

Aus dem
Institut für Physiologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Antiinflammatorische Effekte des Na⁺/H⁺-Antiport-Inhibitors
Cariporide**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Andrea Matranga

aus Palermo

Gutachter: 1. Prof. Dr.med. H. Habazettl
2. Prof. Dr.med. P. Conzen
3. Prof. Dr.med. Dr. h.c.H. Kuppe

Datum der Promotion: 24.02.2012

INHALTSVERZEICHNIS

I. EINLEITUNG	4
1.1 Myokardischämie und Inflammation.....	4
1.1.1 Reperfusionsschaden.....	4
1.1.2 Bildung freier Sauerstoffradikale.....	5
1.1.2.1 Wichtige Sauerstoffradikalquellen mit Bedeutung für die Herzschädigung.....	6
1.1.2.2 Leukozytenaktivierung.....	6
1.1.2.3 Antioxidative Schutzmechanismen	7
1.1.3 Wie kommt es zum intrazellulären Kalziumüberschuss?.....	7
1.1.3.1 Natrium-Protonen Austauscher.....	7
1.1.3.2 Natrium-Protonen-Austauscher während Ischämie und Reperfusion.....	8
1.1.3.3 Hemmung des Kalziumüberschusses als mögliches Therapietarget.....	9
1.1.4 Die inflammatorische Antwort bei Reperfusion.....	11
1.1.4.1 Die Adhäsionskaskade nach Ischämie-/ Reperfusionsschaden.....	12
1.1.5 Die Adhäsionskaskade.....	13
1.1.5.1 Annäherung („Tethering“) und „Rollen („Rolling“)......	14
1.1.5.2 Aktivierung und feste Bindung der Leukozyten an das Endothel	14
1.1.5.3 Transmigration der Leukozyten durch die Gefäßwand.....	16
1.1.5.4 Familien von Adhäsionsmolekülen.....	16
1.1.6 Hemmung der Adhäsionskaskade als mögliches Therapietarget.....	18
1.2 Antiinflammatorische Wirkung von Cariporide.....	18
1.3 Fragestellung.....	20
II. MATERIAL UND METHODEN	21
2.1 Reagenzien und Versuchsgeräte.....	21
2.1.1 Reagenzien.....	21
2.1.2 Versuchsgeräte.....	21
2.2 HUVECs.....	22
2.2.1 Isolierung und Kultivierung von HUVECs.....	22
2.3 Versuch I: Nachweis von ICAM-1 / E-Selektin mit u. ohne Cariporide unter Stimulation...23	
2.3.1 Vorbereitung einer Wellplatte.....	23
2.3.1.1 Isolierung von HUVECs aus einer konfluenten Zellkultur.....	23
2.3.2 Herstellung der Reagenzien.....	24

2.3.2.1	Herstellung einer Cariporid-Stammlösung.....	24
2.3.2.2	Tumornekrosefaktor-alpha.....	24
2.3.3	Überführung der HUVECs in Mess-Röhrchen.....	24
2.3.3.1	Aufteilung der Mess-Röhrchen.....	25
2.3.3.2	Applikation von Cariporide.....	25
2.3.3.3	Applikation von TNF-alpha.....	25
2.3.3.4	Applikation der Fluoreszenzantikörper und Maus IgG PE.....	25
2.3.3.5	Vorbereitung zur FACS-Analyse.....	26
2.4	Versuch II: Nachweis von intrazellulären Kalzium mittels Fluo-4 bei HUVECs.....	26
2.4.1	Vorbereitung.....	26
2.4.2	Herstellung der Reagenzien.....	26
2.4.2.1	Herstellung einer 0,2 mM Fluo-4 Lösung.....	26
2.4.2.2	Herstellung einer EDTA-Lösung.....	26
2.4.3	Inkubation mit Fluo-4.....	27
2.4.4	Überführung der HUVECs in Mess-Röhrchen.....	27
2.4.5	Aufteilung der FACS-Röhrchen.....	27
2.4.6	Inkubation mit TNF-alpha.....	28
2.5	Auswertung am FACScan (Durchflusszytometrie).....	28
2.5.1	Aufbau und Funktion eines Durchflusszytometers.....	29
2.5.2	Flüssigkeitssystem.....	29
2.5.3	Messtechnik.....	29
2.5.4	Datenauswertung.....	30
2.6	Statistische Auswertung.....	31
III.	ERGEBNISSE.....	32
3.1	ICAM-1 Expression.....	33
3.1.1	ICAM-1 Expression ohne Cariporide.....	33
3.1.2	ICAM-1 Expression mit Cariporide.....	36
3.1.3	Vergleich: ICAM-1-Expression mit und ohne Cariporide.....	38
3.2	E-Selektin- Expression.....	39
3.2.1	E-Selektin Expression ohne Cariporide.....	39
3.2.2	E-Selektin Expression mit Cariporide	42
3.3.3	Vergleich: E-Selektin-Expression mit und ohne Cariporide.....	44
3.3	Nachweis von intrazellulärem Kalzium durch Fluo-4 im Medium ohne Ca ²⁺ /Mg ²⁺	45

3.3.1	Nachweis von intrazellulären Kalzium durch Fluo-4 im Medium ohne Ca ²⁺ /Mg ²⁺ ohne Cariporide.....	45
3.3.2	Nachweis von intrazellulärem Kalzium durch Fluo-4 im Medium ohne Ca ²⁺ /Mg ²⁺ mit Cariporide.....	47
3.3.3	Vergleich: Fluo-4-Markierung mit und ohne Cariporide.....	49
3.4	Nachweis von intrazellulärem Kalzium durch Fluo-4 im Medium mit Ca ²⁺ /Mg ²⁺	50
3.4.1	Nachweis von intrazellulärem Kalzium durch Fluo-4 im Medium mit Ca ²⁺ /Mg ²⁺ ohne Cariporide.....	50
3.4.2	Nachweis von intrazellulärem Kalzium durch Fluo-4 im Medium mit Ca ²⁺ /Mg ²⁺ mit Cariporide.....	52
3.4.3	Vergleich: Fluo-4-Markierung mit und ohne Cariporide mit Ca ²⁺ /Mg ²⁺	53
IV. DISKUSSION.....		54
4.1	Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse.....	54
4.2	Ischämie und Reperfusion.....	54
4.2.1	Der akute und subakute Reperfusionsschaden bei Ischämie/ Reperfusion.....	54
4.2.2	TNF-alpha als Schlüsselmediator der postischämischen Entzündungsreaktion...56	
4.2.3	Cariporide als mögliches Therapeutikum zur Supprimierung des subakuten Reperfusionsschadens.....	58
4.2.4	Mögliche Mechanismen der Wirkung von Cariporide.....	60
4.3	Klinische Bedeutung der Ergebnisse.....	62
V. ZUSAMMENFASSUNG.....		64
VI. ABKÜRZUNGEN.....		67
VII. LITERATUR.....		69
VIII. DANKSAGUNG.....		79
IX. LEBENSLAUF.....		80

I. EINLEITUNG

1.1 Myokardischämie und Inflammation

Der Myokardinfarkt ist eine der häufigsten Todesursachen in den Industrieländern. Er kann jeden treffen. Das Risiko lässt sich jedoch durch Meiden von Risikofaktoren, wie Rauchen, Übergewicht und optimaler Einstellung von Diabetes mellitus und arterieller Hypertonie minimieren. Während der Myokardischämie ist das Gewebe mit Sauerstoff und Substraten unterversorgt. Kurze Zeit nach einer Koronarokklusion resultiert durch die Hypoxie eine Umschaltung von aerobem auf anaeroben Stoffwechsel. Energiereiche Phosphate sowie Glycogenreserven werden zur Energiegewinnung abgebaut. Infolge kommt es zur intrazellulären Störung ATP-abhängiger Zellsysteme und aktiver Transportvorgänge. Es resultieren Ionenverschiebungen und Störungen des osmotischen Gleichgewichts, die zu einer Zellschwellung führen.

Durch Veränderungen des Aktionspotentials sieht man Abweichungen im EKG, wie Hebungen oder Senkungen der ST-Strecke (Cummins und Hazinski, 2000). Durch den anaeroben Stoffwechsel kommt es zu Laktatproduktion, Gewebsazidose und hieraus zu Störungen der Membranintegrität (Jennings und Reimer, 1991). In diesem Zustand können die bisher eingetretenen Schädigungen noch umkehrbar sein. Kommt es jedoch durch die gestörte Membranintegrität zu starkem intrazellulären Ionen- und Flüssigkeitseinstrom kann die Zelle durch zu starkes Anschwellen rupturieren. Tritt dies ein, kommt es zu einer irreversiblen Zellschädigung.

Die irreversiblen Schädigungen sind durch den Austritt von Enzymen bzw. Strukturproteinen aus dem Zytosol, wie z.B. Kreatinkinase und Laktatdehydrogenase bzw. Troponin gekennzeichnet (Walter et al., 1999).

Die Folgen der Ischämie hängen unter anderem von ihrer Dauer ab. Durch rechtzeitig einsetzende Reperfusion des ischämischen Areals kommt es in der Regel zu einer Erholung der reversibel geschädigten Zellen. Der nekrotische Bereich beschränkt sich auf die irreversibel geschädigten Areale.

1.1.1 Reperfusionsschaden

Die frühzeitige Reperfusion ist für das Überleben des ischämischen Myokards essentiell. Durch die Reperfusion werden Zellprodukte, die sich während des Gefäßverschlusses im azidotischen Milieu anhäufen konnten (z.B. Laktat), ausgewaschen. Durch Reperfusion des minderversorgten Herzmuskelbereichs kommt es zur Reoxygenation, Substratzufuhr, Normalisierung des Gewebs-

pH und der Osmolarität. Zum anderen geht dieser Prozess auch mit gewebeschädigenden Effekten einher. Black bezeichnet den Reperfusionsschaden als Syndrom verschiedener negativer pathologischer Vorgänge, welche Gefäßschädigung, Arrhythmien, myokardiales stunning (reversible postischämische Dysfunktion des Herzens bei wiederhergestellter Durchblutung) und Ausbreitung des irreversiblen Gewebeschadens beinhalten (Black, 2000).

Zu den hierbei involvierten Mechanismen zählen:

- die Bildung freier Sauerstoffradikale,
- die Ausbildung eines intrazellulären Kalziumüberschusses,
- sowie eine inflammatorische Antwort im Sinne einer Komplementaktivierung (Hill, 1998).

Es kann nach Reperfusionbeginn zu negativen Effekten wie Hyperkontraktibilität, Arrhythmien und Nekrosen kommen (Black, 2000).

In Anbetracht der negativen Auswirkungen, die eine Reperfusionstherapie mit sich bringt, sind Therapien zur Begrenzung des Reperfusionsschadens zusätzlich als Begleittherapie zur Revaskularisierungsmaßnahme wichtig.

1.1.2 Bildung freier Sauerstoffradikale

Sauerstoffradikale entstehen bei der Reduktion von Sauerstoff. Wozu braucht man Sauerstoffradikale? Sauerstoffradikale sind für physiologische Reaktionen (Fremdstoffmetabolisierung, Phagozytose, Synthese biogener Amine u.a.) wichtig. Aber sie können auch durch unspezifische Reaktionen zur Zellschädigung führen. Im Organismus gehen Sauerstoffradikale als Nebenprodukt mitochondrialen Zellatmung aber auch in Entzündungszellen durch das Enzym NADPH-Oxidase hervor.

Zu den reaktiven Sauerstoffspezies (engl. reactive oxygen species, ROS), gehören freie Radikale, wie das hochreaktive Hydroxyl-Radikal $\text{OH}\cdot$, das Peroxylradikal $\text{ROO}\cdot$ und das Alkoxyradikal $\text{RO}\cdot$ von Lipiden. Auf der anderen Seite gibt es molekulare Oxidantien wie Wasserstoffperoxid H_2O_2 , Hydroperoxid ROOH , Ozon O_3 und das Hypochlorit-Anion OCl^- , wie auch angeregte Sauerstoffmoleküle (Singulett-Sauerstoff), (Schulz, 2005).

1.1.2.1 Wichtige Sauerstoffradikalquellen mit Bedeutung für die Herzschädigung:

- **Mitochondriale Atmungskette**

In Mitochondrien entsteht als Zwischenprodukt Superoxid in der Atmungskette, welches nach Ischämie und anschließender Reperfusion in myokardialen Mitochondrien in erhöhter Konzentration nachgewiesen werden konnte (Flaherty und Weisfeldt, 1988).

- **Xanthinoxidase**

Xanthin und Hypoxanthin sind Abbauprodukte des Purinmetabolismus. Durch Xanthinoxidoreduktase (XOD) werden sie zu Harnsäure abgebaut. Normalerweise liegt Xanthinoxidoreduktase in der Dehydrogenase-Form (XDH) vor. Unter Ischämie geht das Enzym in die Oxidase-Form über. O₂ ist dabei Elektronenakzeptor, wodurch mittels XOD Superoxid gebildet wird. Während der Ischämie kommt es zur Akkumulation von AMP, Hypoxanthin und Xanthin. Setzt die Perfusion ein, verfügt die XOD damit über ausreichend Substrate zur Superoxidbildung. Untersuchungen von Jarasch (Jarasch et al., 1986) zeigen, dass humane Endothelzellen Superoxidradikale durch XOD bilden können. Die vorliegende Arbeit basiert auf Eigenschaften humaner Endothelzellen.

1.1.2.2 Leukozytenaktivierung:

Phagozyten werden bei einer Entzündungsreaktion durch abgestorbene Zellen angezogen. Bei der Phagozytose wird ein hoher Sauerstoffverbrauch beobachtet, welchen man als „respiratory burst“ bezeichnet. Man konnte zeigen, dass aktivierte Makrophagen ca. 70 % des intrazellulär aufgenommenen Sauerstoffs zu Radikalspezies metabolisieren, wodurch die Inflammation begünstigt wird (Scarpa et al., 1984). Durch Proteinkinase C vermittelt, wird eine membranständige NADPH-Oxidase aktiviert, die den Transfer eines Elektrons vom zytosolischen NADPH auf extrazellulären Sauerstoff unter Bildung von reduziertem Superoxid katalysiert. Ausgehend von Superoxid werden durch Dismutation, Fenton-Reaktion und Hydrogenoxidase-Reaktion H₂O₂, °OH und -OCl gebildet.

Die Schädigung der Zellintegrität setzt unabhängig von der Art des Mechanismus chemotaktisch wirksame wie auch direkt im Zellverband interzellulär-kommunikative Botenstoffe frei. Fast alle Entzündungsmediatoren und Lymphokine, z.B. Vasopressin, Angiotensin II, Katecholamine, Thrombin, ADP, Endotoxine, C3b und Antigen-Antikörper-Reaktionen, sind zu einer Phospholipasenaktivierung fähig. Zentrales Ereignis ist die Freisetzung polyungesättigter

Fettsäuren (PUFA) aus Membranphospholipiden. PUFA sind Substrate für Oxidationskaskaden, deren Enzyme die mikrosomale Cyclooxygenase und die überwiegend zytoplasmatische Lipooxygenase sind. Über beide Wege werden Fettsäurehydroperoxide (LOOH) gebildet, die enzymatisch zu Prostaglandinen und Leukotrienen metabolisiert werden. Im Rahmen des Prostaglandinstoffwechsels wird zusätzlich Singulett-Sauerstoff gebildet (Schulz, 2005).

1.1.2.3 Antioxidative Schutzmechanismen

Protektiver Einfluss auf den Sauerstoffradikal-Stoffwechsel kann auf drei Ebenen vorgenommen werden:

1. durch Verhinderung der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies,
2. durch Verhinderung ihrer Wirkung und
3. durch Beseitigung und Reparatur der Schäden.

1.1.3 Wie kommt es zum intrazellulären Kalziumüberschuss?

Neben der Bildung freier Sauerstoffradikale ist am Reperfusionsschadens die Bildung eines intrazellulären Kalziumüberschusses beteiligt. Dabei ist der Natrium-Protonen-Austauscher wesentlich involviert.

1.1.3.1 Natrium-Protonen-Austauscher

Die Regulation des intrazellulären pH im kardiovaskulären System ist ein wesentlicher Prozess der zellulären Homöostase. An dieser pH-Kontrolle ist ein Transporter in der Myokardzellmembran wesentlich beteiligt, nämlich der Natrium-Protonen-Austauscher (NHE).

Sardet und Pouyssegur gelang es 1989, die Struktur und die Expression des Austauschers eingehend zu untersuchen und dieses Molekül zu klonieren (Sardet et al., 1989).

Bis heute wurden 8 Isotypen von Na^+/H^+ -Austauschern identifiziert, welche die Bezeichnung NHE-1 bis NHE-8 erhalten. Alle, bis auf die Isotypen NHE 6 und 8, welche sich intrazellulär befinden, sind an der sarkoplasmatischen Membran lokalisiert. Dabei liegt der NHE-1 – Subtyp in dominanter Form an der sarkoplasmatischen Membran der Kardiomyozyten vor (Petrecca et al., 1999). Dieser ist ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von etwa 110 kDa (Karmazyn et al., 2001).

Der Na^+/H^+ -Austauscher stellt ein bidirektionales Membranprotein dar, welches Wasserstoff gegen Natrium austauscht. Die treibende Kraft liefert der transmembranöse Natrium-Gradient.

Neben seiner Hauptaufgabe in der pH-Regulation der Zelle spielt der Austauscher auch eine Rolle für den Natriumeinstrom und wirkt aktiv an der osmotischen Regulation des Zellvolumens mit. Hierzu werden Protonen im Austausch gegen Natriumionen im Verhältnis 1:1 herausgeschleust, womit der Prozess elektroneutral gehalten wird (Aronson, 1985). Die Aktivierung des Austauschers erfolgt nicht nur pH-bedingt, sondern auch über parakrine und autokrine Faktoren wie Endothelin-1 (Khandoudi et al., 1994), Angiotensin II, adrenerge Agonisten (Walter, et al., 1999), Thrombin (Yasutake et al., 1996) und Wachstumsfaktoren (Wakabayashi et al., 1992).

Während die Aktivität des Austauschers unter physiologischen pH-Bedingungen (7,1-7,3) eher unbedeutend ist, kommt es zu einer sehr schnellen Aktivierung bei fallendem intrazellulärem pH-Wert (Karmazyn, et al., 2001). Seine maximale Aktivität erreicht der Austauscher bei einem intrazellulären pH von 6,5 (Fliegel, 2001).

Weiter spielt er, wie im nächsten Abschnitt noch beschrieben wird, bei der molekularen Pathogenese des Ischämie/Reperfusionsschadens eine entscheidende Rolle, indem er bei der Reperfusion den intrazellulären Natriumgehalt ansteigen, den Protonengehalt durch den Austausch senken, und in Folge durch Aktivierung des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers den intrazellulären Kalziumgehalt ansteigen lässt (Linz und Busch, 2003).

1.1.3.2 Natrium-Protonen-Austauscher während Ischämie und Reperfusion

Während der Ischämie kommt es sowohl intrazellulär als auch extrazellulär zu einem pH Abfall. Die intrazelluläre Azidose ist eine Folge des anaeroben Metabolismus und des ATP-Katabolismus während der Ischämie. Der niedrige intrazelluläre pH führt konsekutiv zu einer schnellen Aktivierung des NHE, welcher daraufhin H^+ -Ionen aus der Zelle heraus- und dafür Na^+ -Ionen in die Zelle hineinschleust. Neben diesem Mechanismus, wird der Na^+/H^+ -Austauscher noch von anderen Faktoren, wie Endothelin-1, Angiotensin II und Thrombin aktiviert (Pisarenko, 2004). Zusätzlich werden aber andere Mechanismen wie permanent aktive Natriumkanäle für den Na^+ -Anstieg intrazellulär diskutiert (Haigney et al., 1994). Dies führt nun im Folgenden zu einer Akkumulation von intrazellulärem Natrium.

Die Depolarisation der Zellmembranen bewirkt einen massiven Kalziumeinstrom aus dem Extrazellulärraum. Intrazellulär wird durch Aktivierung des Ryanodin-Rezeptors zusätzlich Kalzium aus dem sarkoplasmatischen Retikulum freigesetzt (Linz und Busch, 2003).

