert. Das Gewebemogenat wurde mit 5 ml Puffer 1 in ein kleines Gefäß überführt und 2 min im IKA® T25 digital (IKA, Staufen, Deutschland) auf Stufe 8 weiterverarbeitet. Danach wurden jeweils schrittweise 2 ml des Gewebemogenates mit Hilfe eines Glaspotters

dispergiert und bei 500 *g* 10 min lang bei 4°C mittels Rotanta 46 R (Hettich, Tuttlingen, Deutschland) zentrifugiert. Der Überstand mit den SSM wurde bis zur Weiterverarbeitung auf Eis gelagert. Das Pellet wurde mit 10 mg Proteinase in 2 ml Puffer 1 gelöst und die Proteinasewirkung durch Zugabe von 12 ml Puffer 1 neutralisiert. Das Homogenat wurde im Potter dispergiert und bei 4600 *g*, 4°C 10 min zentrifugiert (Rotanta 46 R Zentrifuge). Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 20 ml Puffer 1 gelöst und erneut bei 500 *g* und 4°C für 10 min zentrifugiert. Der Überstand mit den enthaltenen IFMs sowie der Überstand mit den enthaltenen SSMs wurde dann bei 3000 *g* und 4°C für 10 min zentrifugiert. Der hieraus gewonnene Überstand, welcher der zytosolischen Fraktion der Mitochondrien entspricht, wurde anschließend eingefroren. Die Pellets mit SSM bzw. IFM wurden mittels 2 ml Puffer 2 gelöst und anschließend bei 3000 *g* und 4°C für 10 min zentrifugiert. Die Pellets wurden zweimal mit 2 ml Puffer 2 gewaschen und in 500 µl Gesamtvolumen aufgenommen. Über den gesamten Verarbeitungs- und Messprozess wurden Gewebe, Mitochondrien und Puffer stetig auf Eis gelagert.

2.8. Bestimmung der cytosolischen Mitochondrienfraktion

Der im Rahmen der Mitochondrienisolation gewonnene Überstand mit den darin befindlichen cytosolischen Mitochondrienfraktionen wurde bei -80°C eingefroren. Anschließend wurde analog der Eluat-Bestimmung der Gehalt an HFABP und Proteinen quantifiziert

2.9. Analyse des Proteingehaltes

Zur Quantifizierung der Menge an SSM und IFM Mitochondrien mittels Bichinonsäureassay wurde ein Pierce® BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, Waltham, USA) verwendet. Die Durchführung erfolgte entsprechend der Herstellerangaben. 25 µl Standard oder 25 µl Probe wurden mit 200 µl Arbeitsreagenz für 30 min bei 37°C inkubiert. Die Extinktion wurde bei $\lambda = 562$ nm mit einem Tecan Spectra II Photometer (Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim, Deutschland) gemessen. Anhand der BSA Standardreihe wurde die Proteinkonzentration ermittelt.

2.10. Messung der Atmungskettenaktivität mittels Polarographie

Um die Mitochondrienfunktion zu messen, wurde die Atmungskettenfunktion indirekt über die Messung des Sauerstoffverbrauchs mittels Polarographie analysiert. Die einzelnen Atmungskettenkomplexe wurden durch Applikation verschiedener Substrate, Inhibitoren und Entkoppler erfasst. Für diese Messungen wurde ein modifiziertes Protokoll nach Zini et. al. verwendet[125].

Mit der Oxytherm Elektrodeneinheit (Hansatech Instruments Ltd., Norfolk, UK) wurde der Sauerstoffverbrauch bei einer Temperatur von 25°C gemessen. Die Einheit misst die Konzentration des gelösten O₂ mittels einer S1/MINI Clark-type Elektrode innerhalb einer Reaktionskammer[126]. Die Elektrode besteht aus einer Platin-Kathode (Durchmesser 2mm) und einer Anode aus Silber. Beide sind in einer Epoxidharz-Scheibe eingeschlossen. Die Kathode liegt hierbei in einer zentralen Erhöhung, während die Anode in Form eines äußeren Rings eingebettet ist.

Die Elektrode wurde vor jedem Versuch mit einer O₂-permeablen Membran (Polytetrafluorethylen, PTFE) überzogen, die mittels eines Gummirings in Position gehalten wurden. Vor Auflegen der Membran wurde eine geringe Menge an Elektrolytlösung (KCl) auf die Kathode appliziert, damit beide Pole miteinander in Verbindung stehen. Während des Versuches stellte konstantes Rühren eine gleichbleibende Diffusion sicher.

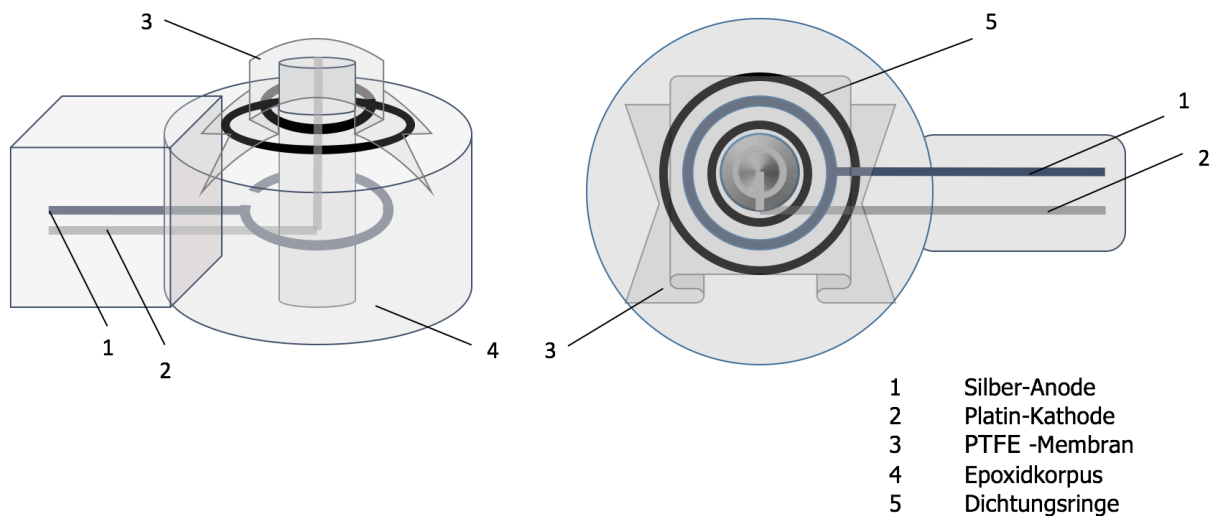


Abbildung 4: Clark-Type-Elektrode

Vor jedem Versuchstag wurde die Kammer mittels destilliertem H₂O gereinigt und die Elektrode neu bezogen und kalibriert. Die Kalibrierung fand gegen Raumluft und unter vollständigen O₂-Verbrauch nach Hinzugabe von Natriumdithionit statt. Bei 25°C und einer Rührer-Umdrehung von 75/min wurde eine Plateauphase des Signals abgewartet. Als akzeptabler Messrahmen wurde dabei eine Signalstärke von 1800-2000 mV definiert.

Nach Einschalten des Stroms begann sich das Platin negativ zu laden. Überschreitet die Spannung zwischen beiden Polen 700 mV, wurde an der Silber-Anode Silber oxidiert, an der Platinoberseite kam es zur Reduktion des Sauerstoffs. Der resultierende elektrische Strom ist proportional zur Anzahl der verfügbaren O₂-Moleküle, welche an der Elektrode reduziert wurden. Dieser Sauerstoffverbrauch, gemessen am Abfall des Elektrodenstroms, wurde mit einer zugehörigen Software ausgewertet. Die Messzeiten nach entsprechender Substratzugabe betrug eine Minute. Über die Steigungen der Kurve von O₂-Aufnahme pro Zeit (dO_2/dt) wurde die Raten von Z2 und Z3 errechnet. Dabei wurde die respiratory control ratio (RCR) als Verhältnis von Z3-/Z2-Atmung ausgedrückt.

Für die Messungen wurden 150 µg Mitochondrien in 400 µl Puffer 2 verwendet.

Komplex I-V: Nach Äquilibrierung der Suspension wurden 5 µl Pyruvat (1M) und 5 µl Malat (1M) hinzugegeben und die Z2-Atmung gemessen. An die weitere Zugabe von 5 µl ADP (0,2mM) schloss sich dann die Z3-Bestimmung an.

Komplex II-V: Mit der Zugabe von 0,2 mmol/l Rotenone wurde der Komplex I blockiert und nachfolgend die Atmungskette mit 1 mol/l Succinat energetisiert. Im Anschluss wurde die Z2- und nach Gabe von 0,2 mmol/l ADP die Z3-Atmung bestimmt.

Komplex III-V: Der Komplex I wurde zunächst mittels 5 µl Rotenone (0,2mmol/l) blockiert und dann mit 5 µl Succinat (1mol/l) energetisiert. Anschließend wurde Z2 gemessen. Mit 5 µl Malonat (1mol/l) wurde dann Komplex II gehemmt und nach Applikation von 10 µl Glycerol-3-Phosphat (G3P, 1 mol/l) die Aktivität von Komplex III-V ermittelt. Im Anschluss konnte nach Gabe von 0,2 mmol/l ADP die Z3-Atmung bestimmt werden.

Komplex II-IV: Z2 nach Rotenone und Succinat sowie Z3 nach ADP-Gabe wurden vergleichend zum Komplex III-V bestimmt. 5 µl Oligomycin (1 mmol/l) blockierte anschließend den Komplex, woraufhin die Atmung für 1 min aufgezeichnet und als Steigung detektiert wurde. Nachfolgend führte die Gabe von 5 µl 1 mM CCCP zu einer Entkopplung der Atmungskette, unter welcher der O₂-Verbrauch als Steigung II festgehalten wurde.

Komplex III-IV: Wiederum wurde der O₂-Verbrauch über 1 min aufgezeichnet, nachdem dem Mitochondrien-Puffer-Gemisch 5 µl Rotenone (0,2 mmol/l) sowie jeweils 5 µl Oligomycin (1 mmol/l) und 5 µl Succinat (1 mmol/l) zugefügt wurden. Die Steigung I ergab sich durch Aufzeichnung des O₂-Verbrauchs über 1 Minute nach Applikation von 5 µl CCCP (1 mmol/l) und 5 µl Malonat (1 mol/l). Die Steigung II wurde vergleichend nach Gabe von 5 µl Decylubiquinon (1 mol/l) bestimmt.

Komplex IV: Zur Suspension wurden 5 µl Rotenone (0,2 mmol/l), 5 µl Oligomycin (1 mmol/l) und 5 µl Succinat (1 mmol/l) hinzugefügt und der Sauerstoffverbrauch über 1 min aufgezeichnet. 5 µl CCCP (1 mmol/l) wurde hinzugefügt und der Komplex III durch 5 µl Antimycin (0,1 mmol/l) blockiert. Nach Zugabe von 5 µl Ascorbat (0,5 mol/l) und 5 µl TMPD (0,1 mol/l) wurde die Aktivität von Komplex IV anhand der gemessenen Steigung erfasst.

2.11. Spektrophotometrische Bestimmung der Atmungskettenenzyme

Ergänzend zur O₂-Messungen mittels Clark-Typ Elektrode wurde die Aktivität der Atmungskettenenzyme bestimmt.

Entsprechend eines modifizierten Protokolls nach Spinazzi wurden 30-50 mg gefrorenes Herzgewebe (-80°C) mittels Skalpell und Vortex zerkleinert[127]. Eisgekühlter Sucrose-Puffer (250mM, 0,121g Tris, 0,15g KCl, 0,038g EGTA, 0,854g Sucrose, pH 7,4) wurde im Verhältnis 1:20 zugefügt. Nach Homogenisierung mit einem Glas-Potter erfolgte die Zentrifugation bei 600g und 4°C für 10min. Der Proteingehalt des Überstands wurde mit Hilfe eines BCA-Assays (Thermo Scientific, Waltham, USA) quantifiziert. Die optimale Proteinkonzentration wurde in Vorversuchen für jeden einzelnen Atmungskettenkomplex ermittelt. Quantifiziert wurden die Atmungskettenkomplexe I, II, IV sowie I+III und II+III und die Citratsynthase aus den Homogenatüberständen mit einem Spektrophotometer (Ultrospect 3000 Spektrometer, GE Healthcare München, Deutschland) bei 37°C. Die Spezifität der einzelnen Atmungskettenaktivitäten wurde durch den Einsatz spezifischer Inhibitoren überprüft.

Berechnet wurden die Aktivitäten nach der Formel:

$$\frac{\frac{\Delta Absorption}{\min \times 1000}}{\left((Extinktionskoeffizient \times Probevolumen) \times \text{eingesetzte Probenmenge} \frac{mg}{ml} \right)}$$

Die gemessene Enzymaktivität wird in nmol / (min x mg) angegeben.

Komplex	Messung aktiviert durch	Messung bei (nm)	Probeninhalt	blockiert durch
I	6 µl Ubiquinone (10 nM)	B: 340 nm/2 min M: 340 nm/2 min	1) 40 µg H, 700 µl dest. H ₂ O, 100 µl KP-Puffer, 60 µl BSA, 30 µl KCN (10 mM), 10 µl NADH (10 mM), aufgefüllt auf 994 µl 2) siehe 1) + 10 µl Rotenone (1 mM)	Rotenone
II	4 µl DUB (Decylubiquinone, 12,5 nM)	B: 600 nm/2 min M: 600 nm/3 min	10 µg H, 600 µl dest. H ₂ O, 50 µl KP-Puffer, 20 µl BSA, 30 µl KCN (10 mM), 50 µl Succinat (400 mM), 145 µl DCPIP (0,015% (wt/vol)), aufgefüllt auf 996 µl + 10 min Inkubation	TTFA
IV	5 µg H	B: 550 nm/2 min M: 550 nm/3 min	400 µl dest. H ₂ O, 500 µl KP-Puffer, 60 µl reduz.Cytochrom c (1 mM)	KCN
I+III	20 µl NADH (10 mM)	B: 550 nm/2 min M: 550 nm/2 min	1) 2 min Inkubation von 25 µg H in 700 µl dest. H ₂ O, dann 100 µl KP-Puffer, 20 µl BSA, 30 µl KCN (10 mM), 50 µl oxidiertes Cytochrom c (1 mM) Auffüllen auf 980 µl 2) Siehe 1) + 10 µl Rotenone (1 mM)	I durch Rotenone
II + III	50 µl oxidiertes Cytochrom c (1 mM)	M: 550 nm/3 min	800 µl des.H ₂ O, 40 µl KP-Puffer, 30 µl KCN (10 mM), 25 µl Succinat (400 mM), 10 µg H – Auffüllen auf 950 µl + 10 min Inkubation bei 37°C	
Citrat-synthase	50 µl Oxalacetatsäure (10 nM)	B: 412 nm/2 min M: 412 nm/3 min	300 µl dest.H ₂ O, 500 µl T-Puffer, 100 µl DTNB, 30 µl Ac CoA (10 mM), 5 µg H. Auffüllen auf 950 µl	

Tabelle 6: Spektrophotometrische Komplex-Bestimmung

Anmerkung: B (Baseline), M (Messung)

2.12. Bestimmung der Ca²⁺-induzierten Mitochondrienschwellung

Diese erfolgte analog eines modifizierten Modells von Halestrap und Davidson[129]. Die in der Inneren Mitochondrienmembran lokalisierte „mitochondrial permeability transition pore“ (mPTP) öffnet sich nach Provokation mit hohen Ca²⁺-Konzentrationen. Es erfolgt ein Zytosoleinstrom in die Mitochondrienmatrix mit nachfolgender Schwellung der Mitochondrien. Für dieses Experiment wurden Mitochondrien verwendet, welche mit 150 µg Succinat energetisiert und in 200 µl Puffer 5 suspendiert waren. Die Blockade des Komplex I der Atmungskette erfolgte mit 3 mmol/l Rotenone. Die

Schwellung wurde mit 50 mmol/l Ca^{2+} induziert und die Absorptionsabnahme bei 540 nm im Ultrospect 3000 Photometer bei 25°C gemessen. Durch die Zugabe von Pyruvat wurde die Ca^{2+} -induzierte mPTP-Öffnung gehemmt.

2.13. Statistik

Ungepaarte Daten wurden Zwecks Varianzanalyse einem nicht-parametrischen Kruskal-Wallis-Test unterzogen. Sofern statistisch signifikant, wurde dieser mit einem Dunn's Multiple Comparisons Test kombiniert. Dies geschah um intervallskalierte Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen zu überprüfen. Ein parametrischer Repeated Measures Anova Test fand hierbei ebenso Anwendung wie der Tukey's Multiple Comparisons Test.

Gepaarte Daten wurden mittels nicht-parametrischen Friedman-Test auf Varianz geprüft. Als statistisch signifikant wurden p-Werte $< 0,05$ angesehen. Die Fläche unter der Kurve („Area under the curve“ - AUC) wurde von uns berechnet, um Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen aufzuzeigen. Sofern nicht anderweitig gekennzeichnet, sind alle Ergebnisse als Durchschnittswerte mit Standardabweichung („Standard Deviation“ - SD) zu verstehen.

3. Ergebnisse

3.1. Perfusions- und Druckveränderungen unter IR und Enoximon

Der systolische linksventrikuläre Druck (LVP_{sys}) ist in IR40/30 bis zum Messpunkt 25 gegenüber der Kontrollgruppe verringert ($p < 0,01$). Im Verlauf der Messungen kommt es in IR40/30 zu einer Angleichung des LVP_{sys} an die Werte der Kontrollgruppe. Zwischen Enox-IR0/30 und der Kontrollgruppe zeigen sich keine Unterschiede. Auch zwischen IR40/30 und Enox-IR40/30 ergibt sich keine Differenz.

$LVdp/dt_{max}$ ist im Vergleich zur Kontrolle in IR40/30 bis zum Messpunkt 25 erniedrigt ($p < 0,004$). In Enox-IR0/30 ist zu den Messpunkten 10 ($p = 0,02$), 15 ($p = 0,01$) und 20 ($p = 0,01$) eine stärkere Kontraktilität als in der Kontrollgruppe nachweisbar. $LVdp/dt_{max}$ weist keinen Unterschied zwischen den Gruppen IR40/30 und Enox-IR40/30 auf.

Der Koronarfluss ist in IR40/30 gegenüber der Kontrolle über die ersten 5 Minuten der Reperfusion reduziert ($p = 0,01-0,04$). Zu späteren Messzeitpunkten gibt es keine Unterschiede zwischen IR0/30 und IR40/30.

Weder zwischen IR0/30 und Enox-IR0/30 noch zwischen Enox-IR40/30 und IR40/30 finden sich Unterschiede.

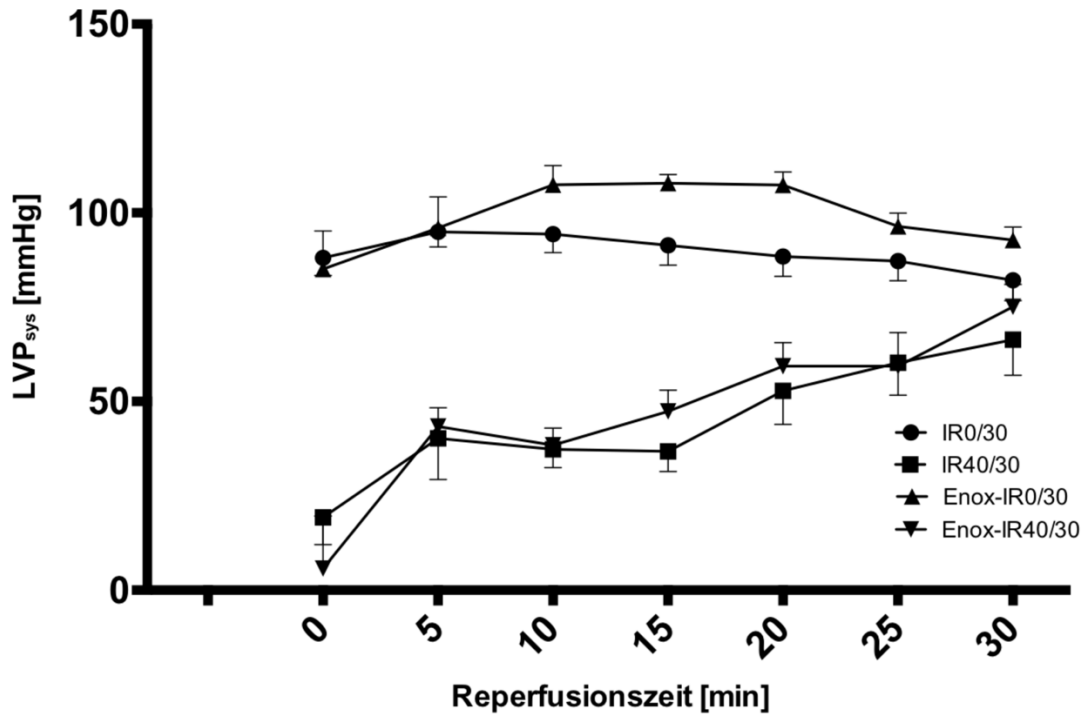


Abbildung 5: LVP_{sys} (mmHg) im Reperfuersverlauf in IR40/30 zur Kontrolle verringert ($p < 0,01$).

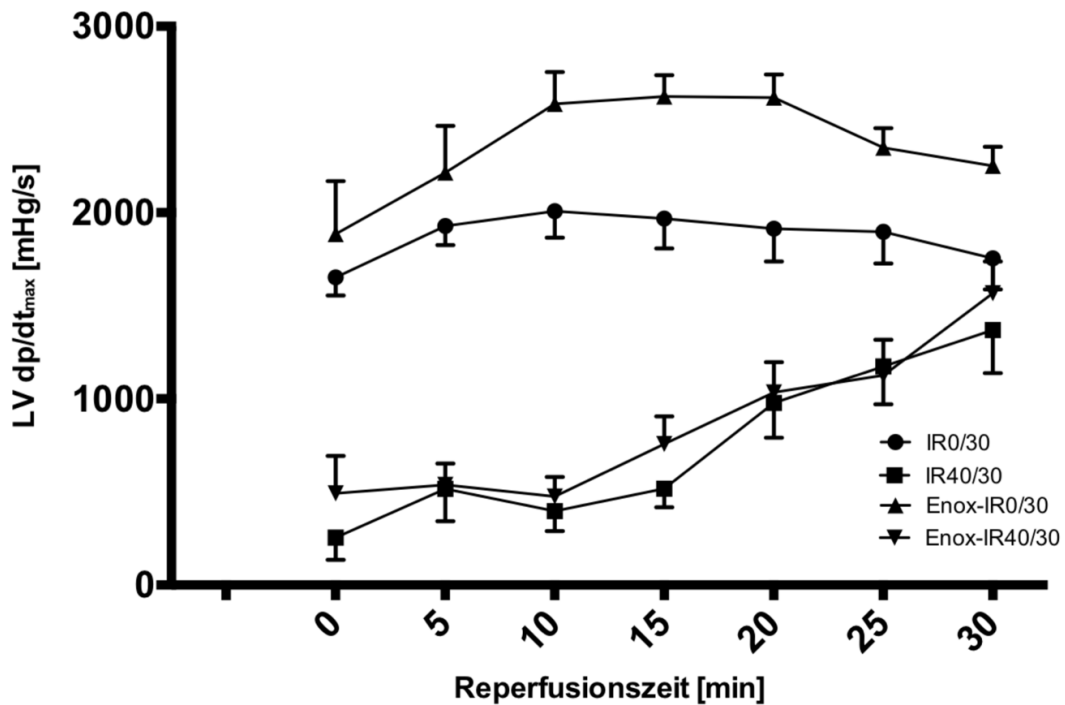


Abbildung 6: LV dp/dt_{max} (mHg/s) im Reperfuersverlauf; in IR40/30 zur Kontrolle verringert ($p < 0,004$); in Enox-IR0/30 zur Kontrolle gesteigert ($p = 0,02-0,01$)

3.2. Labormedizinische Diagnostik

Die im Rahmen der Herzenzym- und Biomarkerbestimmung gemessenen Werte finden sich in Tabelle 7. Für Troponin T kommt es über den Messverlauf zu einer Konzentrationszunahme im Eluat. Unterschiede zwischen IR0/30 und IR40/30 lassen sich hierbei jedoch nicht erkennen. In Enox-IR0/30 findet sich im Eluat gegenüber der Kontrollgruppe weniger Troponin T. Die Werte für Enox-IR40/30 und IR40/30 unterscheiden sich nicht.

Der Gehalt an GOT im Eluat fällt sowohl in IR0/30 als auch in IR40/30 nach Messbeginn ab. Dabei zeigt sich in IR40/30 zu den Messpunkten 15 und 30 eine höhere myokardiale GOT-Freisetzung.

Zwischen Enox-IR0/30 und der Kontrolle sowie zwischen Enox-IR40/30 und IR40/30 ergeben sich keine Unterschiede.

Die CK-MB Konzentration im Eluat ist in allen Gruppen zu Messbeginn am höchsten. Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen ergeben sich nicht.

Die LDH-Konzentration nimmt ebenfalls zeitabhängig ab. Auch hier ergeben sich zwischen den Gruppen keine Unterschiede. Die Freisetzung von myokardialem hFABP in das Eluat ($\frac{\text{Gewebe/Eluat hFABP}}{\text{Gewebe/Eluat Gesamtprotein}}$) ist in IR40/30 nach 30 min gegenüber der Kontrolle erhöht. Enox-IR0/30 und die Kontrollgruppe unterscheiden sich hinsichtlich des hFABP_{Eluat} nicht. Für Enox-IR40/30 findet sich nach 30 min gegenüber IR40/30 niedrigere Werte an hFABP_{Eluat}.

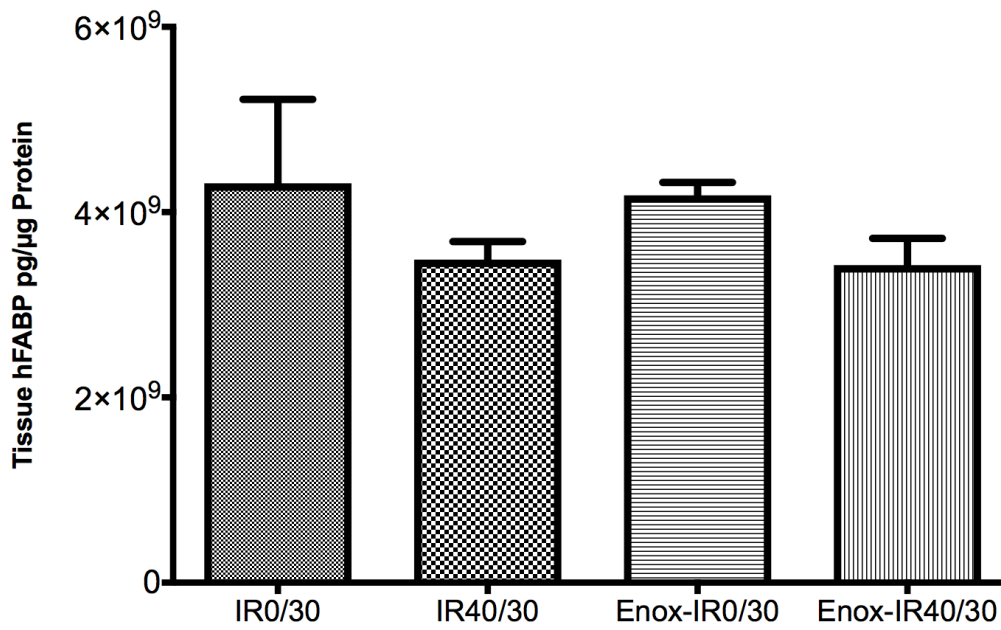


Abbildung 7: hFABP-Freisetzung bei Versuchsbeginn; keine Unterschiede zwischen den Gruppen

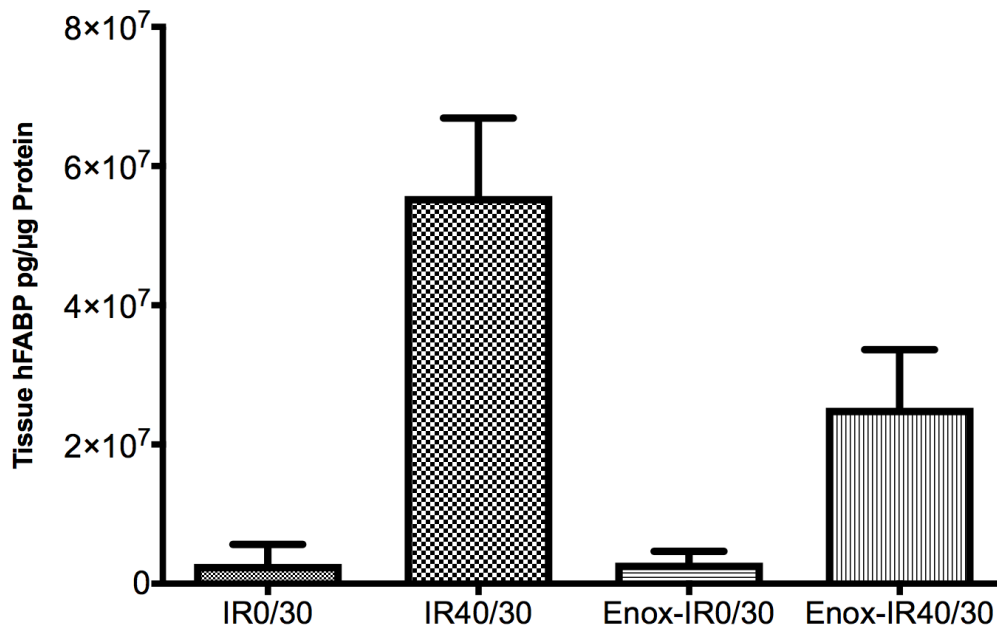


Abbildung 8: hFABP-Freisetzung nach 30min Reperfusion; in IR40/30 zur Kontrolle erhöht; in Enox-IR40/30 zu IR40/30 reduziert.