Diese erhöhte intrazelluläre Kalziumkonzentration würde nun eigentlich zu einer Stimulation der Kontraktion der Muskelfasern führen. Da die Kontraktion aber ein ATP-abhängiger Vorgang ist, ist die Gefahr der Schädigung durch Hyperkontraktur wegen des Mangels an verfügbarer Energie Grenzen begrenzt (Moens et al., 2005). Die erhöhte intrazelluläre Kalziumkonzentration bleibt während der gesamten Ischämie bestehen, da für die Wiederaufnahme des Kalziums in das sarkoplasmatische Retikulum ebenfalls die nötige Energie fehlt (Ambrosio et al., 1987, Opie, 1991).

Mit Beginn der Reperfusion wird dem Myokard wieder Sauerstoff zugeführt, sodass ATP neugebildet werden kann. Die extrazellulär angesammelten Wasserstoff-Ionen werden durch die Reperfusion schnell ausgewaschen. Der Natrium-Protonen-Antiport eliminiert Wasserstoff-Ionen im Austausch gegen Natrium-Ionen. Die dadurch intrazellulär immer mehr anwachsende Natriumkonzentration wird sowohl über die Natrium-Kalium-ATPase, als auch mit Hilfe des Natrium-Kalzium-Antiports eliminiert. Da neue Kalziumionen extrazellulär durch die Reperfusion permanent zur Verfügung stehen, kommt es zu einem weiteren massiven Kalziumeinstrom in die Muskelzelle. Mit Hilfe des neugebildeten ATPs kann zwar wieder Kalzium in das sarkoplasmatische Retikulum aufgenommen werden, doch benötigt die Reaktivierung dieser Enzymsysteme einige Zeit, sodass die Elimination des Kalziums zu langsam regeneriert, um das überschüssige Kalzium ausreichend schnell zu eliminieren. Da aber für die Aktivierung des myokardialen Kontraktionsapparates ausreichend Energie zur Verfügung steht, führt diese intrazelluläre Kalziumbelastung typischerweise zu Beginn der Reperfusion zu Hyperkontraktur der Kardiomyozyten. Der daraus resultierende Anstieg der diastolischen Ruhespannung mit einem verringerten Vermögen zur Relaxation führt zu einem entsprechend gesteigerten Energiebedarf der Kardiomyozyten (Kihara und Morgan, 1991, Opie, 1991).

Die erhöhte intrazelluläre Kalziumkonzentration vermittelt direkten Zelltod, indem sie zum einen Proteasen aktiviert und zum anderen die Zellen hyperkontrahieren und die Membranen rupturieren lässt.

1.1.3.3 Hemmung des Kalziumüberschusses als mögliches Therapietarget

Wie bereits erwähnt wird der myokardiale Na^+/H^+ -Austauscher NHE-1 bei der Reperfusion aktiviert.

Durch Inhibition des Na^+/H^+ -Austauscher durch einen selektiven NHE-Inhibitoren kann der Na^+ - und in Folge der Ca^{2+} -Einstrom (siehe Abb.1) vermindert werden (Pisarenko, 2004). Die

intrazelluläre Elektrolytverschiebung betreffend, liegen mehrere in vitro Experimente vor, welche eine geringere Kalziumkonzentration in ischämisch stimulierten Zellen nachweisen, welche während oder vor der Reperfusion mit einem Antagonisten des Na^+/H^+ -Austauschers (Cariporide) behandelt wurden (Stromer et al., 2000).

Arrhythmien, Hyperkontraktilität und Nekrosen mit einhergehendem Funktionsverlust des ischämischen Gewebes konnten dadurch merklich verringert werden. Zusätzlich gibt es weitere Hinweise, dass eine NHE1-Inhibition auch andere positive Effekte im postinfarzierten Myokard in Bezug auf Hypertrophieentwicklung, den Remodelling-Prozess und eine konsekutive Herzinsuffizienz bietet (Karmazyn, et al., 2001). Mehrere Studien, wie sie in der Diskussion noch erläutert werden, konnten die Hemmung des Anstiegs der intrazellulären Kalziumkonzentration durch einen Na^+/H^+ -Austauscher belegen:

So wurde in Ratten das Myokard einer 30-minütigen Ischämie ausgesetzt, welche einer 30-minütigen Reperfusion folgte. Ein Teil der Ratten, die einer Ischämie ausgesetzt wurden, erhielt in der Phase der Reperfusion Cariporide. Der Versuch konnte dabei eine intrazellulär verminderte Kalziumkonzentration in Kardiomyozyten im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigen (Stromer, et al., 2000).

Die zuerst entdeckten Hemmstoffe des Na^+/H^+ -Austauschers gehören zur Familie der Amiloride. Diese sind seit 1971 bekannt als potente Hemmer des epithelialen Natriumkanals (ENaC) im distalen Tubulus der Niere und werden als Kalium-sparende Diuretika eingesetzt (Kleyman und Cragoe, 1988). Da diese Inhibitoren jedoch nicht nur NHE1 hemmen, haben sie auch unspezifische Wirkungen (Mentzer et al., 2003). Dies hat zur Entwicklung neuer Benzoylguanidin-Verbindungen geführt, die spezifisch gegen NHE1 gerichtet sind.

Die erste solche Verbindung war 3-Methylsulfonyl-4-piperidinobenzoyl-guanidin (Hoe 694), worauf 4-Isopropyl-3-methylsulphonylbenzoylguanidin methansulphonat (Hoe642, Cariporide) folgte (Karmazyn, et al., 2001). Diese Verbindungen sind in therapeutischen Dosierungen ausschließlich gegen die NHE1-Isoform gerichtet und haben sehr geringe bis keine Effekte auf andere Isoformen (Mentzer, et al., 2003).

Cariporide (Hoe 642: 4-isopropyl-3-methylsulfonyl-benzoyl-guanidine-methanesulfonat; Hoechst Marion Roussel, Frankfurt, Germany) ist ein Benzoylguanidin mit einem Molekulargewicht von 379,46 Da, und stellt einen selektiven Inhibitor des Na^+/H^+ -Austauschers dar. Seine Halbwertszeit beträgt 3,5 Stunden.

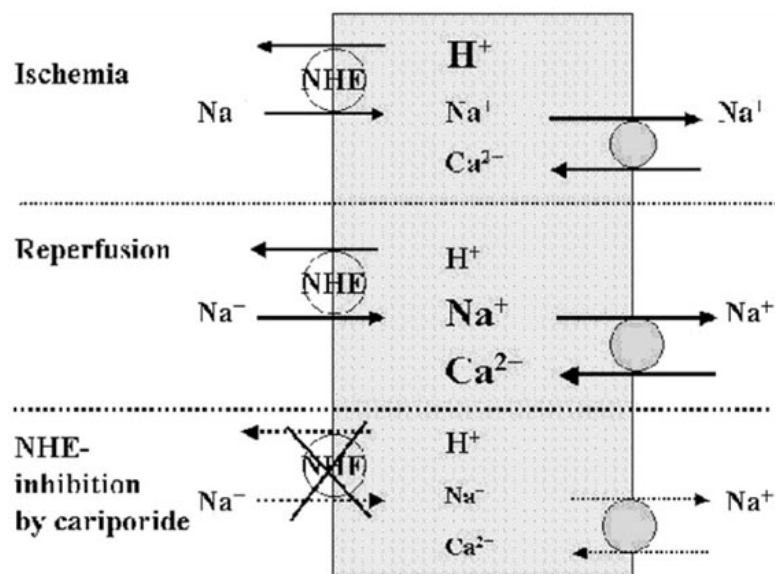


Abb.1: Ionen-Austausch während Ischämie und Reperfusion mit Einflussnahme des NHE-Austauschers und dessen Inhibition durch Cariporide (Théroux et al., 2000)

1.1.4 Die inflammatorische Antwort bei Reperfusion

Zum Reperfusionsschaden trägt neben den oben beschriebenen die Kardiomyozyten direkt betreffenden Mechanismen, aber auch eine ausgeprägte inflammatorische Reaktion bei.

Ursache für dieses Phänomene sind zahlreiche Mediatoren, wie z.B. Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α), Interleukine (z.B. IL-6), Plättchen aktivierender Faktor (PAF) und freie Sauerstoffradikale, die während Ischämie und Reperfusion in dem betroffenen Areal gebildet bzw. eingeschwemmt werden.

Den von den Sauerstoffradikalen und TNF- α aktivierten Makrophagen kommt dabei eine zentrale Rolle im weiteren Entzündungsgeschehen zu. Sie entfalten eine starke proinflammatorische Wirkung, welche die Adhäsionskaskade aktiviert (Kupatt et al., 1999).

Die Freisetzung freier Radikale stellt, wie erwähnt, einen wichtigen Pathomechanismus des Reperfusionsschadens dar und wird zusammen mit der intrazellulären Kalziumüberladung vor allem für das „myocardial stunning“ und für Reperfusionsarrhythmien verantwortlich gemacht. In vivo Untersuchungen deuten auf Granulozyten als Hauptquelle von freien Radikalen hin. Weiterhin wird Granulozyten eine Rolle bei der Entstehung des „no-reflow Phänomens“ zugeschrieben. Der hier zugrunde liegende Pathomechanismus beinhaltet zum einen eine

Okklusion der Kapillaren durch adhärierende Granulozyten (sog. „capillary plugging“), zum anderem verursachen die von PMN gebildeten freien Radikale eine endotheliale Dysfunktion, die durch eine verminderte Freisetzung von EDRF (= endothelium-derived relaxing factor, gleichbedeutend mit Stickstoffmonoxid = NO) charakterisiert ist. Eine verminderte NO-Produktion führt wiederum zu einer Hochregulation und Akitvierung endothelialer Adhäsionsmoleküle wie P-Selektin, E-Selektin oder „intercellular adhesion molecule 1 oder 2“ (ICAM 1, 2) was die leukozytäre Adhäsion noch verstärkt (Frank, 2006).

1.1.4.1 Die Adhäsionskaskade nach Ischämie-/ Reperfusionsschaden

Eine Gewebsnekrose, wie sie bei einem Myokardinfarkt entsteht, zieht, wie bereits erwähnt, eine Komplementaktivierung mit Aktivierung der Zytokinkaskade nach sich, sodass es in Folge einer myokardialen Ischämie nach Wiederherstellung der Gefäßdurchblutung (Reperfusion) zu einer pathologisch Entzündungsreaktion kommen kann.

Die Gewebeschädigung nach Ischämie/Reperfusion im Myokard führt zu Aktivierung der Adhäsionskaskade, bei der die aktivierten Endothelzellen Kontakt zu den im Blut zirkulierenden Leukozyten aufnehmen, und eine Leukozytenemigration induzieren (Frangogiannis, 2006, Kupatt et al., 2000, Ren et al., 2003).

Beim Auftreten lokaler Entzündungen, findet eine Extravasation von Leukozyten (PMNs = Polymorphonuclear Neutrophils) in das betroffene Gewebe in den postkapillaren Venolen statt.

Die Aktivierung sowohl von Leukozyten als auch von Endothelzellen spielt dabei eine entscheidende Rolle in der Entwicklung des Ischämie/Reperfusionsschadens.

Bevor Leukozyten ins Gewebe eindringen können, müssen einige Schritte durchlaufen werden: Leukozytenmargination zur Gefäßwand, dann Kontakt und Interaktion zwischen Leukozyten und Endothelzellen, langsames Rollen der Leukozyten entlang der Gefäßwand, Adhäsion und Emigration. Vorraussetzung für die Extravasation der Leukozyten ist die rezeptorvermittelte Adhäsion an der Gefäßwand, welche entsprechend der ineinandergreifenden Mechanismen als Adhäsionskaskade bezeichnet wird.

1.1.5 Die Adhäsionskaskade

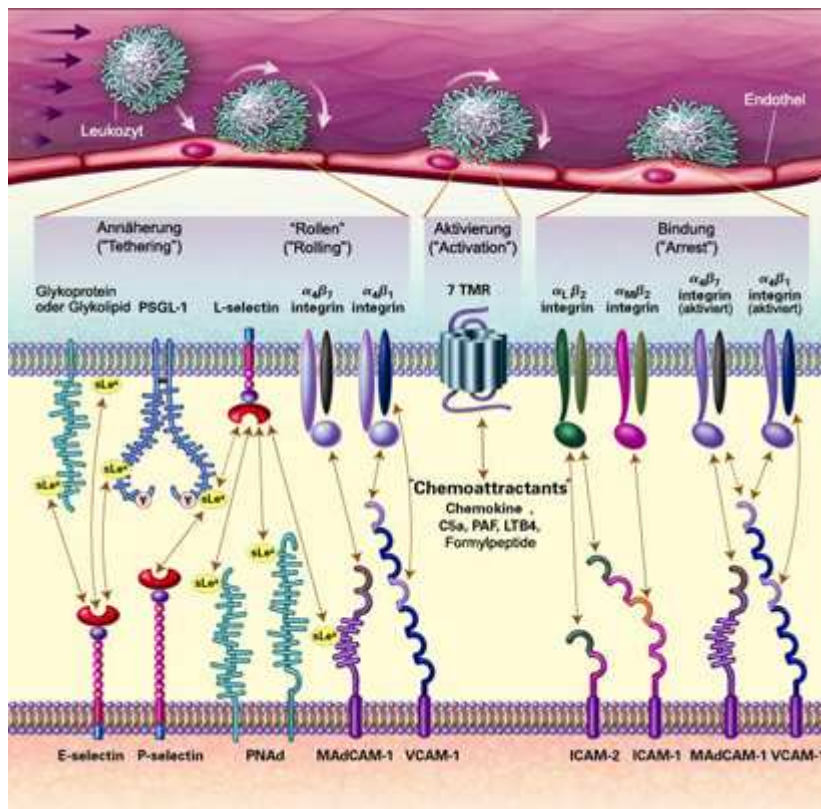


Abb.2: Wichtige Adhäsionsmoleküle und „Chemoattractants“ beim Ablauf der Adhäsionskaskade. Modifiziert übernommen aus Andrian UH, Mackay CR: T-Cell Function and Migration. N Engl J Med 2000; 343: 1020-34.

Der Kontakt zwischen Endothel und Leukozyten ist wichtig, um die zirkulierenden Abwehrzellen spezifisch und effektiv an den Ort einer Gewebeschädigung zu leiten. Dabei müssen die Endothelzellen Informationen an die passierenden Leukozyten weiterleiten und einen Erstkontakt mit diesen herstellen. Die Migration der Leukozyten aus der Blutbahn ins Gewebe erfolgt in einer Abfolge von Schritten, bei denen Adhäsionsmoleküle aus drei großen Gruppen (Selektine, Integrine und Rezeptoren aus der Immunglobulinsuperfamilie) zu unterschiedlichen Zeitpunkten an der Zelloberfläche zum Tragen kommen (von Andrian und Mackay, 2000) (Abb. 2).

1.1.5.1 Annäherung („Tethering“) und „Rollen“ („Rolling“)

Der erste Kontakt zwischen Leukozyten und aktiviertem Endothel – das sogenannte „Tethering“ - erfolgt über die Selektine (Bevilacqua und Nelson, 1993). Die Selektinbindung kann innerhalb kürzester Zeit aktiviert und wieder deaktiviert werden, was den Zell-Zell-Kontakt unter Strömungsbedingungen überhaupt erst ermöglicht und zum typischen Phänomen des „Rolling“ der Leukozyten auf der Gefäßoberfläche führt. Drei unterschiedliche Selektine sind an der Adhäsion der Leukozyten ans Endothel beteiligt. L-Selektin (CD62L) findet sich auf der Oberfläche aller Leukozyten, E-Selektin (CD62E) ist nur auf der Oberfläche aktivierter Endothelzellen vorhanden und P-Selektin (CD62P), welches sich ebenfalls auf Endothelzellen sowie in den α -Granula der Thrombozyten befindet. Der Rezeptor P-Selektin Glycoprotein Ligand 1 (PSGL-1) findet sich auf neutrophilen Granulozyten, Monozyten sowie einigen Lymphozyten und ist Ligand für P- und E-Selektin. Das Glykoprotein E-Selektin-Ligand 1 (ESL-1) dient dagegen in erster Linie neutrophilen Granulozyten zur Bindung an E-Selektin (Diamond und Springer, 1993).

1.1.5.2 Aktivierung und feste Bindung der Leukozyten an das Endothel

Nach der initialen Interaktion durch Selektine mit dem Endothel werden die Leukozyten durch „Chemoattractants“ aktiviert. Sie werden im Rahmen der Entzündungsreaktion freigesetzt (Chemokine, Komplementfaktoren, IL-6, IL-8, Platelet activating factor (PAF), freie Radikale u. a.). Hierbei spielen die Integrine an der Zelloberfläche der Leukozyten eine wichtige Rolle. Durch ihre Interaktion mit Rezeptoren aus der Immunglobulinsuperfamilie (IgSF) kommt es zur Ausbildung einer festen Bindung der Leukozyten ans Endothel („Arrest“), bei der Migration der Leukozyten aus dem Gefäßsystem und bei der Adhäsion an Strukturen der extrazellulären Matrix. Durch das „Triggering“ ändern die Integrine ihre Konformation und erhöhen so ihre Bindungsaffinität für die Bindung an die IgSF-Rezeptoren der Endothelzellen. Es kommt zur festen Bindung der Leukozyten an das Endothel. Die für die Leukozytenadhäsion und Migration ins Gewebe wichtigen Integrine gehören im Wesentlichen zu den Gruppen der β 1- und der β 2-Integrine (Smyth et al., 1993, Springer, 1990). Die Gruppe der β 1-Integrine beinhaltet Very late antigen 1 bis 6 (VLA-1 bis -6). Unter Ihnen ist insbesondere VLA-4 (α 4 β 1) einerseits beim „Arrest“ der Leukozyten, andererseits aber auch schon beim „Rolling“ involviert (Alon et al., 1995). Außerdem ist VLA-4 Ligand für Strukturen der extrazellulären Matrix wie z.B. Fibronectin und unterstützt somit auch den Austritt der Abwehrzellen ins Gewebe (Hemler und Lobb, 1995). Zu den für den „Arrest“ und die Migration wichtigen β 2-Integrinen gehören Leukocyte function-associated molecule 1 (LFA-1, CD11a/CD18, α L β 2) und Membrane attach

complex 1 (Mac-1, CD11b/CD18, α M β 2). LFA-1 findet sich auf nahezu allen Leukozyten (Lub et al., 1995), während Mac-1 hauptsächlich von neutrophilen Granulozyten und Monozyten exprimiert wird (Diamond und Springer, 1993).

Die Bindungspartner der Leukozytenintegrine bilden Rezeptoren der sogenannten Immunglobulinsuperfamilie (IgSF) auf Endothelzellen und im Gewebe. Die wichtigsten Vertreter der IgSF-Rezeptoren in Bezug auf die Adhäsionskaskade sind Intercellular cell adhesion molecule 1 bis 3 (ICAM-1, ICAM-2 und ICAM-3), Vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) und Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1). Ähnlich aufgebaut wie Immunglobuline sind außerdem der T-Zell-Rezeptor (TCR), die T-Zell-spezifischen Membranproteine CD4 und CD8 sowie der Major histocompatibility complex (MHC- I und MHC- II) (Diamond und Springer, 1993).

ICAM-1 ist ein 90-110 kDa großes transmembranäres Membranprotein. Im Rahmen der Leukozytenadhäsion bildet es den Liganden auf der Endotheloberfläche für die β 2-Integrine LFA-1 und Mac-1. Außerdem kann es Fibrinogen binden und so die Adhäsion der Abwehrzellen begünstigen (Diamond und Springer, 1993). Außer vom Endothel wird ICAM-1 auch von zahlreichen anderen Zelltypen wie zum Beispiel Epithelzellen, dendritischen Zellen, Makrophagen und anderen Zellen der hämatopoetischen Reihe exprimiert (van de Stolpe und van der Saag, 1996). Durch entzündliche Stimuli, beispielsweise bei der Gewebeschädigung nach Ischämie/ Reperfusion, wird ICAM-1 auf Endothelzellen – aber auch auf Monozyten, dendritischen Zellen und Fibroblasten - vermehrt exprimiert (van de Stolpe und van der Saag, 1996).

ICAM-2 ist ein 55 kDa großes Membranprotein, das ähnlich wie ICAM-1 von Endothelzellen, Lymphozyten und Makrophagen exprimiert wird, aber durch inflammatorische Zytokine nicht hochreguliert wird (Xu et al., 1996). Auch für diesen Rezeptor sind die Liganden LFA-1 und Mac-1. In vitro konnte gezeigt werden, dass ICAM-1 und ICAM-2 teilweise redundant wirken und nur durch Blockade beider Rezeptoren die transendotheliale Migration von neutrophilen Granulozyten signifikant gesenkt wurde. ICAM-3 hat eine Größe von 124 kDa und hat nur LFA-1 als Liganden; es wird anders als die beiden anderen ICAM-Moleküle nur von Leukozyten exprimiert - vornehmlich wenn diese bereits am Endothel adhären sind (de Fougerolles et al., 1994).

VCAM-1 ist ein 110 kDa großes Glykoprotein, dessen korrespondierende Liganden die α 4-Integrine VLA-4 (α 4 β 1) und α 4 β 7 sind. In erster Linie nutzen T-Lymphozyten sowie Monozyten/Makrophagen die VCAM-1/VLA-4-Interaktion sowohl für die feste Bindung ans

Endothel, aber auch schon während des „Rolling“ zu den Selektinen (Berlin et al., 1995) (Hoff, 2005).

1.1.5.3 Transmigration der Leukozyten durch die Gefäßwand

Für die Migration der adhärenenten Leukozyten durch die Endothelbarriere spielen Integrine und IgsF-Rezeptoren eine Rolle (Muller et al., 1993). In vitro konnte gezeigt werden, dass wiederum die oben beschriebenen Ligandenpaare ICAM-1/LFA-1 und VCAM-1/VLA-4 für den Durchtritt von Monozyten, Lymphozyten und neutrophilen Granulozyten wichtig sind (Shang und Issekutz, 1998). Neben diesen ist vor allem PECAM-1 – ein weiteres Mitglied der Ig-Superfamilie - von Bedeutung. Unter anderem ist PECAM-1 an der Zell-Zell-Verbindung der Endothelzellen beteiligt und wird deshalb bereits von allen gesunden Gefäßen stark exprimiert. Außerdem findet es sich an der Oberfläche von Neutrophilen, Monozyten und T-Lymphozyten. Bei der Transmigration interagiert vermutlich PECAM-1 auf Leukozyten mit endothelialelem PECAM-1 (Hoff, 2005). In vitro und im Tiermodell mit intravitaler Mikroskopietechnik konnte mit monoklonalen Antikörpern gegen PECAM-1 dessen Bedeutung für die Transmigration von Leukozyten gezeigt werden (Muller et al., 1993).

1.1.5.4 Familien von Adhäsionsmolekülen

Wie bereits angedeutet werden Adhäsionsmoleküle in verschiedene Familien unterteilt: u.a. die Immunglobulin-Superfamilie, die Selektine, die Integrine.

Die Immunglobulin-Superfamilie ist sehr divers und enthält mehr als 70 Oberflächenmoleküle, darunter sowohl Adhäsionsmoleküle (CD2, CD31, LFA3, ICAM-1, ICAM-3, VCAM-1, NCAM-1, MAdCAM-1), als auch Non-Adhäsionsmoleküle (Ig, TCR, CD3, CD4, CD8, MHC).

ICAM-1 (Intercellular adhesion molecule-1= CD54) ist ein Adhäsionsrezeptor der Immunglobulin-Superfamilie, der konstitutiv auf Endothelzellen und Monozyten vorkommt und bei Aktivierung der Zelle mit IL-1 oder TNF- α durch Neusynthese stark hochreguliert wird. Spitzenwerte werden auf Endothelzellen nach 24 h erreicht. Durch starke Bindung an die β 2-Integrine wird die Leukozytenadhäsion bewirkt. ICAM-1 fungiert u.a. an Schleimhautepithelzellen als Rezeptor für Rhinoviren. Auf Monozyten besitzt ICAM-1 eine zusätzliche Funktion in der Phase des Rollens (Kunkel et al., 1996).

PECAM-1 (Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 = CD31) ist ein auf Thrombozyten, Monozyten und Endothelzellen induzierbarer Adhäsionsrezeptor der Ig-Superfamilie, der bei der Bindung von Entzündungszellen am Endothel eine wichtige Rolle spielt.

Dabei scheint PECAM-1 insbesondere für die Transmigration von Leukozyten notwendig zu sein. Durch Wechselwirkung mit Integrinen bewirkt PECAM-1 die Leukozytenextravasation.

Selektine sind membrangebundene Glykoproteine, die entsprechend ihrer Ursprungszellen in L- (Leukozyten), E- (Endothel) und P-Selektin (Plättchen und Endothel) eingeteilt werden (Bendas et al., 1999).

Die Induktion der Selektinexpression durch Entzündungsmediatoren steuert Dauer und Intensität des Leukozytenrollens und steuert gleichzeitig den einzelnen Selektinen unterschiedliche Funktionen zu. Während P-Selektin mit L-Selektin in der Frühphase der Entzündung das Zellrollen vermittelt, ist E-Selektin durch seine langsamere Bindungskinetik für die Überleitung zur festen Adhäsion verantwortlich.

L-Selektin (CD62L) ist auf fast allen Leukozyten-Subtypen vorhanden. Nach Aktivierung der Leukozyten wird L-Selektin innerhalb weniger Minuten von der Zelloberfläche abgespalten. L-Selektin vermittelt auch die Extravasation von Lymphozyten an speziellen Endothelien beim Übergang ins Lymphsystem.

Integrine werden abhängig vom Zustand der Aktivierung bzw. Differenzierung unterschiedlich auf Leukozyten exprimiert.

$\beta 1$ -Integrine (VLA= very late antigen) vermitteln vorwiegend Zell-Matrix-Adhäsion. Das einzige weitere an der Adhäsion von Leukozyten und Endothel beteiligte $\beta 1$ -Integrin ist $\alpha 6\beta 1$ (VLA-6), welches wahrscheinlich an der späten Phase der Adhäsion mitwirkt.

$\beta 2$ -Integrine sind für eine Vielzahl immunologischer Vorgänge unentbehrliche Rezeptoren. Sie vermitteln im Rahmen der Entzündung die feste Anhaftung von Lymphozyten, Granulozyten und Monozyten an das Endothel. Sie vermitteln außerdem die Haftung von Effektorzellen an virusinfizierte oder Tumorzellen und somit deren Lyse.

LFA-1 (Lymphocyte function associated antigen-1 ($\alpha L\beta 2 = CD11a/CD18$)) ist ein auf allen Leukozyten konstitutiv vorkommendes Integrin, das durch Bindung seiner Liganden ICAM-1 und ICAM-2 die Leukozytenadhäsion am Endothel vermittelt.

Der CD11b/CD18 ($\alpha M\beta 2$, MAC-1) gehört zur $\beta 2$ Integrin Familie, das u.a. die Adhäsion von Neutrophilen und Monozyten an ICAM-1 und ICAM-2 (intercellular adhesion molecule 1/2) der Endothelzellen u. a. vermittelt. Es wird in Sekretgranula gespeichert und kann bei Aktivierung schnell mobilisiert und an der Zelloberfläche exprimiert werden. Das konstitutionelle Oberflächenexpressionsniveau von CD11b ist relativ niedrig (ca. 50.000 Bindungsstellen pro Zelle) und kann bei Aktivierung schnell auf das ca. 5-fache erhöht werden. Deshalb wird die Bestimmung der CD11b-Oberflächenexpression als Aktivierungsindex von Leukozyten genutzt. MAC-1 wird von Granulozyten und aktivierten Lymphozyten und Monozyten exprimiert.

Verschiedene Liganden binden an MAC-1 (Opsonin, ICAM-1 (CD54), ICAM-2 (CD102), ICAM-3 (CD50), Fibrinogen, Gerinnungsfaktor Xa). MAC-1 ist bei der Adhäsion und Transmigration durch Endothel und Epithel, bei der Aggregation von Neutrophilen, der Chemotaxis von Neutrophilen und Bindung von opsonierten Teilchen beteiligt (Lau, 2004).

1.1.6 Hemmung der Adhäsionskaskade als mögliches Therapietarget

Im Rahmen der entzündlichen Reaktion nach Ischämie und Reperfusion könnte eine kardioprotektive Wirkung durch Blockierung von endothelialen oder leukozytären Zell-Adhäsionsmolekülen erreicht werden.

Einige experimentelle Studien konnten die Wirksamkeit einer Hemmung der Adhäsionskaskade durch Cariporide in diesem Zusammenhang nachweisen:

In einer in vitro-Studie wurden glatte Gefäßmuskelzellen durch LPC zur Expression der Adhäsionskaskade stimuliert. Die ICAM-1 Expression wurde dabei mit ELISA registriert. Es konnte eine verlangsamte Adhäsion der Monozyten beobachtet werden. Bei mit Cariporide behandelten Zellen konnte eine verringerte ICAM-1 Expression und eine verringerte Adhäsion beobachtet werden (Li, et al., 2006).

Dieser Zusammenhang, der durch Cariporide verminderten ICAM-1-Expression, wurde mehrfach bestätigt, unter anderem durch eine weitere in-vitro-Studie, bei der eine verminderte Zelladhäsion zwischen Monozyten und Endothelzellen gezeigt werden konnte (Wang, et al., 2006).

1.2 Antiinflammatorische Wirkung von Cariporide

Zusätzlich zu den unter 1.1.3.3 beschriebenen Wirkungen von Cariporide auf die intrazelluläre Elektrolytverschiebungen mit Verringerung der intrazellulären Kalziumkonzentration konnten mehrere tierexperimentelle- und in vitro Studien einen antiinflammatorischen Effekt von Cariporide nachweisen:

In einer in vivo Studie von Redlin wurden 22 Ratten einer Ischämie unterzogen, wobei 11 Ratten mit Cariporide vorbehandelt wurden, die verbleibenden 11 Ratten erhielten Placebo.

Dabei wurde der rechte Musculus cremaster der Ratte isoliert und für 90 min einer Ischämie unterzogen. Während der Reperfusion wurden die Leukozytenaktivierung, die Blutflussgeschwindigkeit, Arterioldurchmesser, Leukozytenrollen, -adhäsion und -extravasation beobachtet. Nach Behandlung mit Cariporide waren Leukozytenrollen, -adhäsion und -extravasation vermindert (Redlin et al., 2001). Das Leukozytenrollen und die -adhäsion

konnten dabei um 35-45% reduziert werden. Die Extravasion reduzierte sich sogar um ca. 85% nach 90 Minuten Reperfusion. Diese Resultate belegen einen zuvor unbekanntem antiinflammatorischen Einfluss von Cariporide.

In der gleichen Studie wurde venöses Blut zur Hälfte mit Cariporide und NaCl inkubiert und mit FMLP stimuliert; die L-Selektin-Expression auf Granulozyten wurde dann im FACS-Gerät analysiert. Als Ergebnis dieser Studie konnte festgehalten werden, dass Cariporide die L-Selektin-Expression vermindert, was als möglicher Mechanismus der Verminderung des Leukozytenrollens und der Adhäsion gedeutet wurde.

Es zeigte sich, dass Cariporide somit nicht nur durch seine direkte Wirkung auf die kardiomyozytäre Kalziumkonzentration protektiv wirkt, sondern durch die Reduzierung der inflammatorischen Reaktion über einen zusätzlichen Mechanismus die Gewebeschädigung nach Ischämie und Reperfusion beeinflussen könnte.

Neben den oben aufgeführten Studien deuten weitere Untersuchungen auf die antiinflammatorische Wirkung von Cariporide hin:

In einer in vivo Studie der Universität Halle wurde im Rattenversuch die Mesenterialarterie mit Thrombin zur Stimulation der Adhäsionskaskade behandelt und einer Ischämie/Reperfusion unterzogen. Unter Einfluss von Cariporide konnten auch hier das Leukozytenrollen, die Adhäsion und die Extravasion in den perivaskulären Raum deutlich reduziert werden. Hier wurde eine Reduktion der P-Selektin-Expression als möglicher Mechanismus nachgewiesen (Buerke et al., 2008).

Eine weitere Studie untersuchte den Einfluss von Cariporide auf die ICAM-1 Expression auf glatten Gefäßmuskelzellen und die Adhäsion zwischen diesen und Monozyten.

Dabei wurden die glatten Muskelzellen mit Lysophosphatidylcholin (LPC) inkubiert, wodurch eine erhöhte ICAM-1 Expression und Monozytenadhäsion beobachtet wurde. Unter Einfluss von Cariporide wurden sowohl die ICAM-1 Expression als auch die Monozytenadhäsion reduziert (Li et al., 2006).

In einer weiteren Studie konnte eine durch hoch konzentrierte Glukoselösung induzierte Adhäsion von Monozyten an kultivierte Endothelzellen durch Cariporide vermindert werden. Dieser Effekt war mit einer ebenfalls verminderten ICAM-1 Expression bei mit Cariporide inkubierten Endotelzellen verbunden (Wang et al., 2006).

1.3 Fragestellung

Aus der bisher dargestellten Literaturübersicht ergeben sich zusammengefasst folgende Befunde, die zur Fragestellung der aktuellen Arbeit hinführen:

Obwohl es die einzige kausale Therapie ist, geht Reperfusion nach Ischämie mit der Ausprägung eines Reperfusionsschadens einher.

Im Myokard kann neben der akuten direkten Schädigung der Kardiomyozyten durch Kalziumüberladung ein subakuter Reperfusionsschaden durch eine inflammatorische Reaktion beobachtet werden. Nach Stand der Forschung kann folgende Reaktionskaskade für diese inflammatorische Reaktion beschrieben werden:

Durch Ischämie geschädigte Myokardzellen produzieren in der frühen Reperusionsphase vermehrt reaktive Sauerstoffspezies (ROS).

Die ROS aktivieren gewebsständige Makrophagen zur Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen, v.a. IL-1 und TNF- α .

TNF- α löst in Endothelzellen eine starke inflammatorische Reaktion aus, welche durch vermehrte Expression von ICAM-1, P- und E-Selektin die Adhäsionskaskade einleitet und damit zur Inflammation führt.

Hemmung des Na⁺/H⁺-Austauschers durch Cariporide kann in verschiedenen experimentellen Modellen eine anti-inflammatorische Wirkung entfalten.

Spezifische Untersuchungen der Wirkung von Cariporide auf die endotheliale Expression von Adhäsionsmolekülen im Rahmen von Ischämie und Reperfusion fehlen.

Darauf aufbauend wurde folgende Hypothese formuliert:

Behandlung mit Cariporide vor Reperfusion nach myokardialer Ischämie vermindert die endotheliale Expression der Adhäsionsmoleküle E-Selektin und ICAM-1

Um diese Hypothese zu überprüfen, untersuchten wir in einem in-vitro-Versuch den Einfluss von Cariporide auf die Expression von E-Selektin und ICAM-1 auf humanen Endothelzellen nach Stimulation mit TNF- α . Zur Untersuchung möglicher zellulärer Mechanismen der antiinflammatorischen Effekte von Cariporide wurde zusätzlich der Einfluss von Cariporide auf die endotheliale Ca²⁺-Konzentration vor und nach Aktivierung mit TNF- α untersucht.

II. MATERIAL UND METHODEN

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurden im Zeitraum von Mai 2002 bis Juni 2005 am Institut für Physiologie, Arnimallee 22 der Charite Universitätsmedizin Berlin, Direktor Prof. Dr. med. Axel R. Pries durchgeführt.

2.1 Reagenzien und Versuchsgeräte

2.1.1 Reagenzien

Cariporide HOE 642	Hoechst Marion Roussel	Frankfurt
Collagenase Typ II	Sigma Chemie GmbH	Deisenhofen
DMSO (Dimethylsulfoxid)	MerckKGaA	Darmstadt
EDTA-Lösung	Sigma Chemie GmbH	Dreisenhofen
Endothelial Cell Basal Medium	PromoCell GmbH	Heidelberg
Fluo-4, AM FITC	Molecular Probes	Karlsruhe
2-(Isopropylamino)ethanol 70%	Sigma Chemie GmbH	Deisenhofen
Monoclonal antibody CD54 PE	Becton Dickinson	Heidelberg
Monoclonal antibody CD62 E PE	Becton Dickinson	Heidelberg
Mouse IgG PE	Becton Dickinson	Heidelberg
Trypsin/EDTA-Lösung (0,5%/ 0,2%)	Biochrom AG	Berlin
Tumor Necrosis Factor- α human	Sigma Chemie GmbH	Dreisenhofen
PBS-Lösung w Ca^{2+} , Mg^{2+}	Biochrom AG	Berlin
PBS-Lösung w/o Ca^{2+} , Mg^{2+}	Biochrom AG	Berlin

2.2.2 Versuchsgeräte

CO ₂ -Inkubator cytoterm 2	Kendro	Hanau
FACScan Flow Cytometer	Becton Dickinson	Heidelberg
Pipetten (1 bis 50ml)	Nunc	Langenselbold
Reaktionsgefäße (10 und 50ml)	BD Falcon	Heidelberg
Rundbodenröhrchen (5ml)	BD Falcon	Heidelberg
Sterile Werkbank Herasafe HS12	Heraeus	Hanau
Wellplatte mit 24 Wells	Nunc	Langenselbold
Zellkulturflasche (10 cm ²)	Nunc	Langenselbold

Zentrifuge Megafuge 1.0	Heraeus	Hanau
Zentrifuge Minifuge 2	Heraeus	Hanau

2.2 HUVECs

Die Basis unserer Forschungsarbeit stellt die Zellkultur dar. In unseren Experimenten wurden humane Endothelzellen aus Nabelschnurvenen (HUVEC) verwendet. Diese Zellen wurden enzymatisch mit einer Kollagenase aus den Nabelschnurvenen präpariert und kultiviert.

2.2.1 Isolierung und Kultivierung von HUVECs

Um humane Endothelzellen aus Nabelschnurvenen (HUVECs) zu isolieren, wurden Nabelschnüre nach Trennung von der Plazenta in einer Flasche mit ca. 100ml PBS-Lösung w/o Ca^{2+} , Mg^{2+} maximal 48 Stunden bei 4°C bis zur Zellisolation aufbewahrt.

Die Isolation der Endothelzellen fand unter der sterilen Werkbank statt:

Nach Kanülierung der Vene erfolgte die Perfusion mit 40 ml Phosphat-Saline-Puffer (PBS w/o Ca^{2+} , Mg^{2+}) zur Entfernung von Blutrückständen.

Nabelschnüre mit rupturierten Venen wurden verworfen. Um die endothelialen Zellen abzulösen, wurde nach Abbinden des distalen Endes der Nabelschnur eine Lösung mit 6-7ml 0,2% Kollagenase Typ II aus *Clostridium histolyticum* eingefüllt und zuvor mit 1ml 0,2%-iger Collagenase Typ II gespült, um restliches PBS aus der Nabelschnurvene zu entfernen. Es folgte eine Inkubation im Wasserbad bei 37°C für 10 Minuten.

Nach der Inkubation wurde die äußere Seite der Nabelschnur mit Ethanol (70%) abgespült. Die nun in der Nabelschnur befindliche Flüssigkeit wurde in einem 50 ml Reaktionsgefäß aufgefangen. Um möglichst viele Endothelzellen aus der Vene zu gewinnen, erfolgte eine weitere Spülung mit 20 ml PBS w/o Ca^{2+} , Mg^{2+} .

Die Zellsuspension wurde bei Raumtemperatur 5 Minuten lang bei 1200U/min zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Sediment in 20 ml Endothelial Cell Basal Medium® resuspendiert und in einer Zellkulturflasche (ca. 10 cm² Kulturfläche) überführt. Nach 3-4 Tagen Inkubation im Brutschrank sollten unter dem Lichtmikroskop konfluente HUVEC-Zellen (Abb.3) erkennbar sein (Crampton et al., 2007).