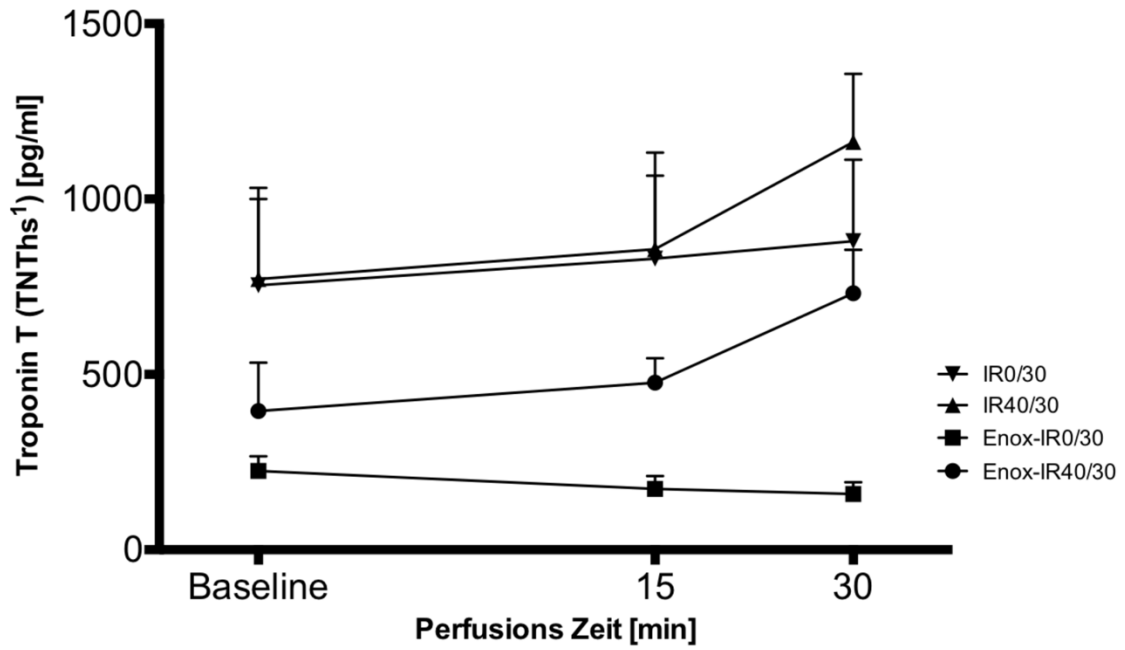


Abbildung 9: Troponin T Konzentration im Perfusionsverlauf; in Enox-IR0/30 zur Kontrolle erniedrigt ($p=0,1-0,2$).¹
Troponin T high sensitiv

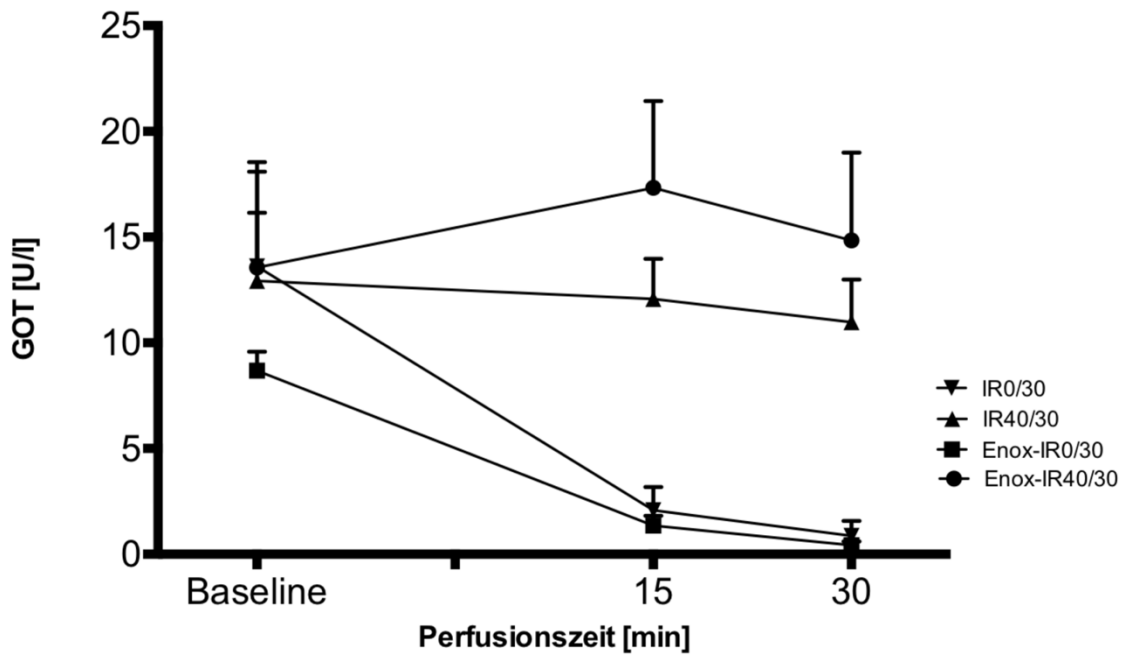


Abbildung 10: GOT Konzentration im Perfusionsverlauf; in IR40/30 zur Kontrolle erhöht ($p=0,02$).

	Zeitpunkt (min)	IR0/30 (n=6)	IR40/30 (n=9)	Enox-IR0/30 (n=8)	Enox-IR40/30 (n= 8)	Signifikanz
TropT	0	754,2 ± 603,6	772,1 ± 780,1	224,7 ± 118,4	395,4 ± 389,9	
[pg/ml]	15	830,2 ± 579,7	857,0 ± 825,8	173,4 ± 104,1	476,4 ± 196,3	p**=0,02
	30	879,8 ± 569,2	1162,4 ± 583,8	159,4 ± 94,9	731,6 ± 351,9	p**=0,01
CK-MB	0	27,1 ± 23,1	38,4 ± 11,0	20,6 ± 7,8 #	35,7 ± 29,8	
[U/l]	15	5,2 ± 5,7	19,2 ± 9,4	2,7 ± 2,6 #	32,4 ± 23,1	
	30	3,0 ± 4,1	17,6 ± 8,6	1,1 ± 0,9 #	26,4 ± 23,1	
LDH	0	45,2 ± 38,8	38,7 ± 17,3	29,5 ± 10,1	47,0 ± 46,6	
[U/l]	15	5,3 ± 7,3	19,7 ± 13,3	1,6 ± 2,4	39,9 ± 34,4	
	30	2,3 ± 3,4	17,7 ± 13,1	0,1 ± 0,4	33,8 ± 35,0	
GOT	0	13,6 ± 12,1	12,9 ± 9,1 [§]	8,7 ± 2,5	13,6 ± 12,8	
[U/l]	15	2,1 ± 2,7	12,1 ± 5,4 [§]	1,4 ± 1,3	17,3 ± 11,6	p*=0,02
	30	0,9 ± 1,7	11,0 ± 5,7 [§]	0,4 ± 0,5	14,9 ± 11,7	p*=0,02

Tabelle 7: Ergebnisse der Enzym- und Markermessung

Anmerkung: *IR0/30 vs. IR40/30, **IR0/30 vs. Enox-IR0/30, ***IR40/30 vs. Enox-IR40/30, [§] n=8, # n=6

3.3. Einfluss des IR auf die Ca²⁺-Empfindlichkeit der mPTP

Die induzierte Schwellung myokardialer Mitochondrien reflektiert die mPTP-Öffnung auf Ca²⁺-Stimuli. Das Ansprechverhalten der mPTP differiert zwischen den Versuchsgruppen und ist in Abb.11-14 abgebildet.

IFM

Im Vergleich zur Kontrolle kommt es in IR40/30 zu einer verstärkten Schwellung der IFM auf Ca²⁺-Stimulation ($p=0,01$).

In Enox-IR0/30 findet sich im Vergleich zur Kontrolle keine Veränderung.

Ferner besteht kein Unterschied zwischen IR40/30 und Enox-40/30.

Unter Einfluss von Pyruvat, als Inhibitor der mPTP-Öffnung, finden sich in IR40/30 gegenüber der Kontrolle ab Minute 19 erhöhte Schwellungswerte ($p<0,05$).

Zwischen Enox-IR0/30 und IR0/30 sowie zwischen Enox-40/30 und IR40/30 ergeben sich unter Pyruvat keine Unterschiede.

SSM

Ähnliche Ergebnisse zeigen die SSM. So findet sich in IR40/30 im Vergleich zur Kontrolle eine erhöhte mPTP-Empfindlichkeit bei Gabe von Ca²⁺ ($p<0,0001$). Ebenfalls ergeben sich zwischen Enox-IR0/30 und der Kontrolle keine Unterschiede. In Enox-40/30 kommt es jedoch ab Minute 28 zu erhöhten Schwellungswerten ($p=0,05$) gegenüber IR40/30.

Unter Pyruvat lässt sich in IR40/30 im Vergleich zur Kontrolle eine verstärkte Mitochondrienschwellung beobachten ($p=0,0006$).

In Enox-IR0/30 kommt es gegenüber der Kontrolle ab 23,5 min zu erhöhten Schwellungswerten unter Pyruvat ($p=0,04-0,01$).

Zwischen Enox-IR40/30 und IR40/30 ergeben sich keine signifikanten Unterschiede.

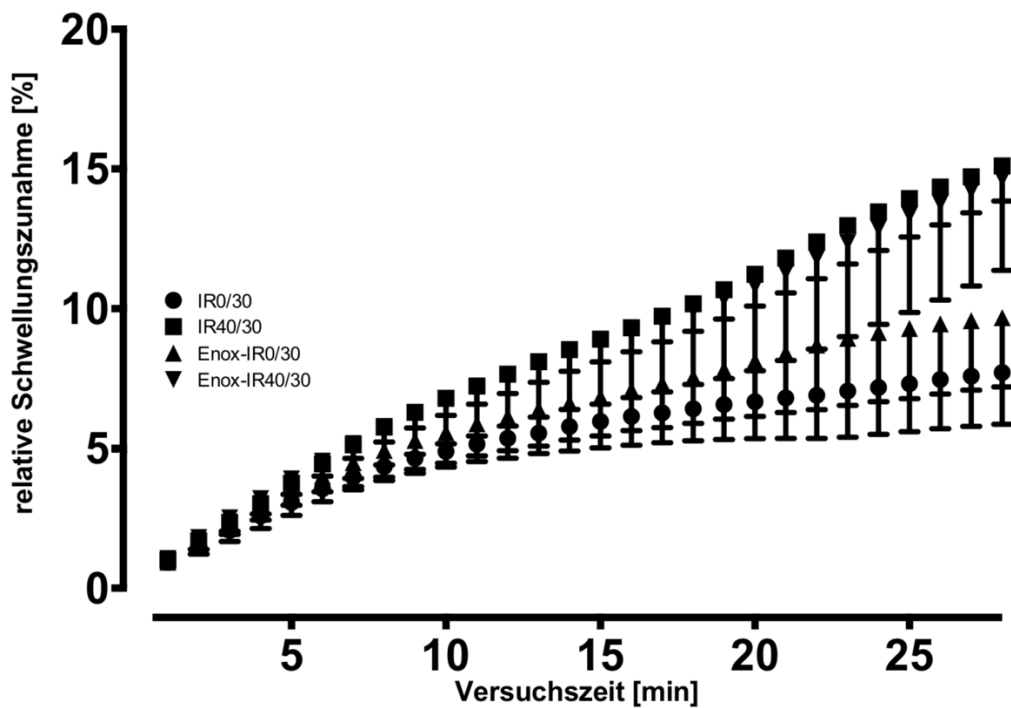


Abbildung 11: Schwellung der IFM unter $50 \mu\text{M}$ Ca^{2+} ohne Pyruvat; in IR40/30 gegenüber Kontrolle erhöht ($p=0,01$).

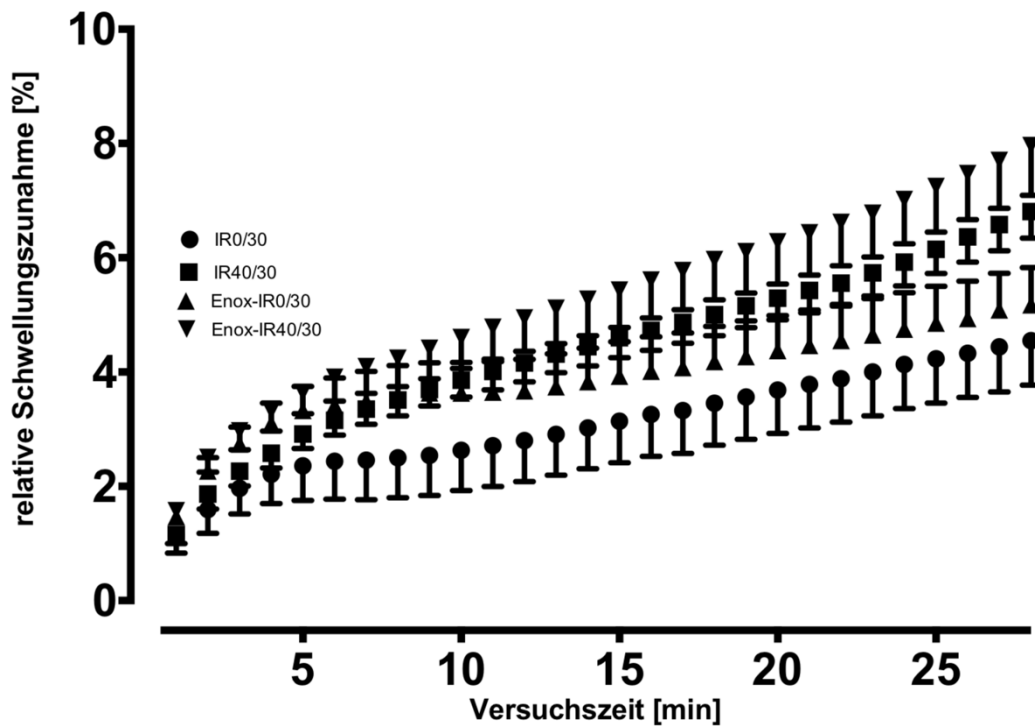


Abbildung 12: Schwellung der IFM unter $50 \mu\text{M}$ Ca^{2+} und Pyruvat; IR40/30 gegenüber Kontrolle ab Minute 19 erhöht ($p<0,05$).