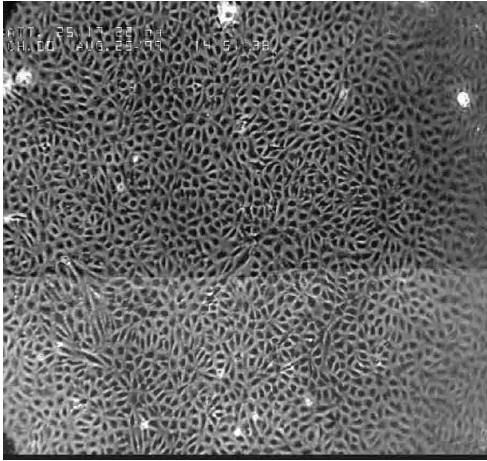


Abb.3: konfluente HUVECs unter dem Phasenkontrastmikroskop



Abb.4.: isolierte HUVECs unter dem Phasenkontrastmikroskop

2.3 Versuch I:

Nachweis von ICAM-1 / E-Selektin mit u. ohne Cariporide unter Stimulation

Zur Durchführung der Experimente sind Vorbereitungen, wie das Vorbereiten von Wellplatten (Wellplatten mit 24 Wells) und der entsprechenden Reagenzien notwendig.

2.3.1 Vorbereitung einer Wellplatte

Für den Nachweis der Expression von ICAM-1 und E-Selektin durch die FACS-Analyse mit und ohne den Einfluss von Cariporide unter der jeweiligen Stimulation von TNF- α , muss die Vorbereitung einer Wellplatte mit insgesamt zweimal 22 Wells (1ml Resuspendat mit 10^6 HUVECs/ Well) erfolgen.

2.3.1.1 Isolierung von HUVECs aus einer konfluenten Zellkultur

Die in den Kulturflaschen (ca 10cm^2) gezüchteten Endothelzellen wurden im unbehandelten Zustand im Phasenkontrast bei 200facher Vergrößerung nach morphologischen Kriterien (Pflasterstreifenrelief, Zellmonolayer) beurteilt, wobei nach dem Nachweis von konfluenten Zellen unter dem Mikroskop das Medium unter der sterilen Werkbank abgesaugt und verworfen wurde. Es folgt das zweimalige Waschen mit jeweils 20ml einer PBS-Lösung w/o Ca^{2+} , Mg^{2+} .

Nach dem Absaugen der PBS-Lösung wurden die Zellen mit 10ml Trypsin/EDTA 0,5%/ 0,2% für 10 Minuten im Brutschrank inkubiert. Die mit einem Zellschaber abgetrennten Endothelzellen (Abb.4) wurden in ein 50ml- Reaktionsgefäß überführt.

Die HUVECs des Reaktionsgefäßes wurden bei 1000 Umdrehungen/ Minute, 5 Minuten zentrifugiert. Das Sediment wurde mit 5ml Endothelial Cell Basal Medium® resuspendiert, und die Zellzahl mittels der Neubauer-Zählkammer ermittelt und auf 10^6 Zellen/ml eingestellt. Ein ml dieser Suspension wurde in jedes Well der Platte und im Brutschrank inkubiert.

2.3.2 Herstellung der Reagenzien

2.3.2.1 Herstellung einer Cariporid-Stammlösung

Zur späteren Applikation von Cariporide erfolgte zunächst die Anfertigung einer Stammlösung. Dazu wurden 0,114g Cariporide in 1ml DMSO gelöst, was einer Konzentration von 300mmol/l entspricht.

2.3.2.2 Tumornekrosefaktor-alpha

Der TNF- α gehört zur Gruppe der Immunmodulatoren oder Cytokine. Er wird von bestimmten Immunzellen -Monozyten und Makrophagen- gebildet und spielt, wie in der Einleitung erwähnt, eine wichtige Rolle bei Entzündungsprozessen. Er besteht aus drei identischen Polypeptidketten von jeweils 157 Aminosäuren Länge, die über zwei Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Jede Kette hat ein Molekulargewicht von 17,35 kDa (Wiltgen und Tilz, 2008).

Wir applizierten jeweils 0; 0,5; 1; 3; 5; 10; 25; 50 und 100 U/ml TNF- α pro FACS-Röhrchen.

Unsere in Vorversuchen ermittelte submaximale Stimulationskonzentration lag dabei sowohl für CD62E (E-Selektin) als auch für CD54 (ICAM-1) bei 50 U/ml TNF- α .

2.3.3 Überführung der HUVECs in Mess-Röhrchen

Nach dem erfolgreichen Nachweis von konfluenten HUVEC-Zellen in den Wells, wurden die Zellen in Mess-Röhrchen überführt (ein Mess-Röhrchen/Well). Dies erfolgte auf gleiche Weise, wie oben bereits erwähnt. Die Wells wurden jeweils mit 1 ml PBS w/o Ca^{2+} , Mg^{2+} zweimal gewaschen und darauf mit jeweils 1 ml Trypsin pro Well 10 Minuten lang im Brutschrank inkubiert. Danach wurden die mit einem Zellschaber isolierten Zellen jeweils in ein Mess-Röhrchen überführt, und jeweils noch 1 ml Endothelial Cell Basal Medium® pro Well hinzugegeben, um evtl. darin enthaltene Zellen nicht zu verlieren. Die Mess-Röhrchen wurden wie gewohnt zentrifugiert und das Sediment mit jeweils 1ml Zell-Medium resuspendiert.

2.3.3.1 Aufteilung der Mess-Röhrchen

Es bestanden nun zwei Reihen à 22 FACS- Röhrchen, welche folgendermaßen aufgeteilt wurden:

Eine Reihe diente dem Nachweis von ICAM-1 die andere Reihe dem Nachweis von E-Selektin. Jede Versuchsreihe (je 22 Mess-Röhrchen) wurde wiederum in zwei Subreihen à 11 Mess-Röhrchen aufgeteilt, von denen eine mit Cariporide, die andere mit dem Lösungsmittel (DMSO) behandelt wurden.

2.3.3.2 Applikation von Cariporide

Wir applizierten Cariporide in einer Endkonzentration von $3\mu\text{mol/l}$. In die Kontrollröhrchen wurde die gleiche Menge DMSO ($10\mu\text{l}$) appliziert. Die Zellen wurden anschließend für 30 Minuten im Brutschrank inkubiert.

2.3.3.3 Applikation von TNF-alpha

Nach Beendigung der Inkubation wurden die HUVECs mit TNF- α in oben angegebenen Konzentrationen stimuliert und wieder im Brutschrank inkubiert, und zwar die Reihe, welche dem Nachweis von ICAM-1 diente, für 24 h, und die, welche dem Nachweis von E-Selektin diente für 5 h.

Nach der entsprechenden Inkubationszeit im Brutschrank erfolgte auf gleiche Weise, wie oben bereits beschrieben das zweimalige Waschen mit PBS w/o Ca^{2+} , Mg^{2+} . Nach Elimination des Überstandes wurden die in jedem Mess-Röhrchen enthaltenden Zellen in PBS w/o Ca^{2+} , Mg^{2+} resuspendiert.

2.3.3.4 Applikation der Fluoreszenzantikörper und Maus IgG PE

Nun erfolgte die Applikation der fluoreszenzmarkierten Antikörper gegen E-Selektin und ICAM-1.

Bei der Versuchsreihe, bei welcher CD62E nachgewiesen werden sollte, erfolgte im nächsten Schritt die Applikation von $20\mu\text{l}$ mit dem Fluoreszenzfarbstoff PE markierter Antikörper gegen CD62E auf alle Proben, bis auf die Kontroll-Probe, wo die Applikation von $20\mu\text{l}$ PE-markierten unspezifischen Maus-IgGs erfolgte.

Auf die Versuchsreihe mit CD54 erfolgte die entsprechende Applikation von $20\mu\text{l}$ gegen CD54 gerichteter Antikörper bzw. von $20\mu\text{l}$ unspezifischer Antikörper für die Kontrolle.

Die Kontroll-Proben wurden verwendet, um das Ausmaß der nichtspezifischen Bindung und die durch Interaktion mit Fc-Rezeptoren vermittelte Bindung zu bestimmen.

2.3.3.5 Vorbereitung zur FACS-Analyse

Die Proben wurden für weitere 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Nach dem zweimaligen Herauswaschen des Antikörpers aus der Zelllösung mit jeweils 1ml PBS w/o Ca²⁺, Mg²⁺, wurden die Zellen jeden Messröhrchens mit 500 µl PBS w/o Ca²⁺, Mg²⁺ resuspendiert.

Es schloss sich die Messung der Fluoreszenz im FACScan-Gerät an.

2.4 Versuch II:

Nachweis von intrazellulärem Kalzium mittels Fluo-4 bei HUVECs

Zur Durchführung der Experimente waren wieder entsprechende Vorbereitungen erforderlich.

2.4.1 Vorbereitung

Für den Nachweis von intrazellulärem Kalzium durch die FACS-Analyse mit und ohne den Einfluss von Cariporide erfolgte die Vorbereitung von zwei Versuchreihen mit jeweils 500 µl Resuspendat mit 10⁶ HUVECs/ Mess-Röhrchen.

Isolierung und Aufteilung der HUVECs aus der konfluenten Zellkulturflasche erfolgte wie oben beschrieben.

2.4.2 Herstellung der Reagenzien

In dieser Versuchreihe wurde die gleiche Stammlösung von Cariporide, sowie die Verdünnungsreihe von TNF-α wie bereits oben beschrieben verwendet.

2.4.2.1 Herstellung einer 0,2 mM Fluo-4 Lösung

Fluo-4 ist ein Fluoreszenz-Kalzium-Indikator mit einer Wellenlänge von 488 nm, welcher intrazelluläres Kalzium nachweist. Es hat eine Kalziumbindungsaktivität von K_d= 345 nM.

In dem von uns benutzten Produkt liegt Fluo-4 bereits als eine 1mM Lösung in 500 µl DMSO vor. Wir verdünnten diese im Verhältnis 1: 250 mit Endothelial Cell Basal Medium®, sodass wir eine Konzentration von 4 µmol/ml erhielten.

2.4.2.2 Herstellung einer EDTA-Lösung

Zur Herstellung einer 500mM EDTA-Lösung wurden 9,305g EDTA in 50ml PBS w/o Ca²⁺, Mg²⁺ gelöst. Zur Einstellung des pH-Wertes auf 7,4 – 7,5 wurde mit 9,6 M Natronlauge titriert.

2.4.3 Inkubation mit Fluo-4

Als Ausgangspunkt bestand eine konfluente Zellkulturflasche.

Konfluente HUVEC-Zellen in der Zellkulturflasche (in 10ml Endothelial Cell Basal Medium®) wurden mit 4 µmol/ml Fluo-4 für eine Stunde im Brutschrank inkubiert.

2.4.4 Überführung der HUVECs in Mess-Röhrchen

Nach der stattgefundenen Inkubation wurden die Zellen mit einem Zellschaber abgeschabt und in ein 50 ml-Reaktionsgefäß überführt. Es schloss sich eine Zentrifugation bei 1000 U/min für 5 min an.

Dem gewonnenen Sediment wurde in 10ml PBS-w/o Ca^{2+} , Mg^{2+} resuspendiert. Das Resuspendat wurde darauf auf zwei Falcon®-Reaktionsgefäße à 5ml aufgeteilt.

Nachfolgend wurden die zwei Falcon®-Reaktionsgefäße unterschiedlich behandelt:

In dem einem Resuspendat schloss sich eine zweimalige Zentrifugation an, nachdem mit 5ml PBS mit Ca^{2+} , Mg^{2+} , wie bereits in der ersten Versuchreihe beschrieben, gewaschen wurde. Die Zellen des zweiten Resuspendats wurden entsprechend zweimal mit 5ml PBS ohne Ca^{2+} , Mg^{2+} gewaschen. Zusätzlich wurde den Zellsuspensionen mit PBS w/o Ca^{2+} , Mg^{2+} 5mmol/L EDTA zugegeben, um noch eventuell vorhandene Ca^{2+} -Ionen abzupuffern.

Es wurde jeweils soviel PBS pro Reaktionsgefäß hinzugegeben, dass mindestens 10^6 Zellen/ml Resuspendat vorhanden waren. Dies erfolgte erneut mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer. Insgesamt wurde pro Reaktionsgefäß eine Versuchreihe mit insgesamt 13 Mess-Röhrchen à 500 µl HUVECs-Resuspendat mit je 10^6 Zellen hergestellt.

2.4.5 Aufteilung der FACS-Röhrchen

Es bestanden nun zwei Reihen à 13 FACS- Röhrchen, welche folgendermaßen aufgeteilt wurden:

Eine Versuchreihe enthielt Zellen, suspendiert in PBS w Ca^{2+} , Mg^{2+} , die andere Versuchreihe enthielt Zellen, in PBS w/o Ca^{2+} , Mg^{2+} .

Jede Versuchreihe wurde nochmals aufgeteilt in 1x 7 und 1x6 Mess-Röhrchen.

Es wurden jeweils sechs Mess-Röhrchen jeder Versuchreihe mit 3 µmol/l Cariporide für 30 Minuten im Brutschrank inkubiert. Den verbliebenen sieben Mess-Röhrchen wurde die entsprechende Menge des Lösungsmittels DMSO (10 µl) zugesetzt.

2.4.6 Inkubation mit TNF-alpha

Pro Versuchreihe wurde jeweils ein Ausgangswert „baseline“ bestimmt, für den die Zellen weder mit Cariporide noch mit TNF- α behandelt wurden.

Im folgenden Schritt wurden die übrigen HUVECs mit TNF- α in einer submaximalen Aktivierungskonzentration von 50U/ml stimuliert. Die Messung der Fluoreszenz erfolgte zum Zeitpunkt 0 für das erste Röhrchen mit und ohne Cariporide, dann jeweils nach 2; 5; 10; 15, 30 und 60 Minuten Stimulation mit TNF- α .

2.5 Auswertung am FACScan (Durchflusszytometrie)

Die Durchflusszytometrie ist eine Methode, mit der man optische Eigenschaften einzelner Zellen bzw. Partikel in Suspension messen und analysieren kann.

Die Durchflusszytometrie (FACScan= FACS für englisch Flurescent Activated Cell Sorting) (Abb.5) ermöglicht es, eine große Anzahl von Zellen in kurzer Zeit zu untersuchen, wobei die Zellen einzeln an einer Lichtquelle in einem Flüssigkeitsstrom vorbeigeleitet werden. Dabei werden die Größe basierend auf der Vorwärtsstreuung und die interne Komplexität anhand der Seitwärtsstreuung des Lichts ermittelt. Zum anderen kann noch die Expression von Antigenen auf der Zelloberfläche mit Hilfe fluoreszierender Antikörper oder die intrazelluläre Konzentration bestimmter Substanzen durch Inkubation mit entsprechend sensitiven Fluoreszenzfarbstoffen detektiert werden.



Abb.5 FACScan-Gerät der Firma Becton-Dickinson

Dabei sind Partikel mit einem Durchmesser von weniger als 0,5 μm unterscheidbar, wobei die simultane Erfassung der einzelnen Parameter für mehr als zehntausend Zellen in weniger als einer Minute möglich ist. Über eine angeschlossene Datenauswerteeinheit werden die erhobenen Daten verarbeitet und als Ergebnis graphisch und numerisch dargestellt.

2.5.1 Aufbau und Funktion eines Durchflusszytometers

Der grundsätzliche Aufbau eines Durchflusszytometers besteht aus einem Flüssigkeitssystem, das die Proben in der Flusskammer an einem Laserstrahl vorbeiführt. Als Lichtquelle werden ein oder mehrere Laser unterschiedlicher Wellenlänge verwendet, um damit mehrere Zelleigenschaften parallel zu erfassen. Das vom Partikel abgestrahlte Licht wird zu Photodetektoren und Photomultipliern gelenkt, die die Signale detektieren und digitalisieren.

2.5.2 Flüssigkeitssystem

Das Flüssigkeitssystem besteht aus zwei Flüssigkeitssystemen, welche die Flusskammer versorgen. Das Flüssigkeitssystem dient dazu, die in Suspension gehaltenen Partikel einzeln im Raum auszurichten und in der Durchflusszelle durch den Fokus des Laserstrahls zu führen.

2.5.3 Messtechnik

Grundvoraussetzung zur Messung ist das Vorliegen einer Probe als Einzelzellsuspension. Die sich in einem Mess-Röhrchen befindliche Zellsuspension wird in einem Proberöhrchen über eine Stahlkapillare durch Überdruck in die Meßküvette transportiert. Die Trägerflüssigkeit beschleunigt die Zellen so stark, dass sich lockere Zellaggregate dabei auftrennen. Dadurch können die Einzelzellen in einem konstanten Fluss durch den Laserstrahl detektiert werden.

Der in dieser Arbeit verwendete FACScan ist mit einem Argonlaser ausgestattet, dessen Hauptlinie bei 488 nm monochromatisches blaues Licht emittiert.

Passiert eine Zelle den fokussierten Laserstrahl, wird die Richtung bzw. die Wellenlänge des anregenden Lichts verändert. Das auf die einzelnen Zellen fokussierte blaue Licht wird dabei in ein Vorwärtsstreulicht (FSC) und in ein Seitwärtsstreulicht (SSC) aufgetrennt und von entsprechenden Sensoren erfasst. Die Intensität des hierbei entstehenden Vorwärtsstreulichts („forward light scatter“, FSC) ist ein Maß für die Zellgröße. Das im rechten Winkel zum Laserstrahl gestreute Rechtwinkelstreulicht („side Scatter“, SSC) korreliert vor allem mit der Granularität und der Dichte der Zellen. Dadurch lassen sich einzelne Zellen in einer Suspension hinsichtlich ihrer Größe und morphologischer Eigenschaften mit Hilfe der Durchflußzytometrie unterscheiden.

Werden Zellantigene mit geeigneten Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern markiert, absorbieren die Fluorochrome das Anregungslicht und emittieren Fluoreszenzlicht mit einer charakteristischen Wellenlänge. Durch die Energie des einfallenden und absorbierten Laserlichts, werden Elektronen auf ein höheres Energieniveau gehoben. Unter Emission von längerwelligem

Licht, kehren die Elektronen zu ihrem Grundzustand zurück. Dieser Strahlungsübergang wird als Fluoreszenz bezeichnet. Das emittierte Fluoreszenzlicht wird durch entsprechende Filter geleitet und in Photomultiplier-Röhren elektronisch verstärkt. Die Fluoreszenzintensität ist dabei proportional zur Anzahl der markierten Bindungsstellen auf der Zelloberfläche. Je mehr Antikörper auf der Zelloberfläche gebunden sind, desto stärker ist das Fluoreszenzsignal.

In einem Durchflußzytometer mit einem Argon-Laser existieren vier Filter: Für den SSC ein 488/10-BP-Filter, für FITC-Konjugate ein 530/30-BP-Filter, für PE-Konjugate 585/5-BP-Filter und für PerCP-Konjugate ein 620/LP-Filter. Somit ist die Detektion von fünf Parametern, die Vorwärts- und Seitwärtsstreueigenschaften und die Erfassung von drei Fluoreszenzspektren einzelner Zellen bzw. Partikel simultan möglich.

Im Versuch I wird Antikörper gegen E-Selektin und ICAM-1 verwendet (PE-Konjugat). Der im Versuch II verwendete Antikörper (Fluo-4) richtet sich gegen Kalzium (FITC-Konjugat). PE emittiert nach einer Anregung maximal bei 560nm (rotes Licht), während FITC bei einer Wellenlänge von 510 nm emittiert.

Um während der Detektion Zellfragmente von den zu untersuchenden Zellen/Partikeln zu trennen, wird ein Schwellenwert über den FSC gesetzt, so dass Partikel unterhalb einer bestimmten Größe nicht erfasst werden.

Die analogen Signale werden digitalisiert bevor sie im Computer mit Hilfe eines Datenverarbeitungsprogrammes analysiert werden. Die Auflösung der erhaltenen Daten hängt dabei vom jeweiligen Konverter ab. Bei dem in dieser Arbeit benutzten FACScan wurden sämtliche Signale auf 1024 (0-1023) Kanäle aufgeteilt.

Zur Unterscheidung einzelner Zellpopulationen wird hauptsächlich die Zweiparameterdarstellung von FSC zu SSC in Form eines "Dot-plots" herangezogen. Während und nach der Messung wird mit Hilfe eines "Gating" die zu interessierende Zellpopulation von den anderen Zellen separiert betrachtet und mittels eines Auswertungsprogrammes ausgewertet (Schriek, 2004).