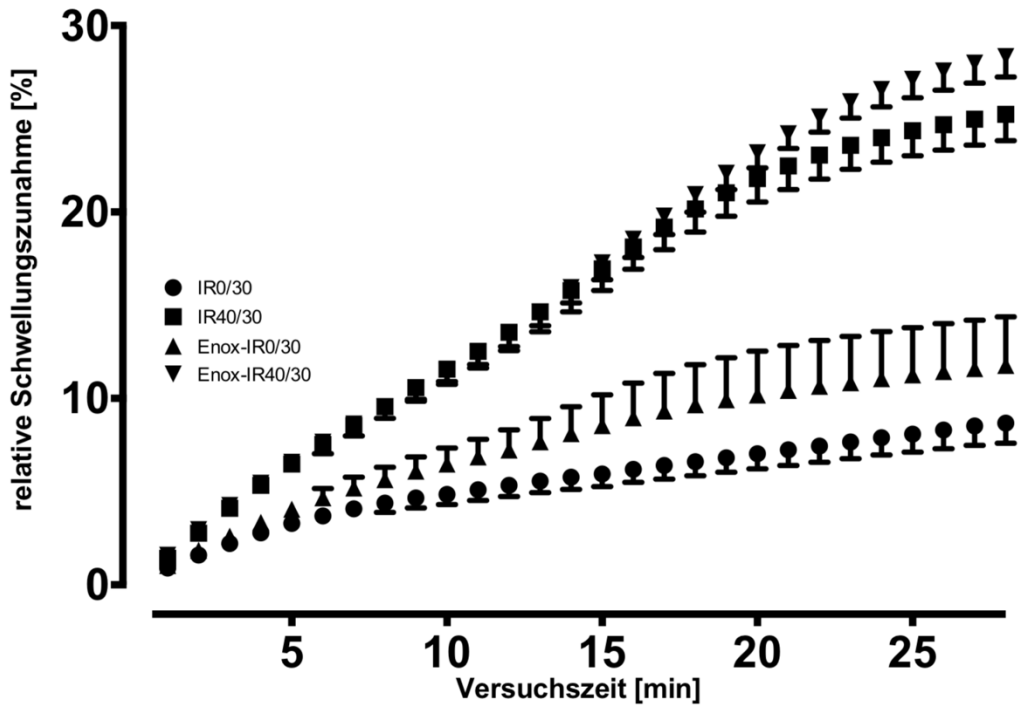


Abbildung 13: Schwellung der SSM unter $50 \mu\text{M Ca}^{2+}$ ohne Pyruvat; in IR40/30 zur Kontrolle erhöht ($p < 0,0001$); in Enox-40/30 zu IR40/30 ab Minute 28 erhöht ($p = 0,05$).

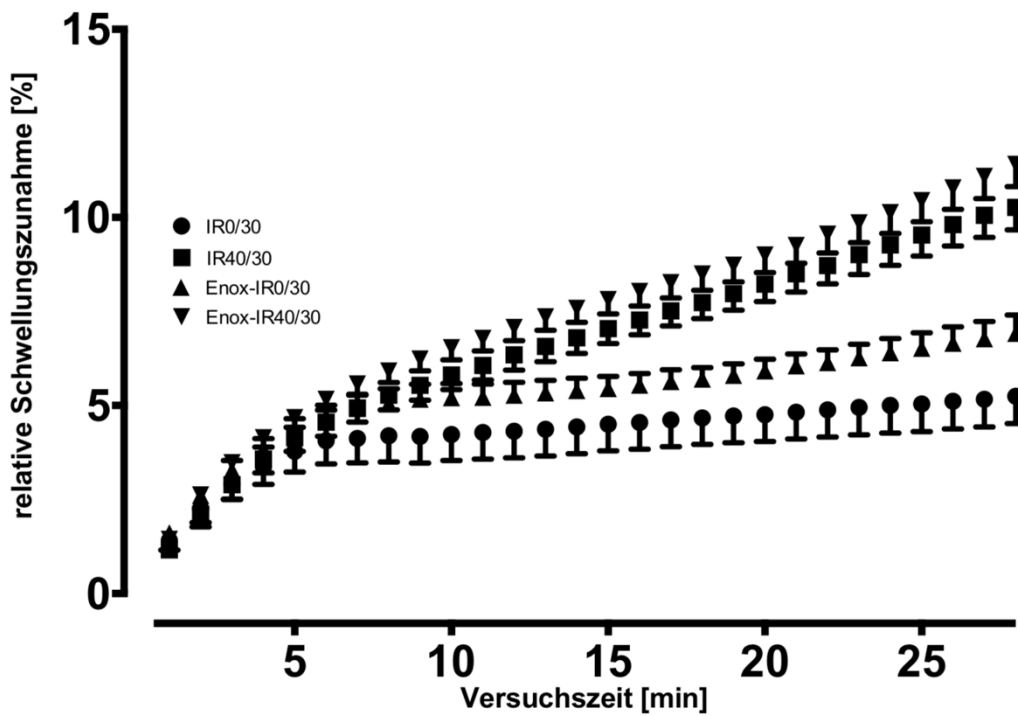


Abbildung 14: Schwellung der SSM unter $50 \mu\text{M Ca}^{2+}$ und Pyruvat; in IR40/30 zur Kontrolle verstärkt ($p = 0,0006$), In Enox-IR0/30 zur Kontrolle ab 23,5 min erhöht ($p = 0,04-0,01$).

3.4. Aktivität der Atmungskettenkomplexe

IFM

Zwischen IR0/30 und IR40/30 ergeben sich in den Komplexen I-V keine Unterschiede. In IR40/30 ist jedoch die Aktivitäten der Komplexe II-V im Respirationsstatus 2 und 3 gegenüber der Kontrollgruppe reduziert ($p < 0,0001$). Auch in den Komplexen II-IV ist die Aktivität in IR40/30 nach Gabe von Oligomycin und CCCP verringert ($p < 0,0001$). Ebenfalls ist die Aktivität der Komplexe III-V in

IR-40/30 gegenüber IR0/30 erniedrigt ($p = 0,004$). Für die Komplexe III-IV lassen sich keine Unterschiede feststellen. Komplex IV ist in IR-40/30 deutlich inhibiert ($p < 0,0001$). Nach Applikation von Cyt c, zur Bewertung der Strukturstabilität der äußeren Mitochondrienmembran, steigt die Komplexaktivität in beiden Gruppen. Dabei ist die Komplexaktivität in IR40/30 deutlich geringer als in der Kontrollgruppe ($p = 0,003$). Das Verhältnis

$\frac{\text{Cyt c} + \text{Komplex IV-Aktivität}}{\text{Komplex IV-Aktivität}}$ differiert zwischen den Gruppen nicht.

In Enox-IR0/30 kann gegenüber der Kontrolle eine erhöhte Aktivität der Komplexe I-V im Respirationsstatus 3 beobachtet werden ($p = 0,01$). Unter Enoximon ist im Respirationsstatus 2 die Komplexaktivität II-V reduziert ($p = 0,04$). Für die Komplexe II-IV ergeben sich zwischen Enox-IR0/30 und der Kontrolle keine Unterschiede. Die Aktivität der Komplexe III-V ist in Enox-IR0/30 reduziert ($p = 0,009$). Bezüglich der Komplexe III-IV sowie des Komplex IV unterscheiden sich die Gruppen nicht. Nach Applikation von Cyt c kommt es ohne signifikante Unterschiede zu einem Anstieg der Komplexaktivität in beiden Gruppen. Das Verhältnis $\frac{\text{Cyt c} + \text{Komplex IV-Aktivität}}{\text{Komplex IV-Aktivität}}$ variiert zwischen beiden Gruppen nicht.

Enox-IR40/30 weist gegenüber IR40 eine gesteigerte Aktivität der Komplexe I-V ($p = 0,01$) und II-V ($p = 0,04$) im Respirationsstatus 3 auf. In den Komplexen II-IV ist nach Gabe von Oligomycin ($p = 0,02$) und CCCP ($p = 0,0002$) eine höhere

Aktivität in Enox-IR40/30 zu finden. Für die Komplexaktivität III-V sowie III-IV ergeben sich zwischen Enox-IR40/30 und IR40/30 keine Unterschiede. Die Aktivität des Komplex IV ist unter Enoximon gesteigert ($p=0,02$). Nach Gabe von Cyt c steigt die Komplexaktivität in Enox-IR40/30 stärker an als in IR40/30 ($p=0,01$). Das Verhältnis $\frac{\text{Cyt c} + \text{Komplex IV-Aktivität}}{\text{Komplex IV-Aktivität}}$ differiert zwischen den Gruppen nicht.

SSM

Zwischen IR0/30 und IR40/30 ergeben sich für die Komplexaktivität I-V keine Unterschiede. Unter Ischämie kommt es jedoch nach Gabe von CCCP zu einem Aktivitätsverlust in den Komplexen II-V ($p=0,003$) und II-IV ($p=0,003$). In den Komplexen III-V und III-IV sind zwischen IR0/30 und IR40/30 keine Unterschiede erkennbar. Die Aktivität des Komplex IV ist unter Ischämie reduziert ($p=0,05$). Nach Applikation von Cyt c nimmt die Komplexaktivität ohne Unterschiede zwischen beiden Gruppen zu. Auch das Verhältnis $\frac{\text{Cyt c} + \text{Komplex IV-Aktivität}}{\text{Komplex IV-Aktivität}}$ differiert dabei nicht.

Zwischen Enox-IR0/30 und der Kontrollgruppe ergeben sich für die SSM keine Unterschiede in der Komplexaktivität. Auch zwischen IR40/30 und Enox-IR40/30 differieren die Komplexe in ihrer Aktivität nicht.

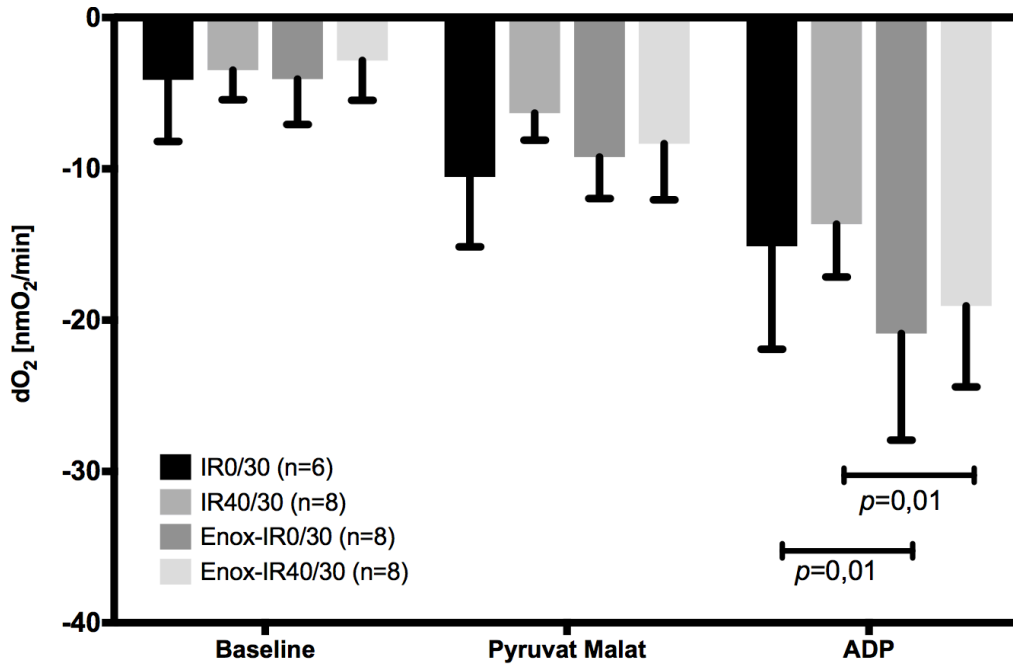


Abbildung 15: O₂-Verbrauch der IFM im Komplex I-V; In Enox-IR0/30 gegenüber Kontrolle im Respirationsstatus 3 erhöht ($p=0,01$). In Enox-IR40/30 gegenüber IR40/30 erhöht ($p=0,01$).

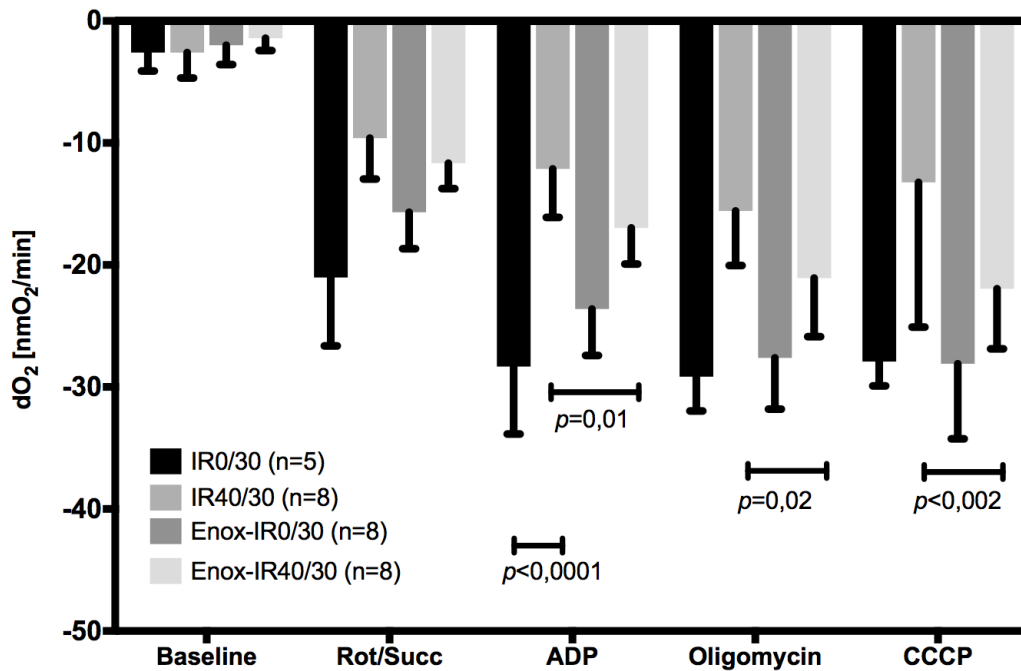


Abbildung 16: O₂-Verbrauch der IFM im Komplex II-IV/V; IR40/30 gegenüber Kontrolle im Respirationsstatus 2 und 3 reduziert ($p<0,0001$). In Enox-IR40/30 gegenüber IR40/30 nach Gabe von ADP ($p=0,01$), Oligomycin ($p=0,02$) und CCCP ($p=0,002$) erhöht.

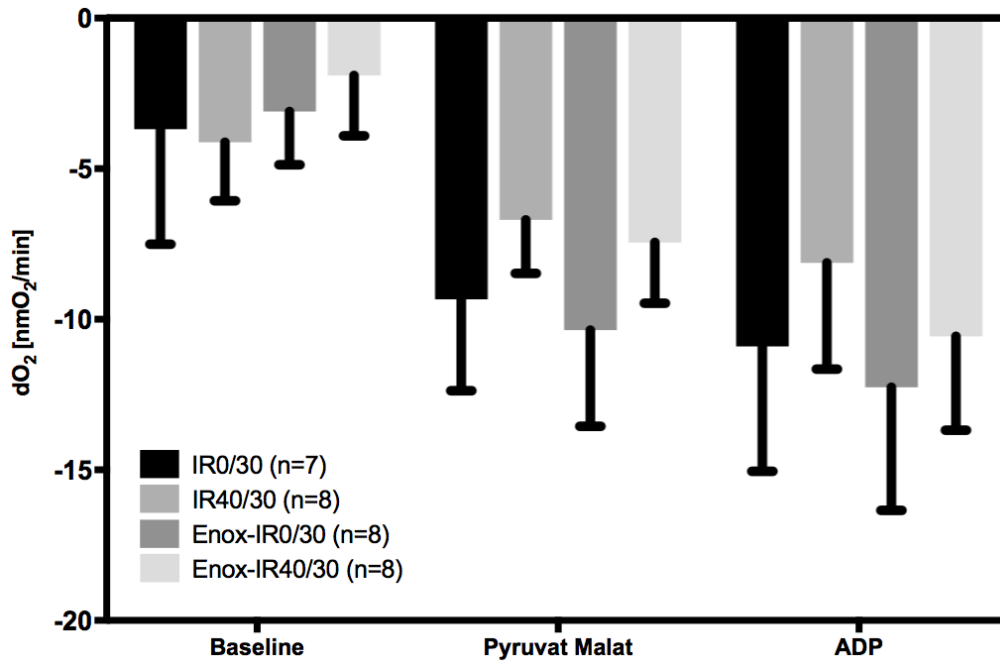


Abbildung 17: O₂-Verbrauch der SSM im Komplex I-V; keine signifikanten Unterschiede.

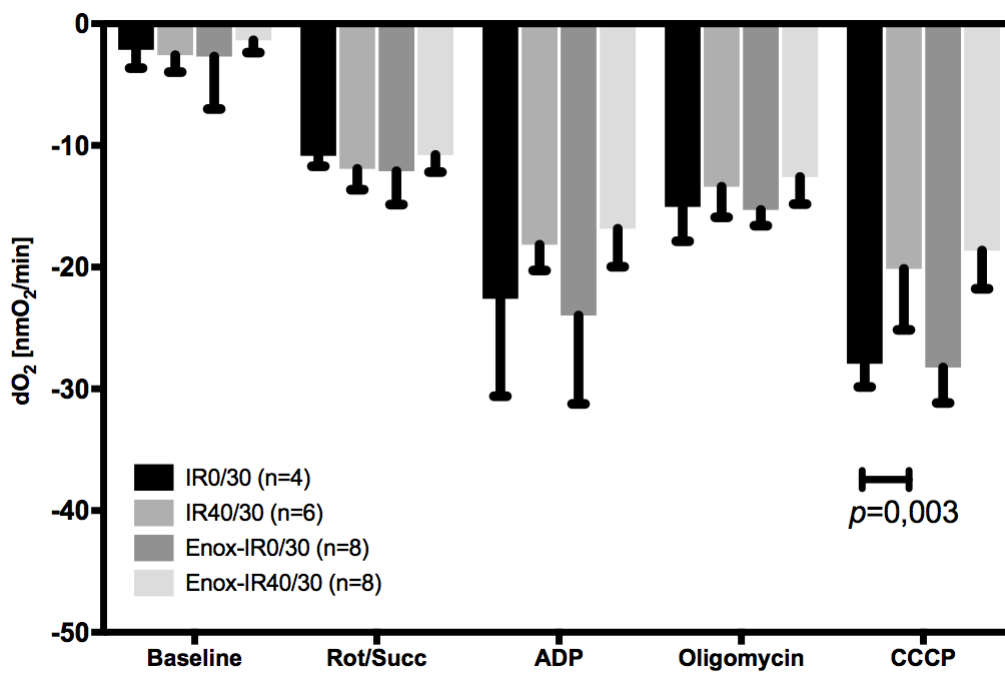


Abbildung 18: O₂-Verbrauch der SSM im Komplex II-IV-V; In IR40/30 gegenüber Kontrolle nach Gabe von CCCP verringert ($p=0,003$).

4. Diskussion

Ischämie und Reperfusion verringern die mitochondriale Funktion[131]. Es kommt zu Veränderungen des $\Delta\Psi_m$, der Komplexaktivität der Atmungskette, der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration sowie der mPTP-Stabilität. Unter diesen Bedingungen führt Enoximon als PDE_3 -Inhibitor klinisch zu einer Verbesserung der myokardialen Funktion[122, 132]. Unser Labor zeigte unter 15-minütiger Ischämie einen Zusammenhang mit der Mitochondrienfunktion auf. Ob dies auch unter prolongierter Ischämie zu beobachten ist, steht im Fokus dieser Arbeit. Über einen LVEDP von 18 mmHg simulierten wir eine linksventrikuläre Drucküberlastung in der Langendorff-Untersuchung.

Die dabei von uns erhobenen Daten bestätigen den Ischämie-bedingten Abfall des LVP_{sys} . Ebenfalls beobachteten wir eine Reduktion des Koronarflusses sowie einen Kontraktilitätsverlust. Die Gabe von Enoximon im Zuge der Reperfusion führte nach 15-minütiger Ischämie zu einer diskreten Steigerung der systolischen Herzfunktion. Auch für eine 20-minütige Ischämiedauer konnten Sunderdiek et al. für Enoximon eine Verbesserung der Herzleistung aufzeigen [133]. Nach 40-minütiger Ischämie konnten wir für Enoximon jedoch keinen relevanten hämodynamischen Effekt mehr nachweisen, was wir auf einen erheblichen tiefen myokardialen Schaden durch prolongierte warme Ischämie zurückführen. Für natives Myokard hingegen ließ sich im Sinne einer Kontraktilitätssteigerung ein Effekt von Enoximon ermitteln. Der abnehmende Einfluss von Enoximon unter fortgesetzter Ischämie erklärt sich durch die fortgeschrittenen zellulären Schäden im Zuge der längeren Ischämie. So zeigten Fert-Bober et al., dass die Fähigkeit des Myokards zu Regeneration mit der Dauer der Ischämie abnimmt. War die Reduktion der Herzfunktion nach 15 min nur gering, so zeigte sich diese nach 20-minütiger Ischämie deutlich ausgeprägt[134]. Für Ischämiezeiten >30 min wiesen Galinanes et al. in Rattenherzen irreversible Funktionsverluste nach[135]. Auch Palmer et al. postulierten, dass es unter Ischämiezeiten von <20 min zu nur geringen, für Ischämiezeiten >25 min jedoch starken Funktionsbeeinträchtigungen käme.

Ferner beschrieben sie nach 30 min Ischämie ödematöse Schwellungen der Mitochondrien, was auf eine Öffnung der mPTP schließen und einen nahenden Zelltod annehmen lässt[136]. Demnach scheint in unserem Versuchsaufbau der IR-bedingte myokardiale Funktionsverlust nach 40 min zu weit fortgeschritten sein, um unter Enoximon eine erkennbare Stabilisierung der Herzleistung zu zeigen.

Im Rahmen der Myokardschäden ist eine Expression kardialer Marker zu erwarten. Deren Anstieg, insbesondere eine Erhöhung des Troponins T, sind im klinischen Umfeld mit einer erhöhten Letalität von AHI-Patienten verknüpft. In unseren vorherigen Versuchen zur 15-minütigen Ischämie waren Troponin T, CK-MB und LDH signifikant erhöht. Ferner beschrieben Palmer et al. ab einer Ischämiedauer über 20min den Übergang von reversiblen zu irreversiblen Schäden der Kardiomyozyten mit Anstieg der Kreatinkinase[136]. Dem entgegen fanden sich in der vorliegenden Arbeit nach 40-minütiger Ischämie nur eine Erhöhung des hFABP und der GOT. Gleichzeitig sinken, mit Ausnahme von Troponin T, die Marker-Konzentrationen über den Messverlauf. Dies legt die Vermutung nahe, dass zum Zeitpunkt unserer Messungen, die Ischämiebedingte Markerexpression auf Grund der längeren Ischämiedauer bereits erschöpft und weitestgehend wieder auf insignifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe abgesunken sind. Dies widerspricht allerdings der klinischen Verwendung der Marker zur Ischämiediagnostik sowie den Messungen von Remppis et al., die unter 60-minütiger Ischämie für Troponin T, CK und LDH eine erhöhte postischämische Freisetzung beobachteten[137]. Ebenfalls konnten Povlsen et al. sowie Amani et al. für prolongierte Ischämiezeiten einen Anstieg von LDH und CK-MB aufzeigen[138,139].

Das Ausbleiben signifikanter Markererhöhungen ließe sich trotz größtmöglicher Sorgfalt jedoch auch durch eine im Rahmen der Präparation und Installation der Herzen in die Langendorff-Apparatur entstandene Myokardschädigung erklären. In deren Folge käme es auch in der Kontrollgruppe zu einem forcierten

Austreten der Markerenzyme und somit zur Reduktion der Gruppenunterschiede.

Für Enoximon konnten wir unter 40-minütiger Ischämie nur eine Reduktion der hFABP-Konzentration als Einfluss auf die Markerenzyme erkennen. Dem entgegen beschrieben Boldt et al. in Rahmen kardiopulmonaler Bypassoperationen zusätzlich eine Senkung des Troponin T unter Enoximon[140]. Vor dem Hintergrund, dass bei Boldt et al. die Enoximon-Applikation der Ischämie vorausging während sie in unserem Versuch erst mit Beginn der Reperfusion eingeleitet wurde, kommt die Wirkung von Enoximon wahrscheinlich nicht rechtzeitig zum Tragen. Dies könnte auch erklären, warum wir für Enoximon eine signifikant verringerte Troponin T Freisetzung bei nativen, nicht-ischämischen Myokard beobachten konnten. So käme hier für die präparationsbedingten Schäden innerhalb der Enox-IR0/30-Gruppe die Applikation von Enoximon noch rechtzeitig.

Mitochondriale Schäden entstehen ferner durch die ROS- und Ca^{2+} vermittelte Öffnung der mPTP[67,69,141]. Apoptose- und Nekrosevorgängen sind die Folge[142]. Die Sensibilität der mPTP für Ca^{2+} ist dabei von der mitochondrialen Funktion abhängig. Dies bestätigt sich in unserem Versuch, da es in IR-geschädigten Mitochondrien zu einer signifikant stärkeren Öffnung der mPTP unter Ca^{2+} kam. Dies traf sowohl auf die IFM als auch SSM zu (vergl. Abb. 11,12,13,14) und steht im Einklang mit den Ergebnissen von Halestrap et al. zur Öffnung der mPTP im Rahmen der Reperfusion[143]. Enoximon reduziert in unseren Versuchen die mPTP-Öffnung in postischämischen SSM, ohne dabei signifikante Ergebnisse bezüglich der IFM aufzuweisen. Dies ist konkordant zu den Ergebnissen der 15-minütigen Ischämie. Über die Reduktion der Ca^{2+} -Empfindlichkeit der SSM nimmt Enoximon so einen hemmenden Einfluss auf die Einleitung intrazellulärer Nekrose- und Apoptosevorgänge. Dabei ist gerade für die SSM ein protektiver Einfluss von Enoximon sinnvoll, da diese gegenüber Schäden eine erhöhte Vulnerabilität aufweisen: So beschrieben Papanicolaou et al. eine geringere Toleranz der SSM gegenüber ROS-induzierten Schäden[144].

Ferner fanden Palmer et. al. nach maximaler Ca^{2+} -Aufnahme vermehrt Strukturschäden in isolierten SSM[145]. Auch reagieren besonders SSM unter tert-Butylhydroperoxid und Ca^{2+} forciert mit einer mPTP-Öffnung[146]. Holmuhamedov et al. bestätigten die erhöhte Ca^{2+} -Empfindlichkeit der SSM und postulierten, vergleichbar mit unseren Ergebnissen zu Enoximon, einen verstärkten protektiven Einfluss von Diazoxid auf die SSM[147].

Für Enoximon lässt sich dabei eine Kinase-vermittelte Wirkung auf die Poren vermuten. So postulierten Baines et al. bereits für die Proteinkinase $\text{C}\epsilon$ (PKC ϵ) eine signifikante Rolle im Rahmen der mPTP-Öffnung[148]. Ferner demonstrierten Juhaszova et al. die zentrale Stellung der Glykogen-Synthasekinase-3 β (GSK-3 β) im Rahmen einer Prä-Konditionierung der mPTP gegenüber Ischämieereizen[149]. Da Enoximon über die Hemmung der PDE3 eine Erhöhung der cAMP-Konzentration bewirkt und diese wiederum die Proteinkinase A aktiviert, ist eine Proteinkinase A-vermittelte mPTP-Inhibition wahrscheinlicher. Ein Effekt von Enoximon in diesem Zusammenhang würde jedoch nicht voll zum Tragen kommen, da zur vollständigen Aktivierung der PKA eine alleinige Hemmung der PDE3 nicht ausreichend ist. Hierfür sei nach Mika et al. die gleichzeitige Inhibition der PDE-4 notwendig[150].

Im Rahmen unserer Untersuchung zur mPTP-Öffnung verglichen wir die Gruppen auch bezüglich ihres Schwellungsverhalten unter Pyruvat. Als Inhibitor der mPTP-Öffnung, wirkt Pyruvat dabei stabilisierend auf die mPTP[151]. Vermittelt wird dies über eine Reduktion von ROS, Pi und Ca^{2+} als Auslöser der mPTP-Öffnung[152]. Folgerichtig konnten wir in allen 4 Gruppen eine Reduktion der Ca^{2+} -Empfindlichkeit von IFM und SSM gegenüber den Pyruvat-freien Testansätzen beobachten. Gegen Ende der Messung wurden die Unterschiede zwischen Ischämie- und Kontrollgruppe auch unter Pyruvat signifikant. Die erhöhten Schwellungswerte postischämischer SSM sowie IFM könnten dabei Folge der unter Reperfusion steigenden ROS-Konzentration sowie Veränderungen des Membranpotentials sein. In diesem Sinne würde gegen Ende der Messung die inhibitorische Kapazität des Pyruvats überschritten werden.

IR-induzierte Schäden betreffen ferner die mitochondriale Atmungskette. Die schon zuvor in anderen Studien beschriebene Dysfunktion der ETC wird von unseren Ergebnissen bestätigt. Die Kontrollgruppe (IR0/30) fungierte in unserer Studie als Abbild der physiologischen Aktivität. Hierbei findet sich laut Hüttemann et al. ein stabiles $\Delta\Psi_m$ sowie eine ATP-abhängige Kontrolle des Komplex IV und des Cytochrom c. Pathologische Einflüsse stellen sich laut Hüttemann et al. in einer Hypo- oder Hyperpolarisation des $\Delta\Psi_m$ dar. In der vorherigen Arbeit zur 15-minütigen Ischämie wurde unter IR eine verstärkte Komplexaktivität beschrieben. Es wurde angenommen, dass es im Rahmen der folgenden $\Delta\Psi_m$ -Hyperpolarisation verstärkt zu ROS-bedingten Schäden kommt. Enoximon wiederum würde durch ein Absenken der Komplexaktivität das $\Delta\Psi_m$ stabilisieren. Unsere Ergebnisse jedoch weisen für eine 40-minütige Ischämie sowohl für interfibrilläre als auch subsarkolemmale Mitochondrien eine Abnahme der Atmungskettenaktivität auf. So wiesen die Komplexe II-V, II-IV und IV in der Sauerstoffmessung einen verringerten O_2 -Verbrauch auf. Zusätzlich kommt es bei den IFM zu einem Aktivitätsabfall der Komplexe III-V. Eine Reduktion der Komplexaktivität im Rahmen des IR fanden in ihren Studien an Rattenherzen auch Abe et al. für Komplex II[153], Hoppel et al. für Komplex III[154] sowie Paradies et al. für Komplex IV[155]. Auch Solaini et al. beschrieben in ihrer Übersichtsarbeit eine Reduktion der Atmungskettenaktivität unter IR[156]. Im Gegensatz zu kurzen Intervallen scheint es somit nach prolongierter Ischämiedauer zu einem hypoaktiven Zustand der Atmungskette im IR-Intervall zu kommen. Dieser birgt nach Hüttemann et al. die Gefahr eines Depolarisationsbedingten Sistieren der Energiegewinnung.