2.5.4 Datenauswertung

Für die Auswertung der gemessenen Signale existieren mehrere Möglichkeiten.

Zwei grundlegende Darstellungen werden am häufigsten genutzt, wie wir sie auch bei unserer Arbeit verwendet haben: Das Streudiagramm (Dot-plot) und die Histogrammdarstellung.

Das Streudiagramm ist eine zweidimensionale Erweiterung des Histogramms. Für die meisten Parameteruntersuchungen wird zur Auswertung die Anzahl der Zellen (Ordinate) gegen die Kanäle (Abszisse) in Form eines Histogramms aufgetragen (Einparameterdarstellung). Bei der korrelierten Zweiparameterdarstellung in Form eines „Dot-plots“ können neben der Korrelation von FSC mit SSC auch Fluoreszenzen verschiedener Wellenlängen untereinander oder mit Streulichteigenschaften korreliert werden.

Für die statistische Auswertung wird je nach untersuchtem Parameter entweder der Median der Signalintensität oder die Anzahl definierter Ereignisse als relativer Prozentanteil bestimmt. Der Median entspricht dabei der Verteilungsklasse, bei der 50% der Werteverteilung darüber und 50% darunterliegen (Schriek, 2004).

Mit Hilfe des Computerprogrammes Cellquest pro® (BD Bioscience, Heidelberg) wurde die statistische Auswertung vorgenommen. Mit der „Region of interest“ (ROI)-Technik wurden Ereignisse, die innerhalb einer gewählten Region liegen, weiter ausgewertet. Durch Setzen von Grenzwerten (Markern) wird darauf der Anteil positiver Partikel gegenüber der Gesamtzahl bzw. deren mittlere Fluoreszenzintensität „mean fluorescence intensity“ (MFI) gemessen. Die mittlere Fluoreszenzintensität ist dabei ein Maß für die Menge gebundenen Fluoreszenzfarbstoffes pro Partikel (Schriek, 2004).

2.6 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte durch nicht-parametrische Verfahren für unverbundene Stichproben. Für den Unterschied zwischen den jeweiligen Versuchsreihen wurde der Mann-Whitney-Rangsummen-Test für unabhängige Stichproben verwendet. Er beschreibt die Wahrscheinlichkeit, mit der ein zwischen zwei unabhängigen Gruppen beobachteter Unterschied auf Zufall beruht. Eine Normalverteilung in den Gruppen ist dabei nicht erforderlich. $P < 0.05$ wurde als statistisch signifikant betrachtet.

III. Ergebnisse

Der Ergebnisteil der vorliegenden Arbeit ist in zwei Abschnitte gegliedert und gibt die Untersuchungen in der Reihenfolge der einzelnen Versuchreihen wieder:

Abschnitt I enthält die Ergebnisse zur Darstellung der ICAM-1 sowie der E-Selektin-Expression auf HUVECs nach Stimulation mit TNF-alpha mit und ohne Einfluss von Cariporide.

Abschnitt II enthält die Ergebnisse zur Darstellung von intrazellulärem Kalzium in HUVECs nach Stimulation mit TNF-alpha mit und ohne den Einfluss von Cariporide, im kalziumhaltigen wie auch im kalziumfreien Medium.

In den folgenden Ergebnissen ist jeweils zu jedem Streudiagramm (Dotplot) das dazugehörige Histogramm dargestellt.

Bei den Dotplots handelt es sich jeweils um eine Zweiparameter –Darstellung von FSC zu SSC, zur Unterscheidung einzelner Zellpopulationen. Mit der „Region of Interest“ (ROI)-Technik, dem sogenannten „gating“ wurden Ereignisse, die innerhalb der gewählten Region liegen von den anderen Zellen separiert betrachtet.

Nach dem Definieren der ROI, konnte mit Hilfe des Auswertungsprogrammes das Histogramm dargestellt werden.

Im Histogramm wird die Anzahl der Zellen (Ordinate) gegen die Kanäle (Abzisse) aufgetragen (Einparameterdarstellung). Durch Setzen von Grenzwerten (Markern) wird darauf der Anteil positiver Partikel gegenüber der Gesamtzahl bzw. deren mittlere Fluoreszenzintensität „mean fluorescence intensity“ (MFI) gemessen. Die mittlere Fluoreszenzintensität ist dabei ein Maß für die Menge gebundenen Fluoreszenzfarbstoffes pro Partikel. Mittels der Negativ-Kontrolle wurde dabei die Lage des Markers festgelegt, und zwar am absteigenden Teil der Kurve, wo kaum Events mehr dargestellt werden konnten, so dass 95% der Werte links davon stehen. Diese Position wurde für alle Versuche der jeweiligen Versuchsreihe beibehalten.

3.1 ICAM-1 Expression

3.1.1 ICAM-1 Expression ohne Cariporide

In den Abbildungen 6 - 9 sind jeweils Beispiele eines Versuchsansatzes bezüglich der Expression von ICAM-1 (CD54) auf Endothelzellen nach 24-stündiger Inkubation mit TNF-alpha ohne den Einfluss von Cariporide dargestellt.

Dabei sind links die Dotplots und rechts jeweils das dazugehörige Histogramm abgebildet.

Bei den Kontrollen (0 U/ml TNF-alpha) ist nur eine minimale ICAM-1-Expression nachweisbar. Nach Stimulation mit 0,5 und 10 U/ml TNF-alpha ist eine dosisabhängige Steigerung der ICAM-1-Expression zu erkennen.

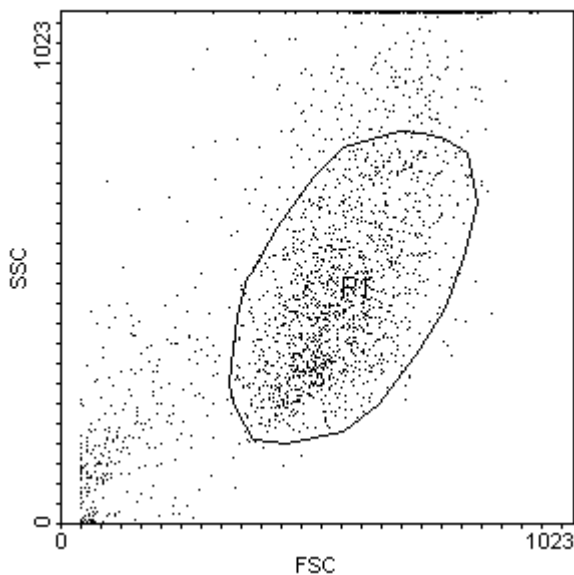


Abb.6:
Dotplot: Negativ-Kontrolle
FSC: forward scatter
SSC: side scatter

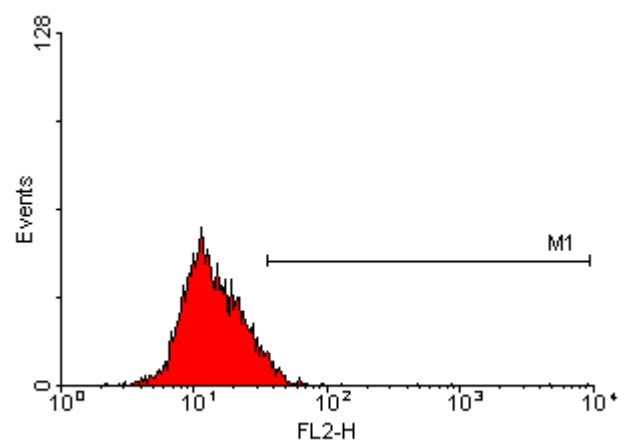


Abb.6a:
Histogramm: Negativ-Kontrolle;
HUVECs-Markierung mit
unspezifischem Maus - IgG PE
FL2: Fluoreszenzintensität

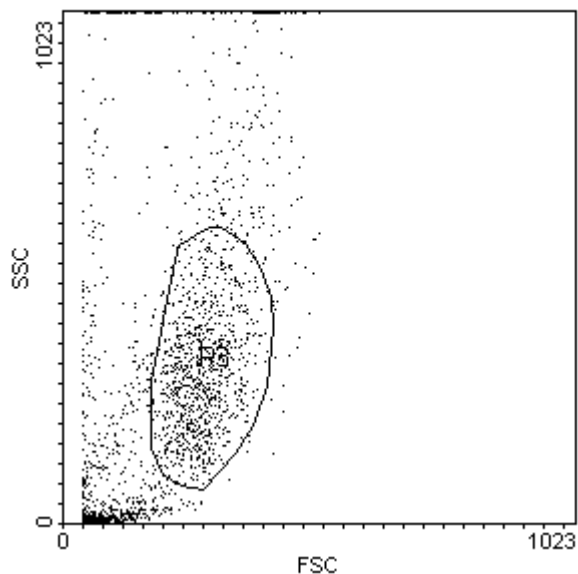


Abb.7:
Dotplot
FSC: forward scatter
SSC: side scatter

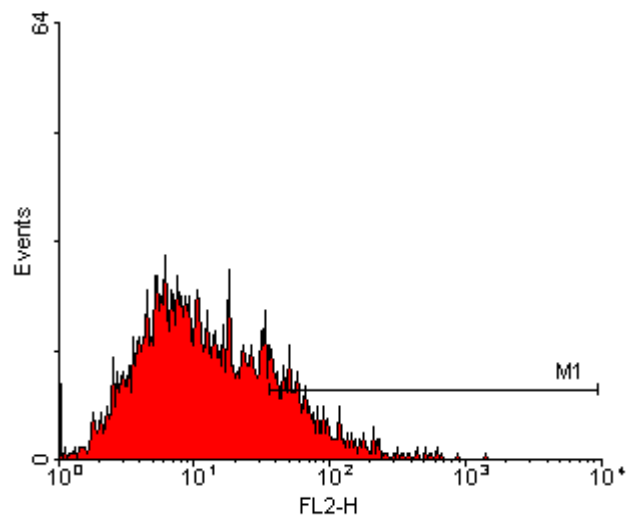


Abb.7a:
Histogramm: HUVECs-Markierung
mit CD54 PE nach einer 24-stündigen
Stimulation mit 0 U/ml TNF ohne
Cariporide
FL2: Fluoreszenzintensität

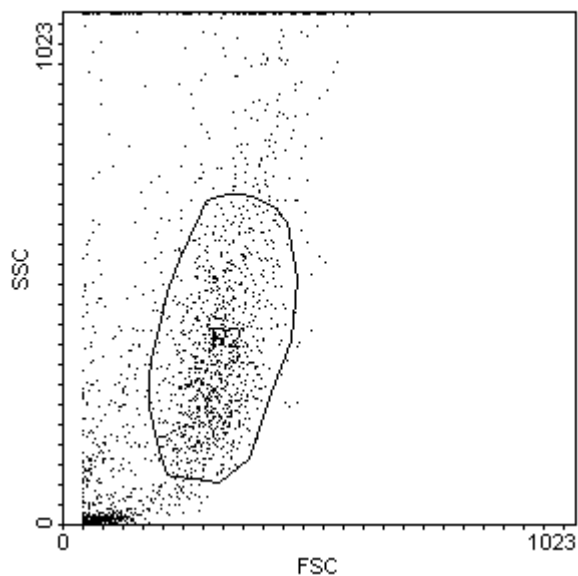


Abb.8:
Dotplot
FSC: forward scatter
SSC: side scatter

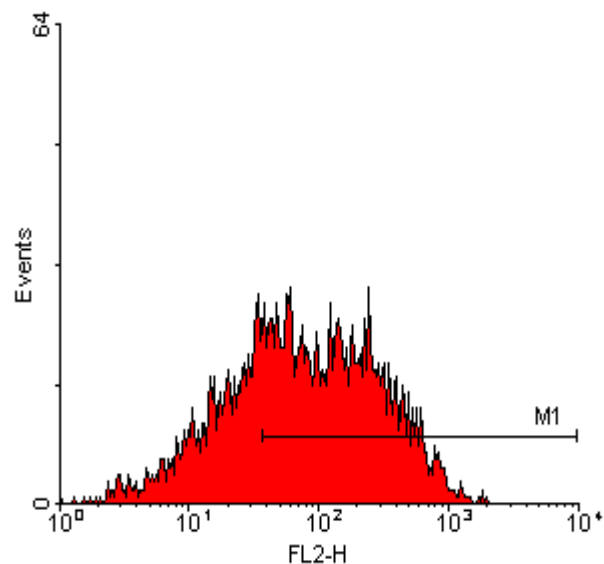


Abb.8a:
Histogramm: HUVECs-Markierung
mit CD54 PE nach einer 24-stündigen
Stimulation mit 0,5 U/ml TNF ohne
Cariporide
FL2: Fluoreszenzintensität

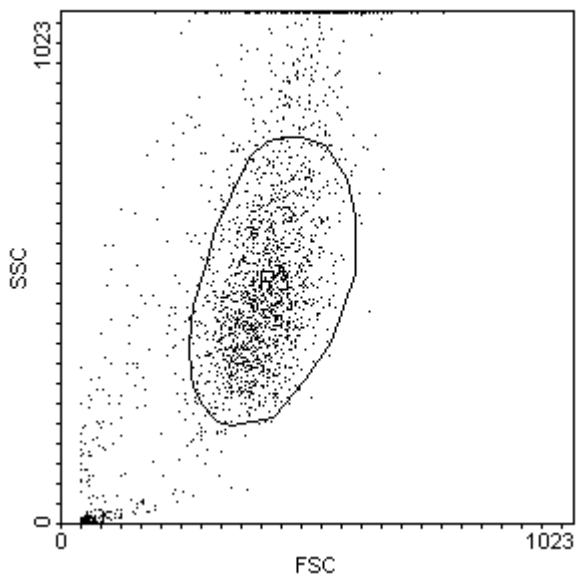


Abb.9:
Dotplot
FSC: forward scatter
SSC: side scatter

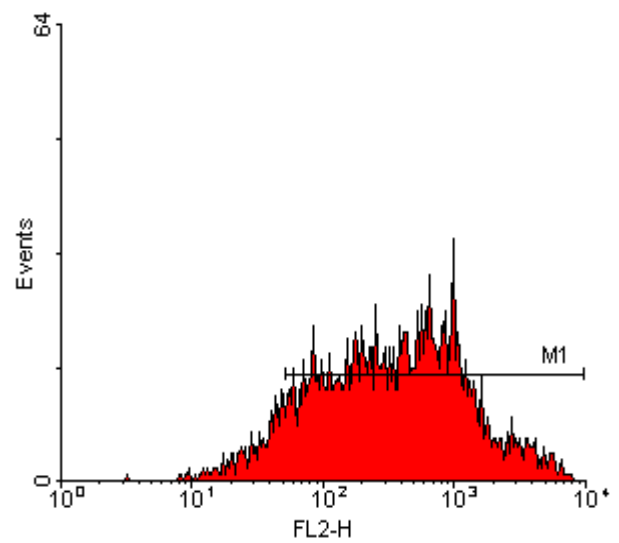


Abb.9a:
Histogramm: HUVECs-Markierung
mit CD54 PE nach einer 24-stündigen
Stimulation mit 10 U/ml TNF ohne
Cariporide
FL2: Fluoreszenzintensität

3.1.2 ICAM-1 Expression mit Cariporide

Bei den Abbildungen 10 – 12 handelt es sich um den gleichen Zellansatz, wobei hier die Endothelzellen zusätzlich mit Cariporide behandelt wurden. Man erkennt nur eine minimale TNF-alpha-dosisabhängige Steigerung der ICAM-1-Expression.

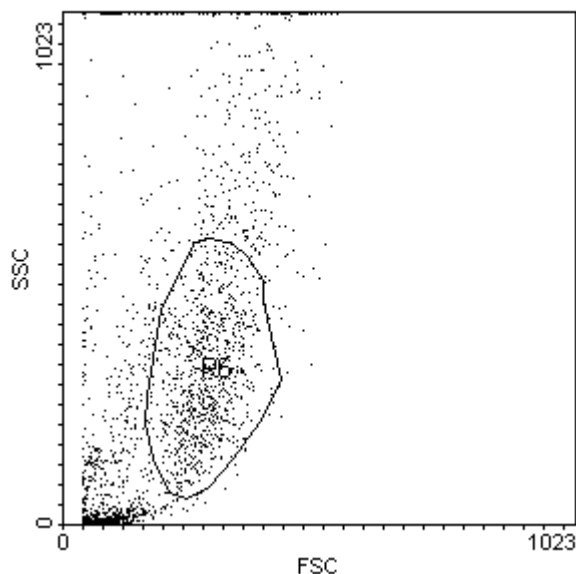


Abb.10:
Dotplot
FSC: forward scatter
SSC: side scatter

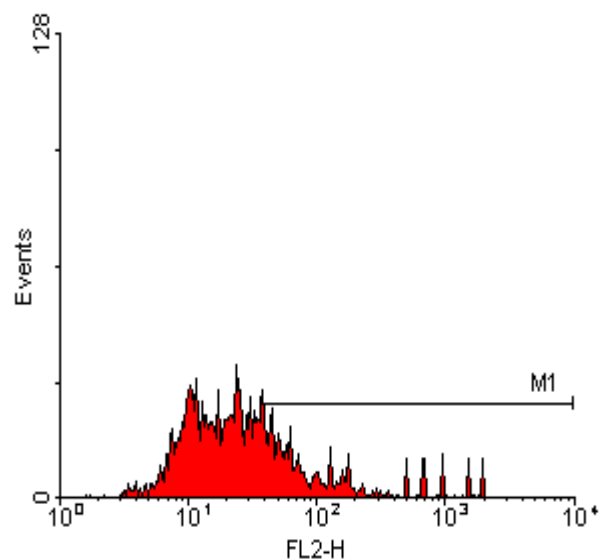


Abb.10a:
Histogramm: HUVECs-Markierung
mit CD54 PE nach einer 24-stündigen
Stimulation mit 0 U/ml TNF mit
Cariporide
FL2: Fluoreszenzintensität

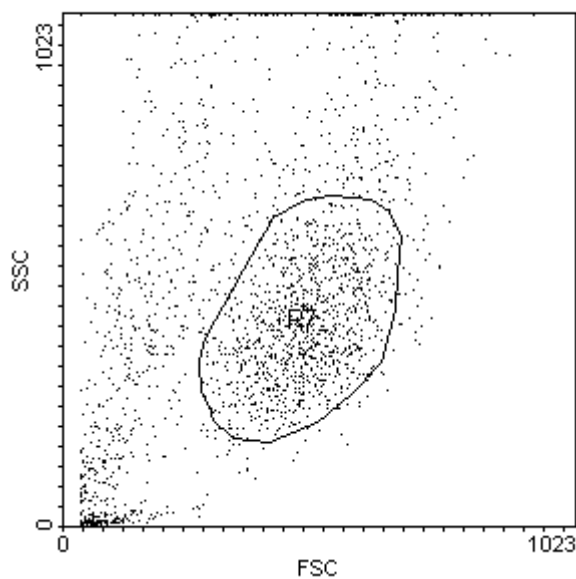


Abb.11:
Dotplot
FSC: forward scatter
SSC: side scatter

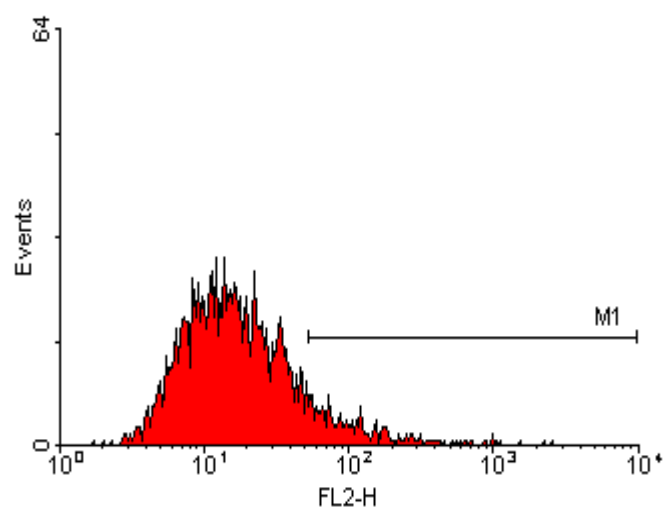


Abb.11a:
Histogramm: HUVECs-Markierung
mit CD54 PE nach einer 24-stündigen
Stimulation mit 0,5 U/ml TNF mit
Cariporide
FL2: Fluoreszenzintensität

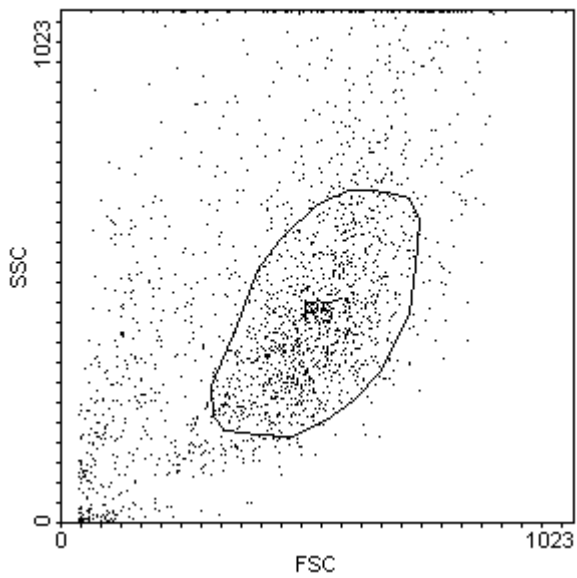


Abb.12:
Dotplot
FSC: forward scatter
SSC: side scatter

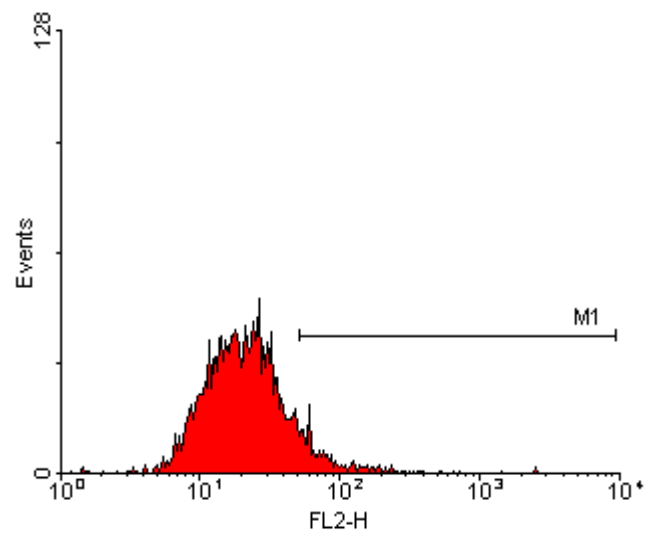
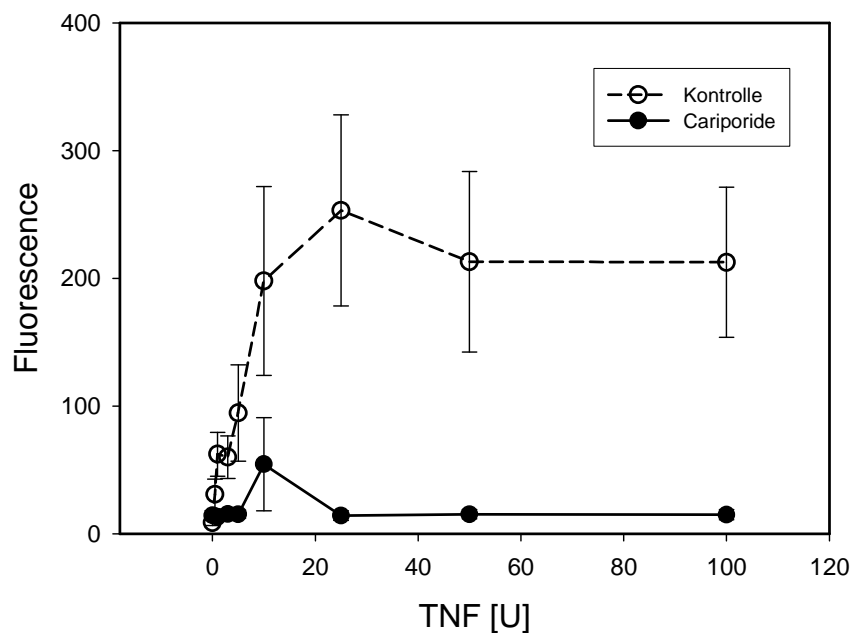


Abb.12a:
Histogramm :HUVECs-Markierung mit
CD54 PE nach einer 24-stündigen
Stimulation mit 10 U/ml TNF mit
Cariporide
FL2: Fluoreszenzintensität

3.1.3 Vergleich: ICAM-1-Expression mit und ohne Cariporide

Beim folgenden Vergleich der TNF-alpha dosisabhängigen ICAM-1-Expression mit und ohne Einfluss von Cariporide ist deutlich die geringere Fluoreszenz bei den HUVECs, welche mit Cariporide behandelt wurden (durchgehende Linie) im Vergleich zur höheren Fluoreszenz bei den HUVECs ohne den Einfluss von Cariporide (gestrichelte Linie) zu erkennen.

In der statistischen Auswertung war der durch TNF-alpha induzierte Anstieg der Fluoreszenz in der Kontrollgruppe ohne den Einfluss von Cariporide mit $p = 0,001$ hoch signifikant. In der Cariporide-Gruppe hatte TNF-alpha keine signifikante Wirkung auf die Fluoreszenz ($p = 0,998$). Ab einer TNF-alpha Konzentration von 25 U/ml war im direkten Vergleich beider Gruppen eine Signifikanz gegeben.



Vergleich: ICAM-1-Darstellung auf HUVECs mit und ohne Cariporide unter dosisabhängiger Stimulation mit TNF-alpha

3.2 E-Selektin- Expression

3.2.1 E-Selektin Expression ohne Cariporide

In den Abbildungen 14 - 17 sind jeweils Beispiele eines Versuchsansatzes bezüglich der Expression von E-Selektin (CD62-E) auf Endothelzellen nach 5-stündiger Inkubation mit TNF-alpha mit und ohne den Einfluss von Cariporide dargestellt.

Dabei ist bei 0 U/ml TNF-alpha eine minimale E-Selektin-Expression und bei 0,5 und 10 U/ml TNF-alpha eine dosisabhängige Steigerung der E-Selektin-Expression zu erkennen.

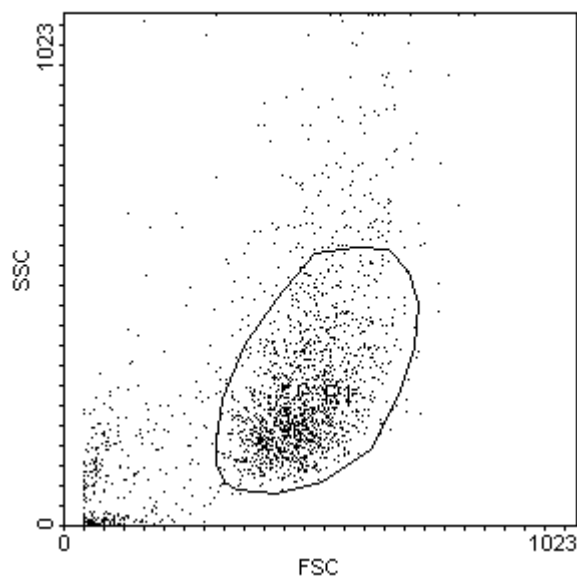


Abb.14:
Dotplot
FSC: forward scatter
SSC: side scatter

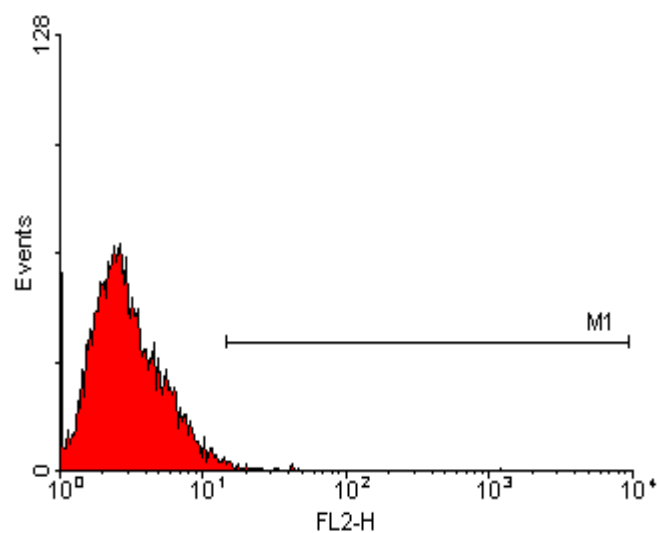


Abb.14a:
Histogramm: Negativ-Kontrolle
HUVECs-Markierung mit
unspezifischen Maus IgG PE
FL2: Fluoreszenzintensität

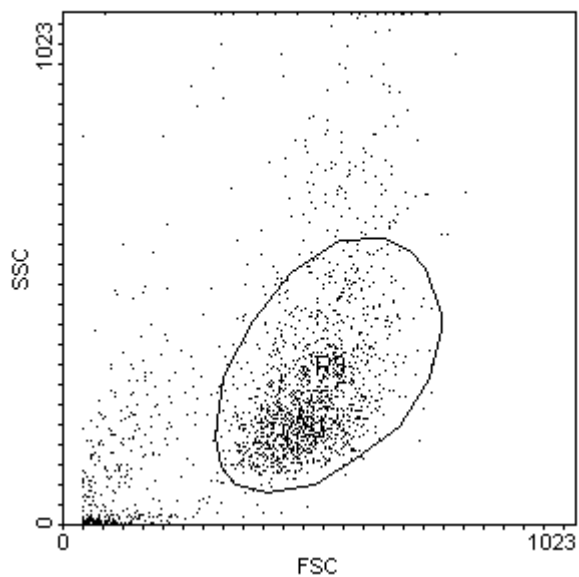


Abb.15:
Dotplot
FSC: forward scatter
SSC: side scatter

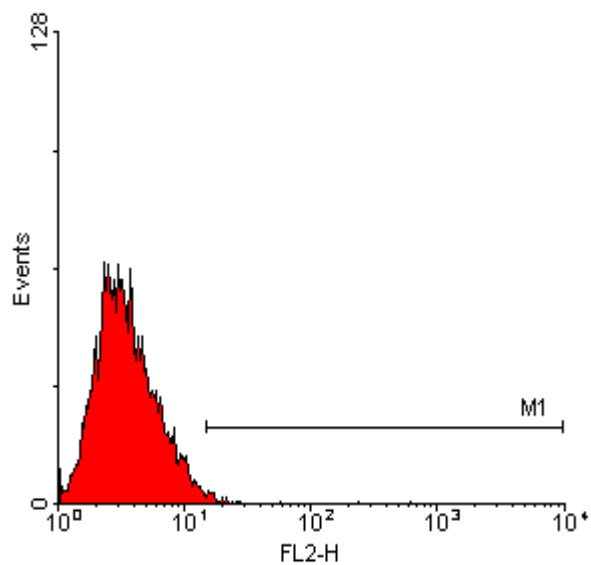


Abb.15a:
Histogramm: HUVECs-Markierung
mit CD62E-PE nach einer 5-stündigen
Stimulation mit 0 U/mlF ohne
Cariporide
FL2: Fluoreszenzintensität

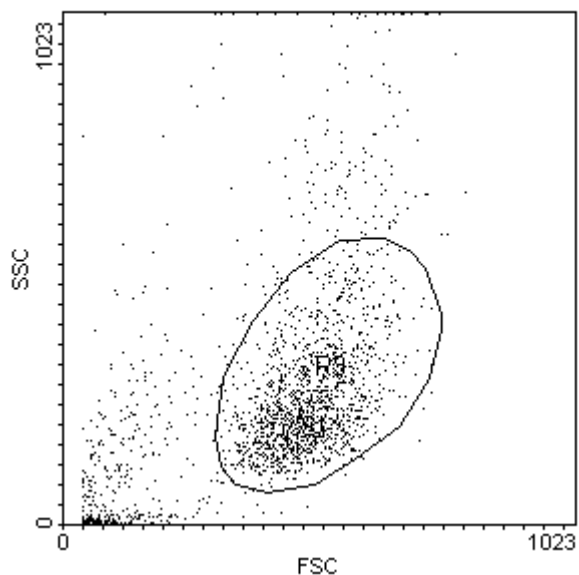


Abb.16:
Dotplot
FSC: forward scatter
SSC: side scatter

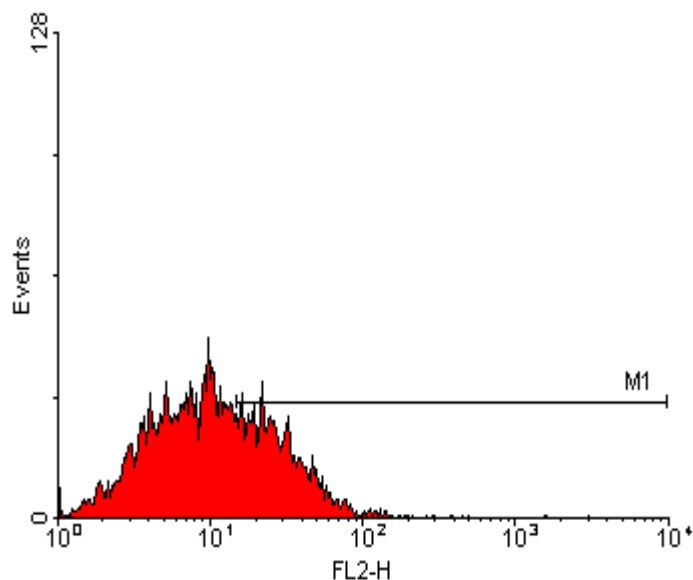


Abb.16a:
Histogramm: HUVECs-Markierung
mit CD62 E-PE nach einer 5-stündigen
mit 0,5 U TNF ohne Cariporide
FL2: Fluoreszenzintensität

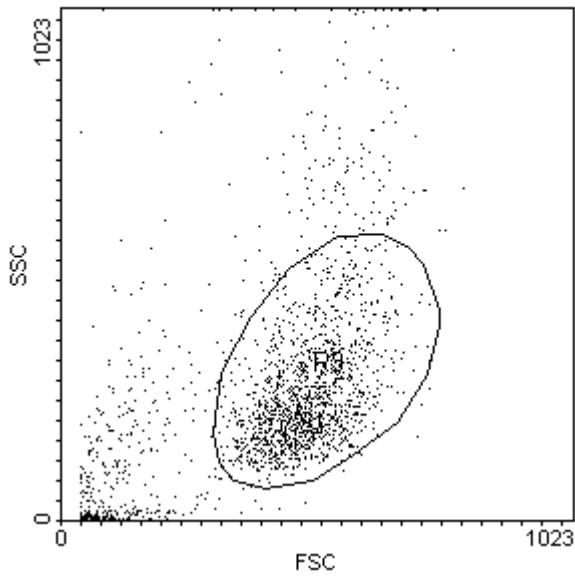


Abb.17:
 Dotplot
 FSC: forward scatter
 SSC: side scatter

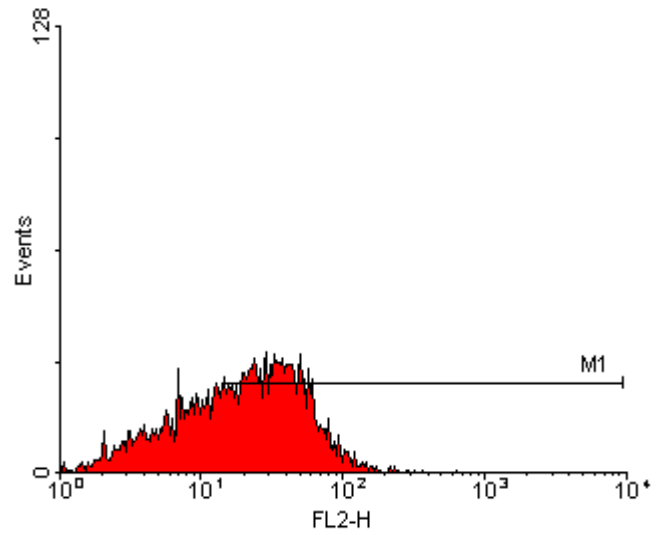


Abb.17a:
 Histogramm: HUVECs-Markierung
 mit CD62 E PE nach einer 5-stündigen
 mit 10 U/ml TNF ohne Cariporide
 FL2: Fluoreszenzintensität

3.2.2 E-Selektin Expression mit Cariporide

Die Abbildungen 18 – 20 repräsentieren den gleichen Zellansatz, wobei hier die Endothelzellen zusätzlich mit Cariporide behandelt wurden. Man erkennt keine TNF-alpha-abhängige Steigerung der Expression von E-Selektin.

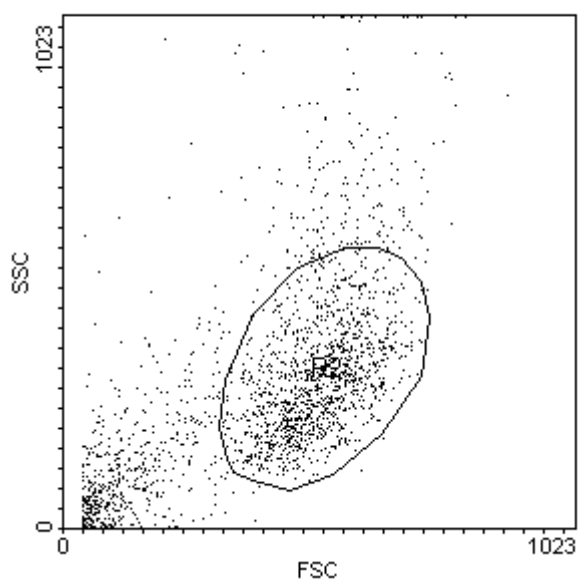


Abb.18:
Dotplot
FSC: forward scatter
SSC: side scatter

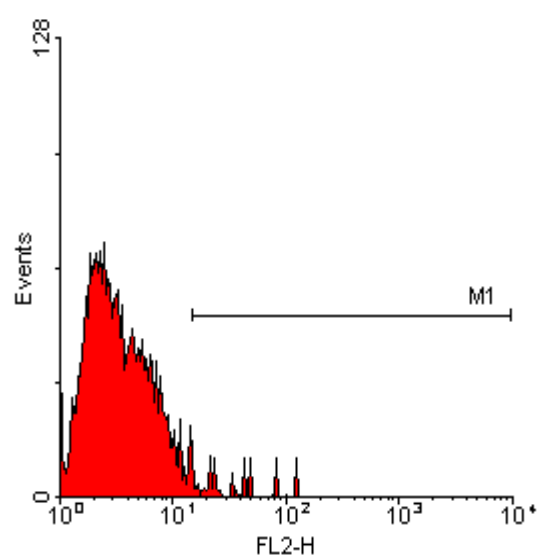


Abb.18a:
Histogramm: HUVECs-Markierung
mit CD62E-PE nach einer 5-stündigen
Stimulation mit 0 U/ml TNF mit
Cariporide
FL2: Fluoreszenzintensität