Wie unter 15-minütiger Ischämie, in welcher Enoximon die Ischämie-bedingte Erhöhung der Atmungskettenaktivität wieder auf ein physiologisches Maß reduzierte, fanden wir auch nach 40 Minuten eine stabilisierende Wirkung auf die Atmungskette. So konnten wir eine Steigerung der maximalen Respirationsrate in den Komplexen I-V und II-V erkennen. Auch die Aktivität der Komplexe II-IV sowie IV nimmt unter Enoximon zu. Enoximon steigert somit die im Rahmen der langen Ischämiedauer reduzierte Komplex-Aktivität

und wirkt so dem Funktionsabfall der Atmungskette entgegen. So kann die nötige ATP-Produktion zum Erhalt der kontraktile Funktion des Muskelgewebes länger aufrechterhalten werden. Auch hier ist eine Proteinkinase vermittelte Enoximonwirkung anzunehmen. So postulieren Acin-Perez et al. eine gesteigerte Aktivität der COX bei PKA-abhängiger Stimulation[157,158]. Zusätzlich beschrieben Santarpino et al. für Enoximon eine Reduktion der Entzündungsreaktion. Da dies Ausgangspunkt zusätzlicher ROS-Produktion ist, könnte es somit additiv zu einem Schutz der ETC vor ROS-bedingten Schäden kommen[159]. Eine Enoximon-vermittelte $\Delta\Psi_m$ -Stabilisierung ist in diesem Zusammenhang wahrscheinlich ursächlich, was die Steigerung der APT-Synthesefunktion (C IV) unter Enoximon erklärt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sind in ihrer Aussagekraft durch einige Umstände limitiert. Zum einen basieren sie, trotz Erreichen des Signifikanzniveaus, auf einer kleinen einfach-verblindeten Studie mit je 8 Tieren pro Versuchsgruppe. Zum anderen stellen unsere Versuche ein Abbild der isolierten Organ- sowie Mitochondrienfunktion dar. Dabei bietet das Langendorff-Modell eine standardisierte und einfache Methode für organspezifische Fragestellungen. Jedoch ist es auf Grund der unphysiologischen retrograden Perfusion, der Verwendung von Perfusionspuffern sowie der Abkopplung der Organe von organübergreifenden hormonellen, zellulären und neurogenen Einflüssen, in seiner Aussagekraft für Vorgänge *in vivo* begrenzt. Auch die O₂-Ausschöpfung sowie die effektiv am Herzen wirkende Enoximon-Konzentration kann zwischen *in vitro* und *in vivo* differieren. Zusätzlich kann die Funktionalität isolierter Mitochondrien durch Präparations-bedingte Einflüsse gegenüber Mitochondrien *in vivo* verändert sein. Dies kann vor allem die Membranstabilität und Ionenkonzentration betreffen[156]. Auf Grund unseres Einsatzes von Rotenon, wurde der Protonentransport in Komplex I unterbunden. Einflüsse dieses Komplexes auf das $\Delta\Psi_m$ sowie den O₂-Verbrauch ließen sich somit in unserem Versuch nicht analysieren. Des Weiteren lässt sich ein Transfer der Ergebnisse auf den Menschen nur eingeschränkt vornehmen. So gibt es Spezies-spezifische

Unterschiede in der Ausprägung und Konzentration der 11 verschiedenen Isoenzyme der PDE. Während bei Ratten die PDE₄ den Hauptteil der PDE stellt und die PDE₃ nur einen Anteil von etwa 20-30% besitzt, leistet beim Menschen die PDE₁ den Großteil des cAMP- und cGMP- Abbaus[160].

5. Zusammenfassung

Die Reperfusion ischämischen Myokards ist für das Überleben des Organismus von essentieller Bedeutung. Jedoch führt die Wiederherstellung der Perfusion zum Auftreten IR-bedingter Schäden. Die Reduktion der myokardialen Leistung ist die dabei abhängig vom Ausmaß des Ischämie-Intervalls und erstreckt sich von dem klinisch beobachtbaren Phänomen des „myocardial stunning“ und „no-reflow“ bis hin zum Nekrose- und Apoptose-bedingten Zelluntergang. Durch die Beeinflussung des Zellüberlebens, der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration sowie der Generation von ATP, nehmen Mitochondrien in der Ausbildung von IR-Schäden eine zentrale Rolle ein. Enoximon als PDE₃-Inhibitor erwies sich in Studien gegenüber IR-Einflüssen als kardioprotektiv. Sowohl die IR-bedingten Schäden als auch die Wirkung von Enoximon wurden von unserem Labor in Rahmen einer 15-minütigen Ischämie-Studie in Zusammenhang mit der mitochondrialen Funktion gebracht. Dabei blieben jedoch die Auswirkungen prolongierter Ischämiezeiten auf die Kardiomyozyten Funktion sowie den Einfluss von Enoximon hierauf unklar. Um dies zu untersuchen, wurden die Ergebnisse der Versuchsgruppen anhand des Modells der Langendorffperfusion verglichen. Die Gruppen unterschieden sich dabei hinsichtlich der Kombination von Gebrauch bzw. Nichtgebrauch einer 40-minütigen Ischämiezeit sowie Enoximon. Ergänzend wurden kardiale Marker im Eluat bestimmt. Dem Langendorff-Versuch folgte die Isolation der subsarkolemmalen und interfibrillären Mitochondrien aus dem Herzgewebe mit anschließender Analyse der Atmungsketteaktivität sowie Ca²⁺-Sensibilität der mPTP.

Unter 40-minütiger Ischämie mit anschließender Reperfusion kam es dabei zu einem Abfall der kardialen Leistungsfähigkeit mit Reduktion von LVP_{sys}, Kontraktilität sowie des Koronarflusses. Der erwartete begleitende Anstieg

kardialer Marker blieb jedoch aus. Ferner kam es zu einer Reduktion der Aktivität der Atmungskettenkomplexe. Die Ca^{2+} -Empfindlichkeit der mPTP stieg in beiden Mitochondrienpopulationen an.

Für den PDE₃-Hemmer Enoximon konnten wir eine Verbesserung der Hämodynamik in nativen Myokard beobachten. Hierunter war eine Steigerung der Kontraktilität erkennbar. Auf die kardiale Leistung nach 40-minütiger Ischämie hatte Enoximon jedoch keinen Einfluss. Auf mitochondrialer Ebene führte Enoximon in subsarkolemmalen Mitochondrien zu einer Reduktion der mPTP-Sensibilität für Ca^{2+} . Hierüber könnte die Induktion von intrazellulären Nekrose- und Apoptosevorgängen verlangsamt sein. Ferner erfuhr die im Zuge des IR gefallene Komplexaktivität der Atmungskette durch Enoximon eine Steigerung. Somit ist von einem stabilisierenden Effekt auf die Atmungskette auszugehen.

Unsere Ergebnisse weisen darauf hin, dass Enoximon auch nach 40-minütiger Ischämie die mitochondriale Leistungsfähigkeit erhöhen kann. Somit ist auch unter prolongierten Ischämieintervallen eine Verbesserung des mitochondrialen Widerstands gegen IR-bedingte Schäden gegeben. Gegenüber Studien mit kürzeren Ischämiezeiten oder früheren Applikationszeitpunkten konnten wir für Enoximon jedoch keine Steigerung der Herzleistung mehr erkennen. Enoximon scheint somit in seiner Wirkung durch die Ischämiedauer stark begrenzt zu sein. Für einen therapeutischen Nutzen bei Patienten mit akuter Herzinsuffizienz, scheint somit eine zeitnahe Reperfusion sowie Enoximon-Applikation nötig zu sein.

5. Literaturverzeichnis

1. Gray, M.W., Mitochondrial Evolution. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 2012. 4(9).
2. Whatley, F.R., The Establishment of mitochondria: Paracoccus and rhodospseudomonas. Annals of the New York Academy of Sciences, 1981. 361(1): p. 330-340.
3. Ogata, H., et al., Genome Sequence of Rickettsia bellii Illuminates the Role of Amoebae in Gene Exchanges between Intracellular Pathogens. PLoS Genet, 2006. 2(5): p. e76.
4. Cavalier-Smith, T., Eukaryotes with no mitochondria. (0028-0836 (Print)).
5. Gellerich, F.N., et al., Function of the mitochondrial outer membrane as a diffusion barrier in health and diseases. Biochemical Society Transactions, 2000. 28(2): p. 164-169.
6. Frazier, A.E., et al., Mitochondria Use Different Mechanisms for Transport of Multispanning Membrane Proteins through the Intermembrane Space. Molecular and Cellular Biology, 2003. 23(21): p. 7818-7828.
7. Khalimonchuk, O. and G. Rödel, Biogenesis of cytochrome c oxidase. Mitochondrion, 2005. 5(6): p. 363-388.
8. Page, E. and L.P. McCallister, Quantitative electron microscopic description of heart muscle cells. American Journal of Cardiology. 31(2): p. 172-181.
9. Stenger, R.J. and D. Spiro, Structure of the cardiac muscle cell. The American Journal of Medicine. 30(5): p. 653-665.
10. Shimada, T., et al., Morphological studies of different mitochondrial populations in monkey myocardial cells. Cell Tissue Res, 1984. 238(3): p. 577-82.
11. Herpin, P. and H. Barré, Loose-coupled subsarcolemmal mitochondria from muscle Rhomboideus in cold-acclimated piglets. Comparative biochemistry and physiology. B, Comparative biochemistry, 1989. 92(1): p. 59-65.
12. McKean, T.A., Comparison of respiration in rat, guinea pig and muskrat heart mitochondria. Comp Biochem Physiol B, 1990. 97(1): p. 109-12.
13. Lesnefsky, E.J., et al., Myocardial ischemia selectively depletes cardiolipin in rabbit heart subsarcolemmal mitochondria. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2001. 280(6): p. H2770-8.
14. Palmer, J.W., B. Tandler, and C.L. Hoppel, Biochemical differences between subsarcolemmal and interfibrillar mitochondria from rat cardiac muscle: effects of procedural manipulations. Arch Biochem Biophys, 1985. 236(2): p. 691-702.
15. Cogswell, A.M., R.J. Stevens, and D.A. Hood, Properties of skeletal muscle

- mitochondria isolated from subsarcolemmal and intermyofibrillar regions. *Am J Physiol*, 1993. 264(2 Pt 1): p. C383-9.
16. Kann, O. and R. Kovacs, Mitochondria and neuronal activity. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2007. 292(2): p. C641-57.
 17. Palmer, J.W., B. Tandler, and C.L. Hoppel, Biochemical properties of subsarcolemmal and interfibrillar mitochondria isolated from rat cardiac muscle. *J Biol Chem*, 1977. 252(23): p. 8731-9.
 18. Bugger, H., J.-M. Chemnitz, and T. Doenst, Differential changes in respiratory capacity and ischemia tolerance of isolated mitochondria from atrophied and hypertrophied hearts. *Metabolism*, 2006. 55(8): p. 1097-1106.
 19. Mollica, M.P., et al., Heterogeneous bioenergetic behaviour of subsarcolemmal and intermyofibrillar mitochondria in fed and fasted rats. *Cell Mol Life Sci*, 2006. 63(3): p. 358-66.
 20. Schwarzer, M., et al., Pressure overload differentially affects respiratory capacity in interfibrillar and subsarcolemmal mitochondria. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2013. 304(4): p. H529-37.
 21. Fawcett, D.W. and N.S. McNutt, The ultrastructure of cat myocardium. *The Journal of Cell Biology*, 1969. 42(1): p. 1-45.
 22. Hom, J. and S.-S. Sheu, Morphological Dynamics of Mitochondria – A Special Emphasis on Cardiac Muscle Cells. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 2009. 46(6): p. 811-820.
 23. Rizzuto, R., et al., Ca²⁺ transfer from the ER to mitochondria: when, how and why. *Biochimica et biophysica acta*, 2009. 1787(11): p. 1342-1351.
 24. Kaasik, A., et al., Energetic crosstalk between organelles: architectural integration of energy production and utilization. *Circ Res*, 2001. 89(2): p. 153-9.
 25. Sillau, A.H., V. Ernst, and N. Reyes, Oxidative capacity distribution in the cardiac myocytes of hypermetabolic rats. *Respir Physiol*, 1990. 79(3): p. 279-91.
 26. Riva, A., et al., Structural differences in two biochemically defined populations of cardiac mitochondria. (0363-6135 (Print)).
 27. Schagger, H., Respiratory chain supercomplexes of mitochondria and bacteria. *Biochim Biophys Acta*, 2002. 1555(1-3): p. 154-9.
 28. Kasumov, T., et al., Assessment of cardiac proteome dynamics with heavy water: slower protein synthesis rates in interfibrillar than subsarcolemmal mitochondria. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 2013. 304(9): p. H1201-H1214.
 29. Hoppeler, H., et al., The ultrastructure of the normal human skeletal muscle.

Pflügers Archiv. 344(3): p. 217-232.

30. Hollander, J.M., D. Thapa, and D.L. Shepherd, Physiological and structural differences in spatially distinct subpopulations of cardiac mitochondria: influence of cardiac pathologies. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 2014. 307(1): p. H1-H14.
31. Holmuhamedov, E.L., et al., Cardiac Subsarcolemmal and Interfibrillar Mitochondria Display Distinct Responsiveness to Protection by Diazoxide. *PLoS ONE*, 2012. 7(9): p. e44667.
32. Holness, M.J. and M.C. Sugden, Regulation of pyruvate dehydrogenase complex activity by reversible phosphorylation. *Biochem Soc Trans*, 2003. 31(Pt 6): p. 1143-51.
33. Green, D.R. and B. Van Houten, Mitochondrial Quality Control. *Cell*, 2011. 147(4): p. 950-950.e1.
34. Lill, R. and G. Kispal, Maturation of cellular Fe-S proteins: an essential function of mitochondria. *Trends Biochem Sci*, 2000. 25(8): p. 352-6.
35. Rizzuto, R., et al., Mitochondria as sensors and regulators of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2012. 13(9): p. 566-578.
36. Stanley, W.C. and C.L. Hoppel, Mitochondrial dysfunction in heart failure: potential for therapeutic interventions? *Cardiovascular Research*, 2000. 45(4): p. 805-806.
37. Elmore, S., Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic pathology*, 2007. 35(4): p. 495-516.
38. Ong, S.-B. and D.J. Hausenloy, Mitochondrial morphology and cardiovascular disease. *Cardiovascular Research*, 2010. 88(1): p. 16-29.
39. Giricz, Z., R.M. Mentzer, and R.A. Gottlieb, Autophagy, Myocardial Protection and the Metabolic Syndrome. *Journal of cardiovascular pharmacology*, 2012. 60(2): p. 125-132.
40. Kubli, D.A. and Å.B. Gustafsson, Mitochondria and Mitophagy: The Yin and Yang of Cell Death Control. *Circulation research*, 2012. 111(9): p. 1208-1221.
41. Zhou, L. and B. O'Rourke, Cardiac mitochondrial network excitability: insights from computational analysis. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 2012. 302(11): p. H2178-H2189.
42. Picard, M., K. White, and D.M. Turnbull, Mitochondrial morphology, topology, and membrane interactions in skeletal muscle: a quantitative three-dimensional electron microscopy study. *Journal of Applied Physiology*, 2013. 114(2): p. 161-171.
43. Skulachev, V.P., Mitochondrial filaments and clusters as intracellular power-

- transmitting cables. *Trends Biochem Sci*, 2001. 26(1): p. 23-9.
44. Kuznetsov, A.V., et al., Mitochondrial subpopulations and heterogeneity revealed by confocal imaging: possible physiological role? *Biochim Biophys Acta*, 2006. 1757(5-6): p. 686-91.
 45. Hatano, A., et al., Distinct Functional Roles of Cardiac Mitochondrial Subpopulations Revealed by a 3D Simulation Model. *Biophysical Journal*, 2015. 108(11): p. 2732-2739.
 46. Rupert, B.E., et al., Metabolic adaptation of the hypertrophied heart: role of the malate/aspartate and alpha-glycerophosphate shuttles. *J Mol Cell Cardiol*, 2000. 32(12): p. 2287-97.
 47. Jitrapakdee, S. and J.C. Wallace, Structure, function and regulation of pyruvate carboxylase. *Biochemical Journal*, 1999. 340(Pt 1): p. 1-16.
 48. Stewart, V., Regulation of nitrate and nitrite reductase synthesis in enterobacteria. (0003-6072 (Print)).
 49. Hatefi, Y., The Mitochondrial Electron Transport and Oxidative Phosphorylation System. *Annual Review of Biochemistry*, 1985. 54(1): p. 1015-1069.
 50. Perry, S.W., et al., Mitochondrial membrane potential probes and the proton gradient: a practical usage guide. *BioTechniques*, 2011. 50(2): p. 98-115.
 51. Nakamoto, R.K., J.A.B. Scanlon, and M.K. Al-Shawi, The Rotary Mechanism of the ATP Synthase. *Archives of biochemistry and biophysics*, 2008. 476(1): p. 43-50.
 52. Chance B Fau - Williams, G.R. and G.R. Williams, The respiratory chain and oxidative phosphorylation. (0065-258X (Print)).
 53. E, G., *MitoPathways: Respiratory States and Coupling Control Ratios*. OROBOROS MiPNet Publications, Innsbruck, 2009. *Mitochondrial Pathways and Respiratory Control*. 2nd ed: p. 43-53.
 54. Helling, S., et al., Multiple Phosphorylations of Cytochrome c Oxidase and their Functions. *Proteomics*, 2012. 12(7): p. 950-959.
 55. Huttemann, M., et al., Regulation of oxidative phosphorylation, the mitochondrial membrane potential, and their role in human disease. *J Bioenerg Biomembr*, 2008. 40(5): p. 445-56.
 56. Kadenbach, B., Intrinsic and extrinsic uncoupling of oxidative phosphorylation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 2003. 1604(2): p. 77-94.
 57. Terada, H., Uncouplers of oxidative phosphorylation. *Environmental Health Perspectives*, 1990. 87: p. 213-218.
 58. Stanley, W.C., F.A. Recchia, and G.D. Lopaschuk, Myocardial Substrate Metabolism in the Normal and Failing Heart. *Physiological Reviews*, 2005. 85(3): p. 1093-1129.

59. Wallimann, T., et al., Some new aspects of creatine kinase (CK): compartmentation, structure, function and regulation for cellular and mitochondrial bioenergetics and physiology. (0951-6433 (Print)).
60. Juel, C. and A.P. Halestrap, Lactate transport in skeletal muscle — role and regulation of the monocarboxylate transporter. *The Journal of Physiology*, 1999. 517(Pt 3): p. 633-642.
61. Murphy, E. and D.A. Eisner, Regulation of intracellular and mitochondrial Na in health and disease. *Circulation research*, 2009. 104(3): p. 292-303.
62. Despa, S. and D.M. Bers, Na(+) transport in the normal and failing heart – remember the balance. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 2013. 61: p. 2-10.
63. Karmazyn, M., et al., The myocardial Na(+)-H(+) exchange: structure, regulation, and its role in heart disease. (1524-4571 (Electronic)).
64. Afanas'ev, I., ROS and RNS Signaling in Heart Disorders: Could Antioxidant Treatment Be Successful? *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2011. 2011: p. 293769.
65. Vanden Hoek, T.L., et al., Significant levels of oxidants are generated by isolated cardiomyocytes during ischemia prior to reperfusion. (0022-2828 (Print)).
66. Ong, S.B., et al., Role of the MPTP in conditioning the heart – translatability and mechanism. *British Journal of Pharmacology*, 2015. 172(8): p. 2074-2084.
67. Di Lisa, F., et al., Opening of the Mitochondrial Permeability Transition Pore Causes Depletion of Mitochondrial and Cytosolic NAD⁺ and Is a Causative Event in the Death of Myocytes in Postischemic Reperfusion of the Heart. *Journal of Biological Chemistry*, 2001. 276(4): p. 2571-2575.
68. Halestrap, A.P., S.J. Clarke, and I. Khaliulin, The role of mitochondria in protection of the heart by preconditioning. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2007. 1767(8): p. 1007-1031.
69. Kinnally, K.W., et al., Is mPTP the gatekeeper for necrosis, apoptosis, or both? *Biochimica et biophysica acta*, 2011. 1813(4): p. 616-622.
70. Zorov, D.B., S.J. Juhaszova M Fau - Sollott, and S.J. Sollott, Mitochondrial ROS-induced ROS release: an update and review. (0006-3002 (Print)).
71. Javadov, S., M. Karmazyn, and N. Escobales, Mitochondrial Permeability Transition Pore Opening as a Promising Therapeutic Target in Cardiac Diseases. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2009. 330(3): p. 670-678.
72. Halestrap, A.P. and P. Pasdois, The role of the mitochondrial permeability transition pore in heart disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 2009. 1787(11): p. 1402-1415.

73. Griffiths, E.J. and A.P. Halestrap, Mitochondrial non-specific pores remain closed during cardiac ischaemia, but open upon reperfusion. *Biochemical Journal*, 1995. 307(1): p. 93-98.
74. Vandenberg, J.I., J.C. Metcalfe, and A.A. Grace, Mechanisms of pHi recovery after global ischemia in the perfused heart. *Circulation Research*, 1993. 72(5): p. 993-1003.
75. Piper, H.M., K. Meuter, and C. Schäfer, Cellular mechanisms of ischemia-reperfusion injury. *The Annals of Thoracic Surgery*, 2003. 75(2): p. S644-S648.
76. Carden, D.L. and D.N. Granger, Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury. *The Journal of Pathology*, 2000. 190(3): p. 255-266.
77. Shamas-Din, A., et al., Mechanisms of Action of Bcl-2 Family Proteins. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2013. 5(4).
78. Halestrap, A.P., Calcium, mitochondria and reperfusion injury: a pore way to die. *Biochemical Society Transactions*, 2006. 34(2): p. 232-237.
79. Reimer, K.A., et al., The wavefront phenomenon of ischemic cell death. 1. Myocardial infarct size vs duration of coronary occlusion in dogs. *Circulation*, 1977. 56(5): p. 786-94.
80. Bolli, R. and E. Marbán, Molecular and Cellular Mechanisms of Myocardial Stunning. *Physiological Reviews*, 1999. 79(2): p. 609-634.
81. Pomblum, V.J., et al., Cardiac stunning in the clinic: the full picture. *Interactive Cardiovascular and Thoracic Surgery*, 2010. 10(1): p. 86-91.
82. Moens, A.L., et al., Myocardial ischemia/reperfusion-injury, a clinical view on a complex pathophysiological process. *International Journal of Cardiology*, 2005. 100(2): p. 179-190.
83. Yellon, D.M. and D.J. Hausenloy, Myocardial Reperfusion Injury. *New England Journal of Medicine*, 2007. 357(11): p. 1121-1135.
84. Piper, H.M., Y. Abdallah, and C. Schäfer, The first minutes of reperfusion: a window of opportunity for cardioprotection. *Cardiovascular Research*, 2004. 61(3): p. 365-371.
85. McMurray, J.J., et al., ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. (1522-9645 (Electronic)).
86. Farmakis, D., et al., Acute Heart Failure: Epidemiology, Risk Factors, and Prevention. *Revista Española de Cardiología (English Version)*, 2015. 68(03): p. 245-248.

87. Harjola, V.P., et al., Characteristics, outcomes, and predictors of mortality at 3 months and 1 year in patients hospitalized for acute heart failure. (1879-0844 (Electronic)).
88. Nieminen, M.S., et al., EuroHeart Failure Survey II (EHFS II): a survey on hospitalized acute heart failure patients: description of population. (0195-668X (Print)).
89. Adams Jr, K.F., et al., Characteristics and outcomes of patients hospitalized for heart failure in the United States: Rationale, design, and preliminary observations from the first 100,000 cases in the Acute Decompensated Heart Failure National Registry (ADHERE). *American Heart Journal*, 2005. 149(2): p. 209-216.
90. Mentz, R.J., et al., International differences in clinical characteristics, management, and outcomes in acute heart failure patients: better short-term outcomes in patients enrolled in Eastern Europe and Russia in the PROTECT trial. (1879-0844 (Electronic)).
91. Vigilance, D.W. and M.C. Oz, Strategies for management of postcardiotomy cardiogenic shock following valvular heart surgery. (0065-2326 (Print)).
92. Collier, M.L., et al., Calcium-Induced Calcium Release in Smooth Muscle: Loose Coupling between the Action Potential and Calcium Release. *The Journal of General Physiology*, 2000. 115(5): p. 653-662.
93. Bodi, I., et al., The L-type calcium channel in the heart: the beat goes on. *Journal of Clinical Investigation*, 2005. 115(12): p. 3306-3317.
94. Bers, D.M. and T.R. Shannon, Calcium Movements Inside the Sarcoplasmic Reticulum of Cardiac Myocytes. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 2013. 58: p. 59-66.
95. Denton Rm Fau - McCormack, J.G. and J.G. McCormack, On the role of the calcium transport cycle in heart and other mammalian mitochondria. (0014-5793 (Print)).
96. Hopper, R.K., et al., Mitochondrial matrix phosphoproteome: effect of extra mitochondrial calcium. (0006-2960 (Print)).
97. French, J.P., et al., Ischemia-reperfusion-induced calpain activation and SERCA2a degradation are attenuated by exercise training and calpain inhibition. (0363-6135 (Print)).
98. Turrens, J.F., Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *The Journal of Physiology*, 2003. 552(Pt 2): p. 335-344.
99. Bartz, R.R., H.B. Suliman, and C.A. Piantadosi, Redox mechanisms of cardiomyocyte mitochondrial protection. *Frontiers in Physiology*, 2015. 6.
100. Balaban, R.S., S. Nemoto, and T. Finkel, Mitochondria, Oxidants, and Aging. *Cell*.

- 120(4): p. 483-495.
101. Radi, R., et al., Peroxynitrite reactions and formation in mitochondria. (0891-5849 (Print)).
 102. Boveris, A. and B. Chance, The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochemical Journal*, 1973. 134(3): p. 707-716.
 103. Robinson, J.M., Reactive oxygen species in phagocytic leukocytes. *Histochemistry and Cell Biology*, 2008. 130(2): p. 281-297.
 104. Aon, M.A., et al., Glutathione/thioredoxin systems modulate mitochondrial H₂O₂ emission: An experimental-computational study. *The Journal of General Physiology*, 2012. 139(6): p. 479-491.
 105. Liemburg-Apers, D.C., et al., Interactions between mitochondrial reactive oxygen species and cellular glucose metabolism. *Archives of Toxicology*, 2015. 89(8): p. 1209-1226.
 106. Paradies, G., et al., Decrease in Mitochondrial Complex I Activity in Ischemic/Reperused Rat Heart: Involvement of Reactive Oxygen Species and Cardiopilin. *Circulation Research*, 2004. 94(1): p. 53-59.
 107. Nemoto, S., et al., Role for Mitochondrial Oxidants as Regulators of Cellular Metabolism. *Molecular and Cellular Biology*, 2000. 20(19): p. 7311-7318.
 108. Cadenas, E. and K.J.A. Davies, Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radical Biology and Medicine*, 2000. 29(3-4): p. 222-230.
 109. Zimmer, H.-G., The Isolated Perfused Heart and Its Pioneers. *Physiology*, 1998. 13(4): p. 203-210.
 110. Skrzypiec-Spring, M., et al., Isolated heart perfusion according to Langendorff—Still viable in the new millennium. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 2007. 55(2): p. 113-126.
 111. Liao, R., B.K. Podesser, and C.C. Lim, The continuing evolution of the Langendorff and ejecting murine heart: new advances in cardiac phenotyping. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 2012. 303(2): p. H156-H167.
 112. Bell, R.M., M.M. Mocanu, and D.M. Yellon, Retrograde heart perfusion: The Langendorff technique of isolated heart perfusion. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 2011. 50(6): p. 940-950.
 113. Grossmann, M., et al., Dilatory effects of phosphodiesterase inhibitors on human hand veins in vivo. (0031-6970 (Print)).
 114. Lehtonen, L.A., P.J. Antila S Fau - Pentikainen, and P.J. Pentikainen,

- Pharmacokinetics and pharmacodynamics of intravenous inotropic agents. (0312-5963 (Print)).
115. Murray, K.J., Cyclic AMP and mechanisms of vasolidation. *Pharmacology & Therapeutics*, 1990. 47(3): p. 329-345.
 116. Endoh, M., Basic and clinical characteristics of PDE 3 inhibitors as cardiotonic agents. (0920-3206 (Print)).
 117. Endoh, M. and M. Hori, Acute heart failure: inotropic agents and their clinical uses. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 2006. 7(16): p. 2179-2202.
 118. Berti, S., et al., Acute enoximone effect on systemic and renal hemodynamics in patients with heart failure. (0920-3206 (Print)).
 119. Kazmaier, S., H. Stephan H Fau - Sonntag, and H. Sonntag, [Hemodynamic effects of new phosphodiesterase inhibitors in patients with coronary heart disease. A comparison between enoximone and R80122]. (0003-2417 (Print)).
 120. Skoyles Jr Fau - Sherry, K.M. and K.M. Sherry, Pharmacology, mechanisms of action and uses of selective phosphodiesterase inhibitors. (0007-0912 (Print)).
 121. Albrecht Wiebalck, B.F., Enoximone in the clinical daily routine. *MIS – Medicine Information Services GmbH*, 2011. congress compact verlag.
 122. Boldt, J., et al., Efficacy of the phosphodiesterase inhibitor enoximone in complicated cardiac surgery. (0012-3692 (Print)).
 123. Vincent, J.L., J. Leon M Fau - Berre, and J. Berre, The role of enoximone in the treatment of cardiogenic shock. (0008-6312 (Print)).
 124. Sutherland, F.J. and D.J. Hearse, The isolated blood and perfusion fluid perfused heart. (1043-6618 (Print)).
 125. Zini, R., et al., Tacrolimus decreases in vitro oxidative phosphorylation of mitochondria from rat forebrain. (0024-3205 (Print)).
 126. Clark, L.C., *Trans. Amer. Soc. Art. Int. Organs*, 2, 1956: p. p. 41.
 127. Spinazzi, M., et al., Assessment of mitochondrial respiratory chain enzymatic activities on tissues and cultured cells. (1750-2799 (Electronic)).
 128. Lecoœur, H., et al., Real-time flow cytometry analysis of permeability transition in isolated mitochondria. (0014-4827 (Print)).
 129. Halestrap, A.P. and A.M. Davidson, Inhibition of Ca²⁺(+)-induced large-amplitude swelling of liver and heart mitochondria by cyclosporin is probably caused by the inhibitor binding to mitochondrial-matrix peptidyl-prolyl cis-trans isomerase and preventing it interacting with the adenine nucleotide translocase. (0264-6021 (Print)).
 130. Hoy, F.B.Y., et al., Bridge to recovery for postcardiotomy failure: is there still a

role for centrifugal pumps? *The Annals of Thoracic Surgery*. 70(4): p. 1259-1263.