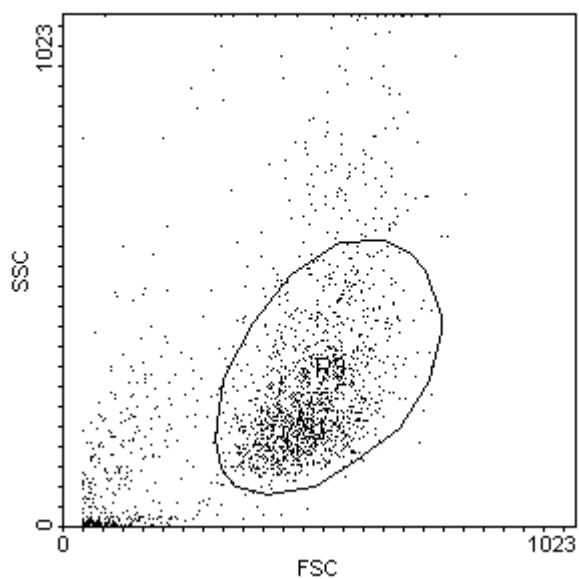


Abb.19:
Dotplot
FSC: forward scatter
SSC: side scatter

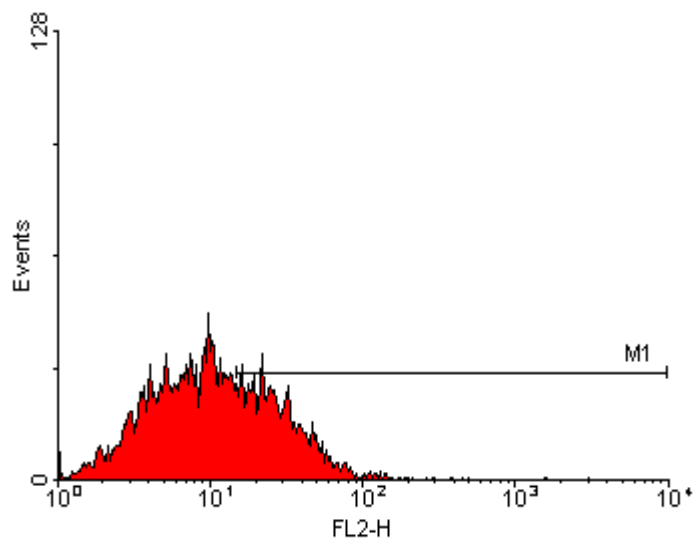


Abb.19a:
Histogramm: HUVECs-Markierung
mit CD62 E-PE nach einer 5-stündigen
mit 0,5 U/ml TNF mit Cariporide
FL2: Fluoreszenzintensität

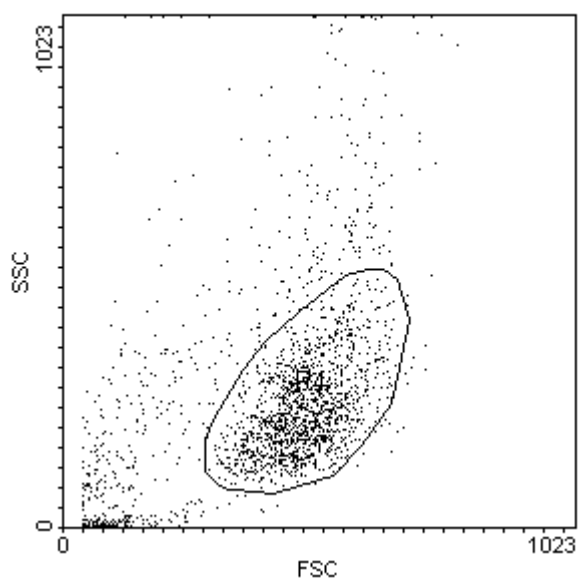


Abb.20:
Dotplot
FSC: forward scatter
SSC: side scatter

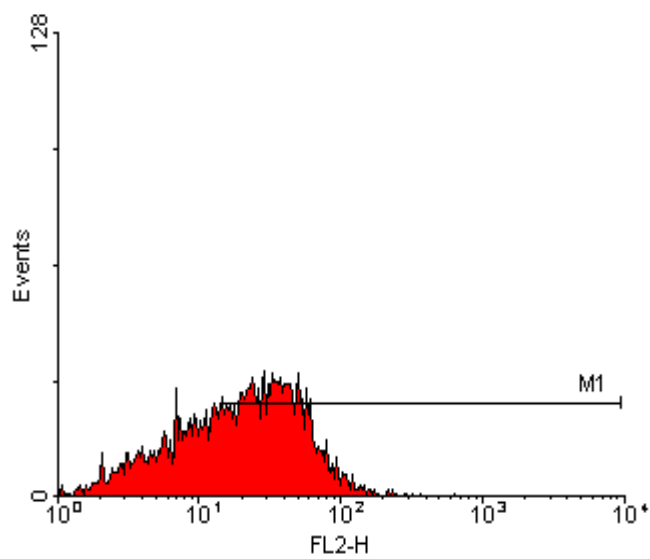


Abb.20a:
Histogramm: HUVECs-Markierung
mit CD62 E PE nach einer 5-stündigen
mit 10 U/ml TNF mit Cariporide
FL2: Fluoreszenzintensität

3.2.3 Vergleich: E-Selektin-Expression mit und ohne Cariporide

Beim Vergleich der durch TNF-alpha induzierten E-Selektin-Expression mit und ohne den Einfluss von Cariporide ist deutlich die geringere Fluoreszenz bei den HUVECs, welche mit Cariporide behandelt wurden (durchgehende Linie) im Vergleich zur höheren Fluoreszenz bei den HUVECs ohne den Einfluss von Cariporide (gestrichelte Linie) zu erkennen.

In der statistischen Auswertung wurde bei der Kontrollgruppe ohne den Einfluss von Cariporide bei der Stimulation mit TNF-alpha ein $p < 0,001$ ermittelt. In der Cariporide-Gruppe hatte TNF-alpha keinen signifikanten Einfluss auf die Expression von E-Selektin ($p = 0,842$). Der Unterschied zwischen beiden Gruppen war bei TNF-Konzentrationen von 10, 25 und 100 U/ml signifikant.

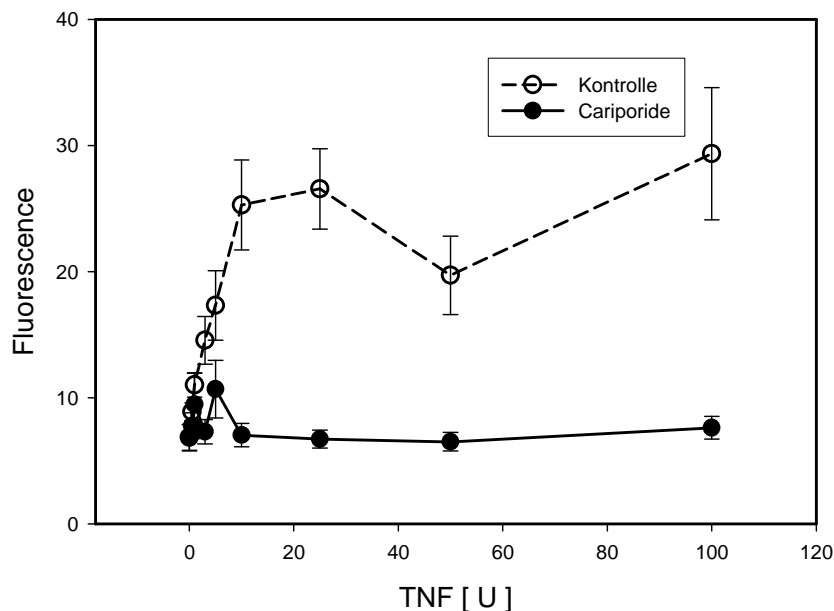


Abb.21:
Vergleich: CD62E-Darstellung auf HUVECs mit
und ohne Cariporide unter dosisabhängiger
Stimulation mit TNF-alpha

3.3 Nachweis von intrazellulärem Kalzium durch Fluo-4 im Medium ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$

Bei diesem Versuch wurden Endothelzellen im kalziumfreien Medium in einer zeitabhängigen Studie mit einer submaximalen Stimulationsaktivität von 50 U/ml TNF-alpha stimuliert.

3.3.1 Nachweis von intrazellulärem Kalzium durch Fluo-4 im Medium ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ ohne Cariporide

In den Abbildungen 22 - 24 sind jeweils Beispiele eines Versuchsansatzes bezüglich des intrazellulären Kalziumnachweises in Endothelzellen im kalziumfreien Medium in einer Zeitstudie nach einer submaximalen Stimulation mit 50 U/ml TNF-alpha dargestellt.

Dabei sind links die Dotplots und rechts jeweils das dazugehörige Histogramm abgebildet.

Es ist keine Änderung der intrazellulären Kalziumkonzentration zu erkennen.

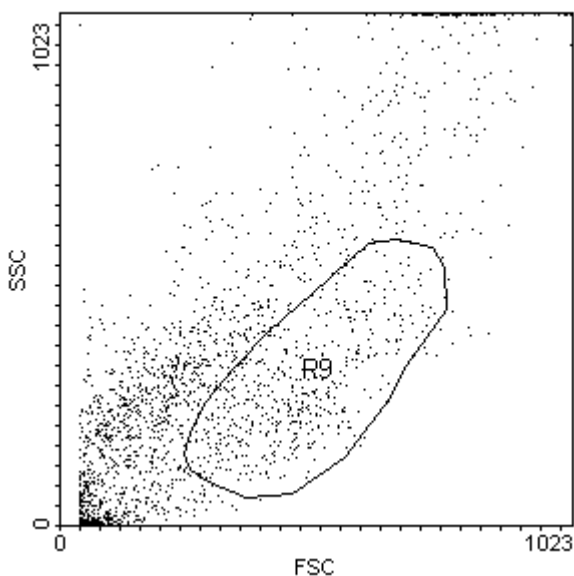


Abb.22:
Dotplot
FSC: forward scatter
SSC: side scatter

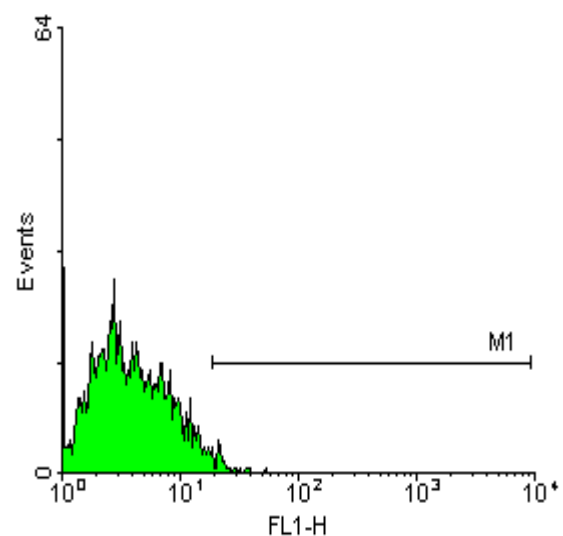


Abb.22a:
HUVECs ohne Fluo-4
im Medium ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$
FL1: Fluoreszenzintensität

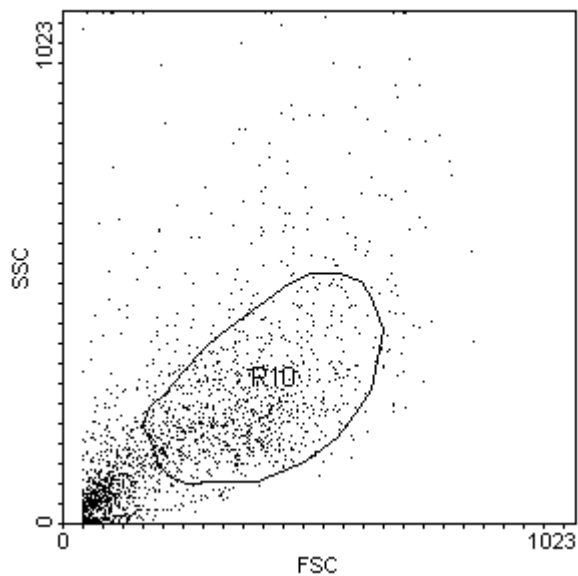


Abb.23:
Dotplot
FSC: forward scatter
SSC: side scatter

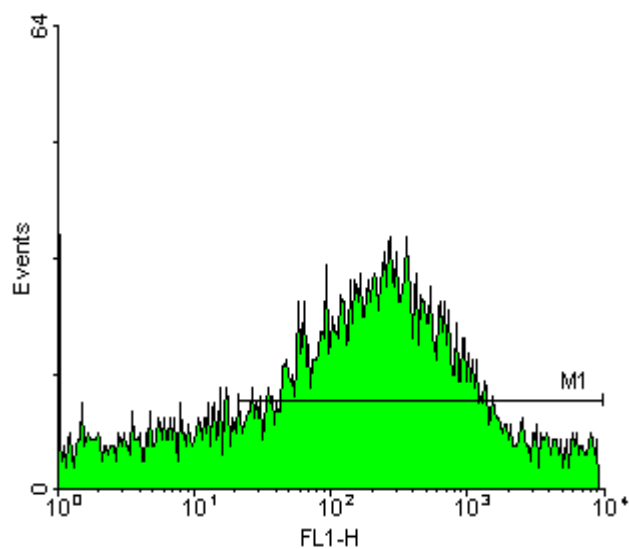


Abb.23a:
Histogramm: HUVECs –Fluo-4
markiert nach 1-minütiger Stimulation
mit 50U/ml TNF-alpha ohne
Cariporide im Medium ohne Ca²⁺/Mg²⁺

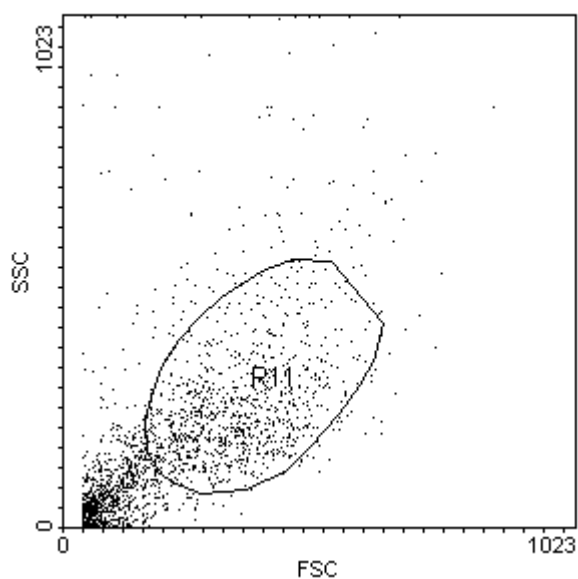


Abb.24:
Dotplot
FSC: forward scatter
SSC: side scatter

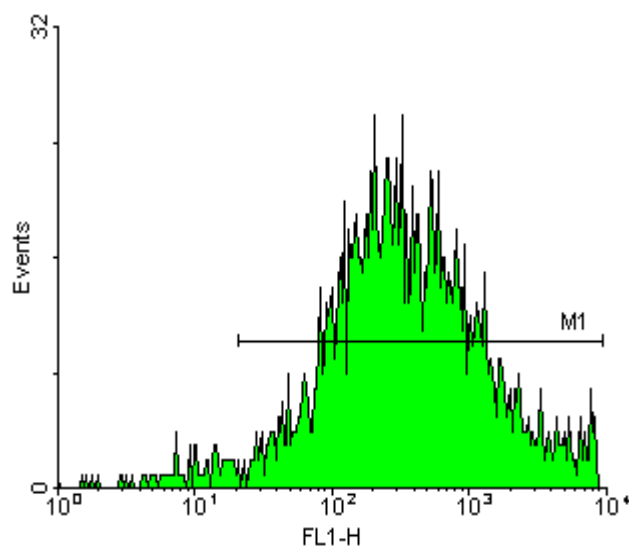


Abb.24a:
Histogramm: HUVECs –Fluo-4
markiert nach 10-minütiger Stimulation
mit 50 U/ml TNF-alpha ohne
Cariporide im Medium ohne Ca²⁺/Mg²⁺

3.3.2 Nachweis von intrazellulärem Kalzium durch Fluo-4 im Medium ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ mit Cariporide

In den Abbildungen 25 - 26 sind jeweils Beispiele eines Versuchsansatzes bezüglich des intrazellulären Kalziumnachweises in Endothelzellen im kalziumfreien Medium in einer Zeitstudie nach einer submaximalen Stimulation mit 50 U/ml TNF-alpha unter dem Einfluss von Cariporide dargestellt.

Auch hier ist keine signifikante Änderung der intrazellulären Kalziumkonzentration zu erkennen.

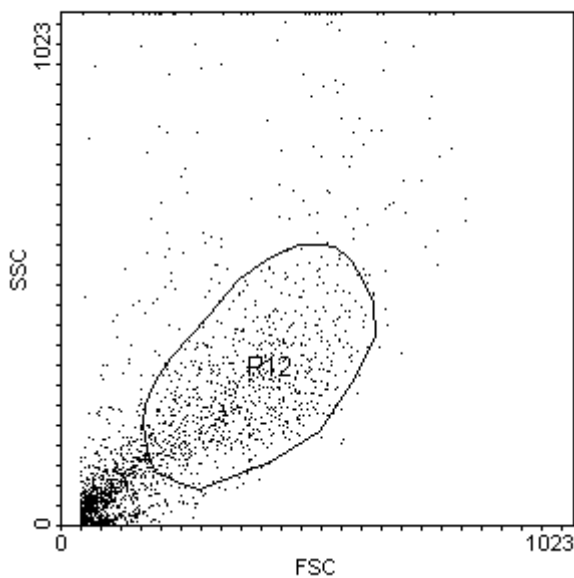


Abb.25:
Dotplot
FSC: forward scatter
SSC: side scatter

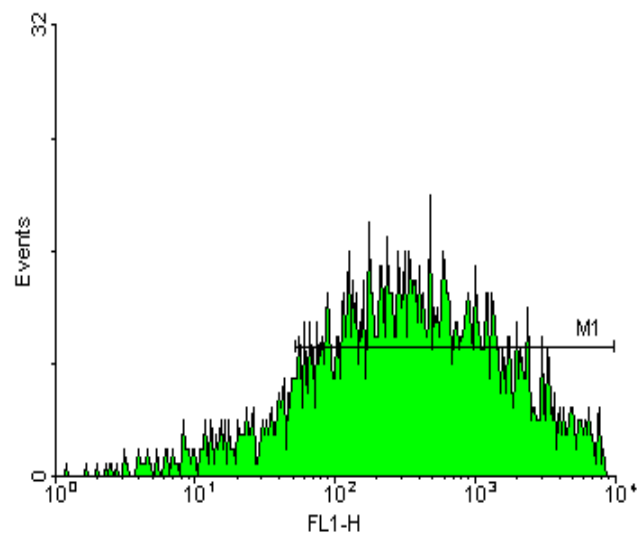


Abb.25a:
Histogramm: HUVECs –Fluo-4
markiert nach 1-minütiger Stimulation
mit 50 U/ml TNF-alpha mit Cariporide
im Medium ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$
FL1: Fluoreszenzintensität

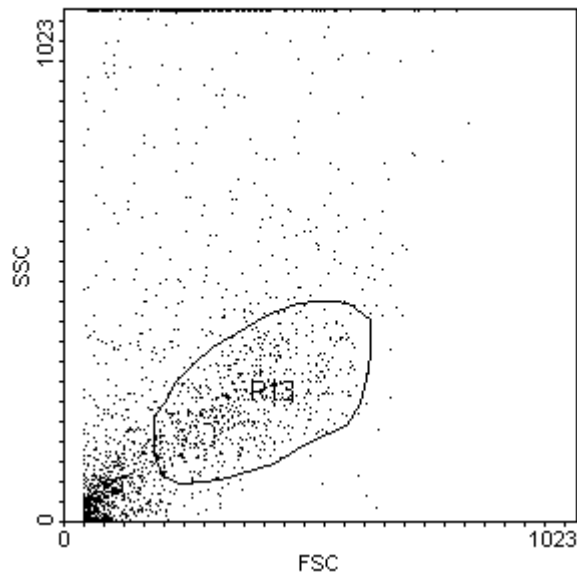


Abb.26:
Dotplot
FSC: forward scatter
SSC: side scatter

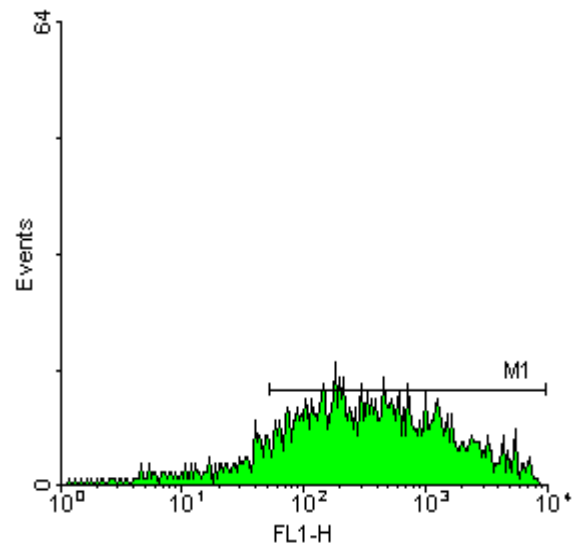


Abb.26a:
Histogramm: HUVECs –Fluo-4
markiert nach 10-minütiger Stimulation
mit 50 U/ml TNF-alpha mit Cariporide
im Medium ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$
FL1: Fluoreszenzintensität

3.3.3 Vergleich: Fluo-4-Markierung mit und ohne Cariporide

Im Medium ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ hat Cariporide keinen Einfluss auf die zytosolische Kalziumkonzentration. TNF-alpha induziert keine Änderung der Kalziumkonzentration, weder mit noch ohne Cariporide.