131. Forini F, Nicolini G, Iervasi G. Mitochondria as Key Targets of Cardioprotection in Cardiac Ischemic Disease: Role of Thyroid Hormone Triiodothyronine. Ross JM, Coppotelli G, eds. *International Journal of Molecular Sciences*. 2015;16(3):6312-6336. doi:10.3390/ijms16036312
132. Berti, Sergio & Palmieri, C & Ravani, M & Bonini, R & Iascone, Maria & Clerico, Aldo & Manfredi, C & Iervasi, Giorgio & Ferrazzi, Paolo & Biagini, Andrea. (1996). Acute enoximone effect on systemic and renal hemodynamics in patients with heart failure. *Cardiovascular drugs and therapy / sponsored by the International Society of Cardiovascular Pharmacotherapy*. 10. 81-7. 10.1007/BF00051134.
133. Ulrich Sunderdiek, Bernhard Korbmacher, Emmeran Gams, Jochen D. Schipke; Myocardial efficiency in stunned myocardium. Comparison of Ca²⁺-sensitization and PDE III-inhibition on energy consumption, *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*, Volume 18, Issue 1, 1 July 2000
134. Fert-Bober, J. , Basran, R. S., Sawicka, J. and Sawicki, G. (2008), Effect of duration of ischemia on myocardial proteome in ischemia/reperfusion injury. *Proteomics*, 8: 2543-2555.
135. Galinanes, M & J Hearse, D. (1990). Assessment of ischemic injury and protective interventions: The Langendorff versus the working rat heart preparation. *The Canadian journal of cardiology*. 6. 83-91.
136. Global ischemic duration and reperfusion function in the isolated perfused rat heart, Palmer, Brian S. et al., *Resuscitation* , Volume 62 , Issue 1 , 97 – 106
137. Intracellular compartmentation of troponin T: Release kinetics after global ischemia and calcium paradox in the isolated perfused rat heart, Remppis, Andrew et al., *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* , Volume 27 , Issue 2 , 793 – 803
138. Frequent biomarker analysis in the isolated perfused heart reveals two distinct phases of reperfusion injury, Povlsen, Jonas Agerlund et al., *International Journal of Cardiology* , Volume 171 , Issue 1 , 9 – 14
139. Amani M, jeddi sajad, Ahmadiasl N, Usefzade N, Zaman J. Effect of HEMADO on Level of CK-MB and LDH Enzymes after Ischemia/Reperfusion Injury in Isolated Rat Heart. *BioImpacts : BI*. 2013;3(2):101-104. doi:10.5681/bi.2013.003.
140. Boldt J, Rothe G, Schindler E, Döll C, Görlach G, Hempelmann G. Can clonidine, enoximone, and enalaprilat help to protect the myocardium against ischaemia in cardiac surgery? *Heart*. 1996;76(3):207-213.
141. Turer AT, Hill JA. Pathogenesis of Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury and Rationale for Therapy. *The American journal of cardiology*. 2010;106(3):360-368. doi:10.1016/j.amjcard.2010.03.032.

142. Wong R, Steenbergen C, Murphy E. Mitochondrial permeability transition pore and calcium handling. *Methods in molecular biology* (Clifton, NJ). 2012;810:235-242. doi:10.1007/978-1-61779-382-0_15.
143. Andrew P Halestrap, Samantha J Clarke, Sabzali A Javadov; Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion—a target for cardioprotection, *Cardiovascular Research*, Volume 61, Issue 3, 15 February 2004, Pages 372–385
144. Papanicolaou KN, Ngoh GA, Dabkowski ER, et al. Cardiomyocyte deletion of mitofusin-1 leads to mitochondrial fragmentation and improves tolerance to ROS-induced mitochondrial dysfunction and cell death. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*. 2012;302(1):H167-H179. doi:10.1152/ajpheart.00833.2011.
145. J. W. Palmer, B. Tandler, and C. L. Hoppel, Heterogeneous response of subsarcolemmal heart mitochondria to calcium, *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 1986 250:5, H741-H748
146. Williamson CL, Dabkowski ER, Baseler WA, Croston TL, Alway SE, Hollander JM. Enhanced apoptotic propensity in diabetic cardiac mitochondria: influence of subcellular spatial location. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 298: H633–H642, 2010
147. Holmuhamedov EL, Oberlin A, Short K, Terzic A, Jahangir A. Cardiac Subsarcolemmal and Interfibrillar Mitochondria Display Distinct Responsiveness to Protection by Diazoxide. *Quintas LEM, ed. PLoS ONE*. 2012;7(9):e44667. doi:10.1371/journal.pone.0044667.
148. Baines CP, Song C-X, Zheng Y-T, et al. Protein Kinase C ϵ Interacts With and Inhibits the Permeability Transition Pore in Cardiac Mitochondria. *Circulation research*. 2003;92(8):873-880. doi:10.1161/01.RES.0000069215.36389.8D.
149. Juhaszova M, Zorov DB, Kim S-H, et al. Glycogen synthase kinase-3 β mediates convergence of protection signaling to inhibit the mitochondrial permeability transition pore. *Journal of Clinical Investigation*. 2004;113(11):1535-1549. doi:10.1172/JCI200419906.
150. Mika D, Bobin P, Pomérance M, et al. Differential regulation of cardiac excitation–contraction coupling by cAMP phosphodiesterase subtypes. *Cardiovascular Research*. 2013;100(2):336-346. doi:10.1093/cvr/cvt193.
151. Paul M. Kerr, M.-Saadeh Suleiman, and Andrew P. Halestrap, Reversal of permeability transition during recovery of hearts from ischemia and its enhancement by pyruvate, *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 1999 276:2, H496-H502
152. Mallet, R. T. (2000), Pyruvate: Metabolic Protector of Cardiac Performance. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 223: 136-148.

153. Kazutoyo Abe, Naoyuki Hayashi, Hiroshi Terada, Effect of endogenous nitric oxide on energy metabolism of rat heart mitochondria during ischemia and reperfusion, *Free Radical Biology and Medicine*, Volume 26, Issues 3–4, 1999, Pages 379-387
154. Hoppel, Charles L., Shadi Moghaddas and Edward J. Lesnefsky. "Interfibrillar cardiac mitochondrial complexes III defects in the aging rat heart." *Biogerontology* 3 (2002): 41-44.
155. Paradies G, Petrosillo G, Pistolesse M, Di Venosa N, Serena D, Ruggiero FM, Lipid peroxidation and alterations to oxidative metabolism in mitochondria isolated from rat heart subjected to ischemia and reperfusion, *Free Radical Biology and Medicine*, Volume 27, Issues 1–2, 1999, Pages 42-50,
156. Solaini G, Harris DA. Biochemical dysfunction in heart mitochondria exposed to ischaemia and reperfusion. *Biochemical Journal*. 2005;390(Pt 2):377-394. doi:10.1042/BJ20042006.
157. Acin-Perez R, Salazar E, Brosel S, Yang H, Schon EA, Manfredi G. Modulation of mitochondrial protein phosphorylation by soluble adenylyl cyclase ameliorates cytochrome oxidase defects. *EMBO Molecular Medicine*. 2009;1(8-9):392-406. doi:10.1002/emmm.200900046.
158. Acin-Perez R, Salazar E, Kamenetsky M, Buck J, Levin LR, Manfredi G. Cyclic AMP produced inside mitochondria regulates oxidative phosphorylation. *Cell metabolism*. 2009;9(3):265-276. doi:10.1016/j.cmet.2009.01.012.
159. Santarpino, Giuseppe & Caroleo, Santo & Onorati, Francesco & Dimastromatteo, G & Abdalla, Karim & Amantea, B & Santangelo, Ermenegildo & Gulletta, Elio & Renzulli, Attilio. (2009). Inflammatory response to cardiopulmonary bypass with enoximone or steroids in patients undergoing myocardial revascularization: A preliminary report study. *International journal of clinical pharmacology and therapeutics*. 47. 78-88. 10.5414/CP47078
160. Movsesian, Matthew & Stehlik, Josef & Vandeput, Fabrice & R Bristow, Michael. (2009). Phosphodiesterase inhibition in heart failure. *Heart failure reviews*. 14. 255-63. 10.1007/s10741-008-9130-x

6. Anhang

6.1. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: ROS-Entstehung unter Ischämie	13
Abbildung 2: Inotropischer Wirkmechanismus von Enoximon	23
Abbildung 3: Aufbauskinizze der Langendorffanlage	30
Abbildung 4: Clark-Type-Elektrode	34
Abbildung 5: LVPsys (mmHg) im Reperfuionsverlauf	40
Abbildung 6: LVdp/dtmax (mHg/s) im Reperfuionsverlauf	40
Abbildung 7: hFABP-Freisetzung bei Versuchsbeginn	42
Abbildung 8: hFABP-Freisetzung nach 30min Reperfusion	42
Abbildung 9: Troponin T Konzentration im Perfusionsverlauf	43
Abbildung 10: GOT Konzentration im Perfusionsverlauf.	43
Abbildung 11: Schwellung der IFM unter 50 μM Ca^{2+} ohne Pyruvat.....	46
Abbildung 12: Schwellung der IFM unter 50 μM Ca^{2+} und Pyruvat.....	46
Abbildung 13: Schwellung der SSM unter 50 μM Ca^{2+} ohne Pyruvat.....	47
Abbildung 14: Schwellung der SSM unter 50 μM Ca^{2+} und Pyruvat.....	47
Abbildung 15: O_2 -Verbrauch der IFM im Komplex I-V.....	50
Abbildung 16: O_2 -Verbrauch der IFM im Komplex II-IV/V.....	50
Abbildung 17: O_2 -Verbrauch der SSM im Komplex I-V	51
Abbildung 18: O_2 -Verbrauch der SSM im Komplex II-IV-V	51

6.2. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zustände der Atmungskettengeschwindigkeit	8
Tabelle 2: Therapie der AHF - Modifiziert nach ESC-Guideline 2012	19
Tabelle 3: Materialliste.....	26
Tabelle 4: Gruppeneinteilung.....	27
Tabelle 5: Messverlauf	30
Tabelle 6: Spektrophotometrische Komplex-Bestimmung	37
Tabelle 7: :Ergebnisse der Enzym- und Markermessung.....	44

6.3. Abkürzungsverzeichnis

ACE-Hemmer	Angiotensin Converting Enzym-Hemmer
Acetyl-CoA	Acetylierte Form des Coenzym A
ADCHF	acute decompensated chronic heart failure (akut dekompensierte chronische Herzinsuffizienz)
ADP	Adenosindiphosphat
AHF	acute heart failure (Akute Herzinsuffizienz)
ATP	Adenosintriphosphat
AUC	Area under the curve (Fläche unter der Kurve)
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CCCP	Carbonylcyanid m-chlorophenylhydrazon
cGMP	zyklisches Guanosin-Monophosphat
CK-MB	Kreatin-Kinase Myokard-Typ
CS	Citratsynthase
DTNB	5,5'-Dithiobis(2-Nitrobenzoesäure)
DUQH ₂	Decylubichinon
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESC	European Society of Cardiology (Europäische Gesellschaft für Kardiologie)
ETC	electron transport chain (Atmungskette)
et al.	und andere
G3P	Glycerinaldehyd-3-phosphat
HZV	Herzzeitvolumen
IFM	interfibrilläre Mitochondrien
IR	Ischämie-Reperfusion
KHK	koronare Herzkrankheit
KI	Konfidenzintervall
LDH	Lactatdehydrogenase

MAD	mean arterial pressure (mittleren arteriellen Druck)
MOMP	Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization
mPTP	mitochondrial permeability transition pores
NaCl	isotone Kochsalzlösung
NSTEMI	non-ST-segment elevation myocardial infarction (Nicht-ST-Hebungsinfarkt)
PCI	perkutane Koronar-Intervention
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PKA	Proteinkinase A
P/O-Ration	ADP/Sauerstoff-Verhältnis
RNS	reactive nitrogen species (reaktive Stickstoffspezien)
ROS	reactive oxygen species (Reaktive Sauerstoffspezien)
SD	standard deviation (Standartabweichung)
SIRS	Systemic inflammatory response syndrome (Systemisches Entzündungssyndrom)
SR	sarkoplasmatisches Retikulum
SSM	subsarkolemmale Mitochondrien
TropT	Troponin T high sensitive

Danke an meine Familie die immer Rückhalt und stete Motivation war,
an meinen Doktorvater für dessen gute Betreuung der vorliegenden Arbeit,
an Dominik Klump für seinen Verdienst um die deutsche Sprache sowie der
Julius Maximilian Universität Würzburg für ihre fundierte
medizinische Ausbildung.

Curriculum Vitae

1998-2007	Kepler-Gymnasium Ulm
25.11.2015	Abschluss Medizinstudium am UKW
01.05.16 - 31.10.16	Innere Medizin am Anregiomed Klinikum Rothenburg
01.11.16 - 30.06.18	Mainbogenpraxis Sennfeld (Allgemeinmedizin)
seit 01.07.18	Innere Medizin am Juliuspital Würzburg

Würzburg, den 27.10.2019

Christian Moch