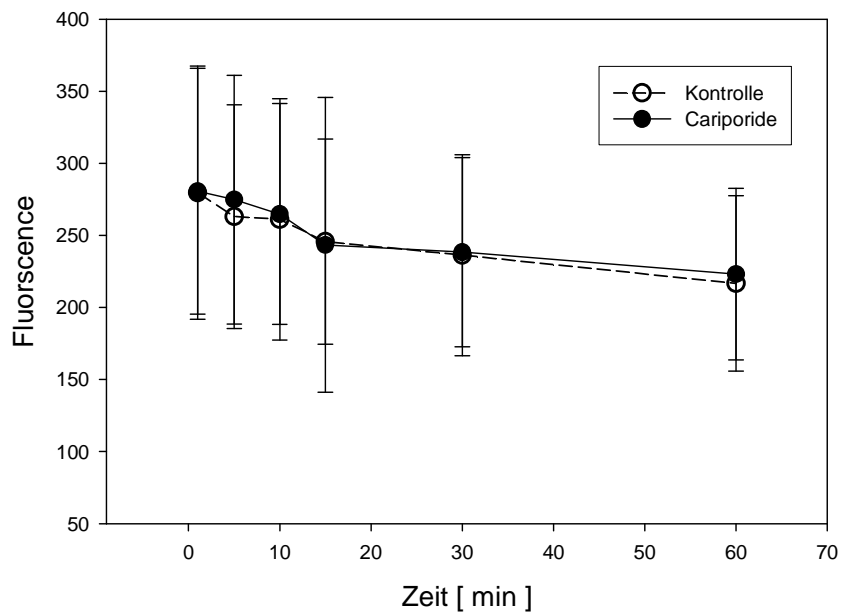


Abb.27:
Vergleich: Fluo-4-Markierung in HUVECs mit
und ohne Cariporide unter zeitabhängiger
Stimulation mit 50 U/ml TNF-alpha im
kalziumfreien Medium

3.4 Nachweis von intrazellulärem Kalzium durch Fluo-4 im Medium mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$

Bei diesem Versuch wurden Endothelzellen in kalziumhaltigem Medium in einer zeitabhängigen Studie mit einer submaximalen Stimulationsaktivität von 50 U/ml TNF-alpha stimuliert.

3.4.1 Nachweis von intrazellulärem Kalzium durch Fluo-4 im Medium mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ ohne Cariporide

In den Abbildungen 28 - 30 sind jeweils Beispiele eines Versuchsansatzes bezüglich des intrazellulären Kalziumnachweises in Endothelzellen in kalziumhaltigem Medium in einer Zeitstudie nach einer submaximalen Stimulation mit 50 U/ml TNF-alpha dargestellt.

Es ist dabei keine wesentliche Änderung der intrazellulären Kalziumkonzentration zu erkennen.

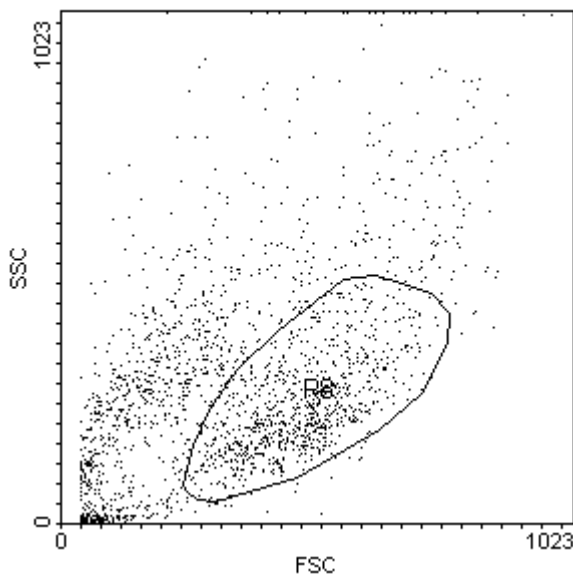


Abb.28:
Dotplot
FSC: forward scatter
SSC: side scatter

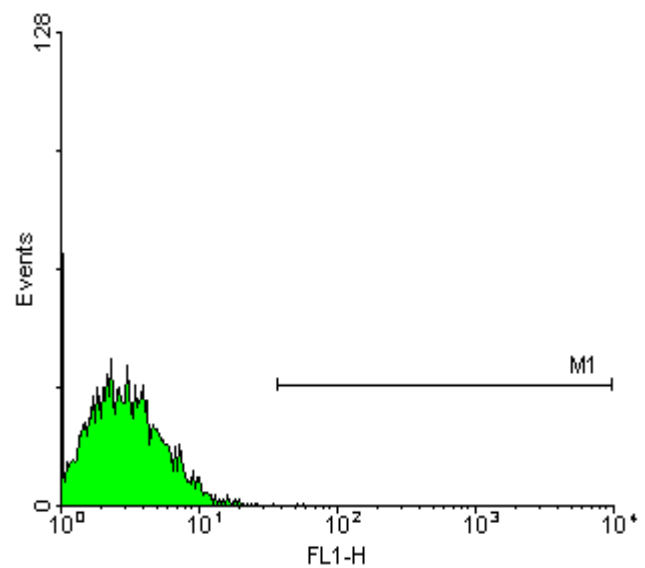


Abb.28a:
Histogramm: HUVECs ohne Fluo-4
nur im Medium mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$
FL1: Fluoreszenzintensität

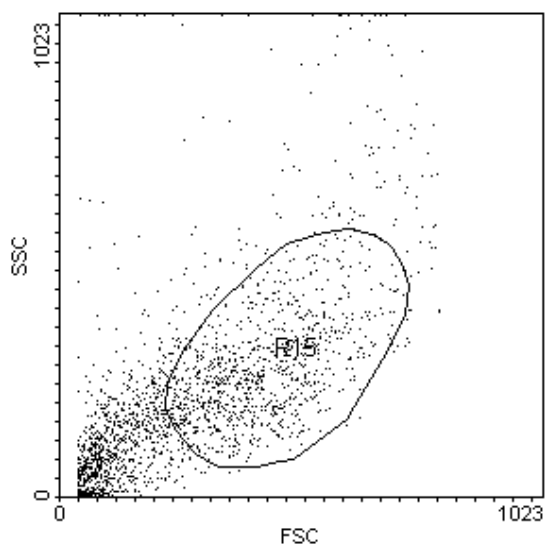


Abb.29:
Dotplot
FSC: forward scatter
SSC: side scatter

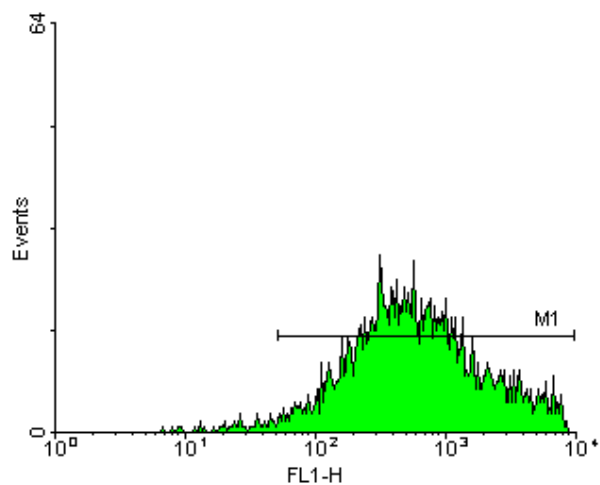


Abb.29a:
Histogramm: HUVECs –Fluo-4
markiert nach 1-minütiger Stimulation
mit 50 U/ml TNF-alpha ohne
Cariporide im Medium mit Ca²⁺/Mg²⁺
FL1: Fluoreszenzintensität

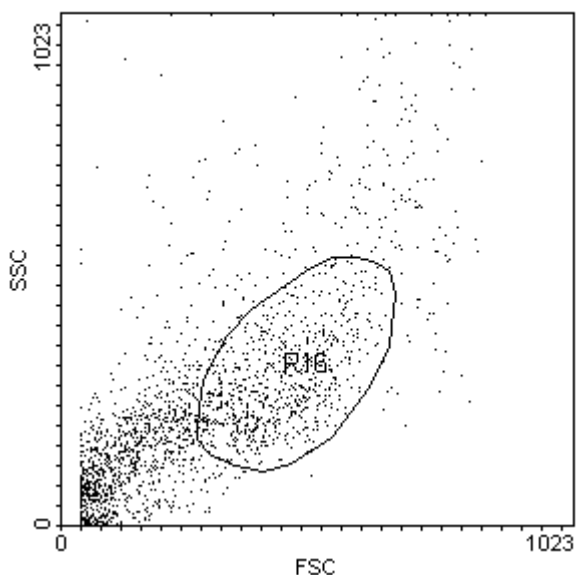


Abb.30:
Dotplot
FSC: forward scatter
SSC: side scatter

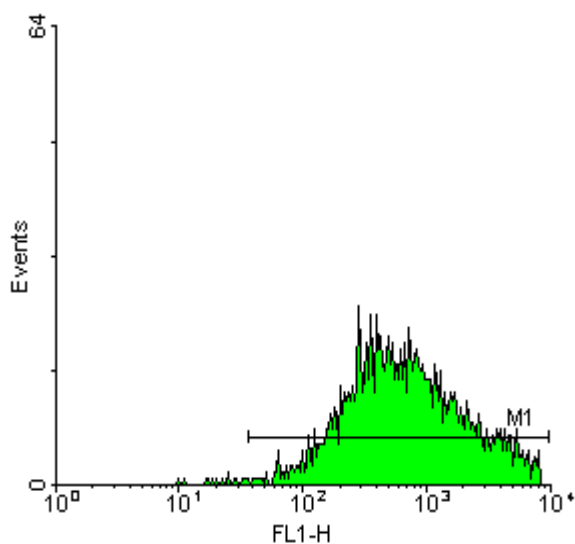


Abb.30a:
Histogramm: HUVECs –Fluo-4
markiert nach 10-minütiger Stimulation
mit 50 U/ml TNF-alpha ohne
Cariporide im Medium mit Ca²⁺/Mg²⁺
FL1: Fluoreszenzintensität

3.4.2 Nachweis von intrazellulärem Kalzium durch Fluo-4 im Medium mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ mit Cariporide

In den Abbildungen 31 - 32 sind jeweils Beispiele eines Versuchsansatzes bezüglich des intrazellulären Kalziumnachweises in Endothelzellen in kalziumhaltigem Medium in einer Zeitstudie nach einer submaximalen Stimulation mit 50 U/ml TNF-alpha unter dem Einfluss von Cariporide dargestellt.

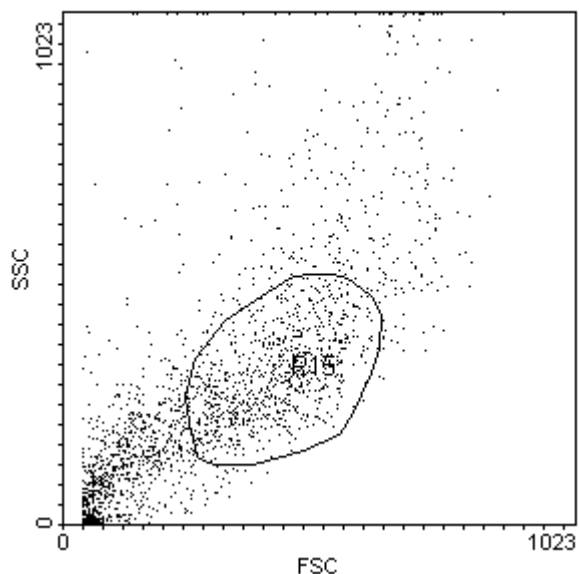


Abb.31:
Dotplot
FSC: forward scatter
SSC: side scatter

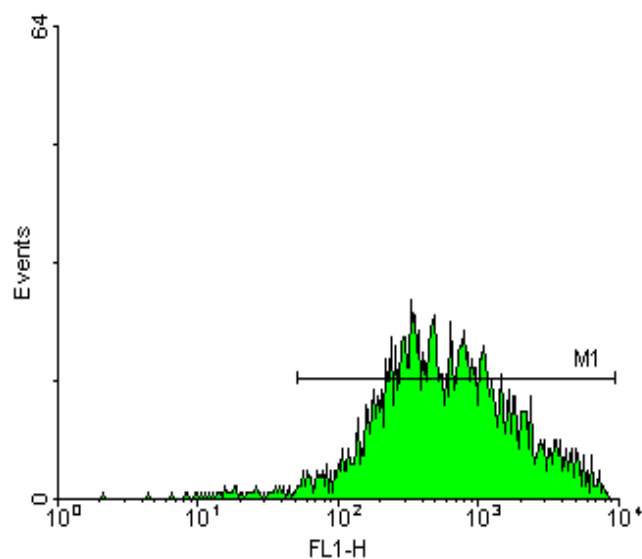


Abb.31a:
Histogramm: HUVECs-Fluo-4
markiert nach 1-minütiger Stimulation
mit 50 U/ml TNF-alpha mit Cariporide
im Medium mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$
FL1: Fluoreszenzintensität

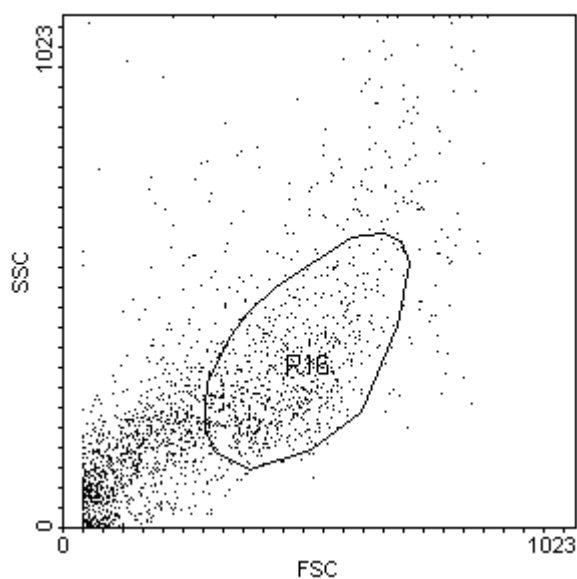


Abb.32:
Dotplot
FSC: forward scatter
SSC: side scatter

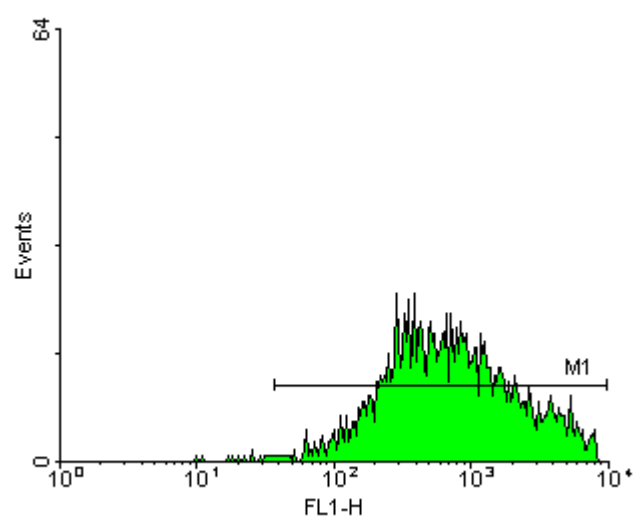


Abb.32a:
Histogramm: HUVECs-Fluo-4
markiert nach 10-minütiger Stimulation
mit 50 U/ml TNF-alpha mit Cariporide
im Medium mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$
FL1: Fluoreszenzintensität

3.4.3 Vergleich: Fluo-4-Markierung mit und ohne Cariporide mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$

Im Vergleich zu den Zellen, die im kalziumfreien Medium kultiviert worden waren, fällt hier in der Kontrollgruppe ohne Cariporide die deutlich höhere Fluoreszenzintensität auf. Beim Vergleich der zeitabhängigen Darstellung des intrazellulären Kalziumgehaltes mit TNF-alpha im kalziumhaltigen Medium ist zum Zeitpunkt 0 in der Cariporide-Gruppe die Kalziumkonzentration erniedrigt. Betrachtet man die Graphen über die Zeit unter dem Einfluss von TNF-alpha, bewirkt die Stimulation mit TNF-alpha keine Änderung der zytosolischen Kalziumkonzentration mit oder ohne Cariporide.

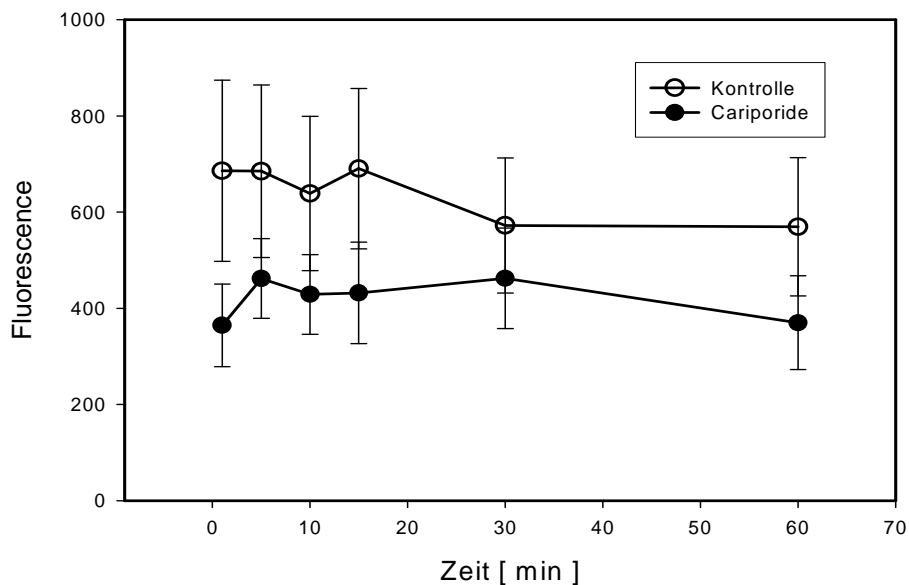


Abb.33:
Vergleich: Fluo-4 Markierung in HUVECs mit und ohne Cariporide unter zeitabhängiger Stimulation mit 50 U/ml TNF-alpha im kalziumhaltigen Medium

IV. DISKUSSION

4.1 Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse

Die Ergebnisse basieren auf in vitro Untersuchungen an humanen Epithelzellen (HUVEC) mittels FACS.

Wir simulierten eine Entzündungsreaktion auf HUVECs mit TNF-alpha. Dabei konnte eine vermehrte Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 (CD54) und E-Selektin (CD62E) nachgewiesen werden.

Cariporide supprimierte die von TNF-alpha induzierte Expression von ICAM-1 und E-Selektin.

Im zweiten Versuchsabschnitt wurde gezeigt, daß die zytosolische Kalziumkonzentration von HUVECs durch Kultur im kalziumfreien Medium deutlich vermindert wird. Weder TNF-alpha noch Cariporide hatte in diesen Zellen einen Einfluß auf die zytosolische Kalziumkonzentration. Im kalziumhaltigen Medium bewirkte Cariporide einen deutlichen Abfall der zytosolischen Kalziumkonzentration. TNF-alpha hatte auch in diesen Zellen mit oder ohne Cariporide keinen Effekt auf die zytosolische Kalziumkonzentration.

4.2 Ischämie und Reperfusion

4.2.1 Der akute und subakute Reperfusionsschaden bei Ischämie/ Reperfusion

Bei Myokardischämie zielen alle therapeutischen Bemühungen auf eine schnelle und wirksame Reperfusion des ischämischen Gewebes (Boyle und Weisman, 1993), in der Regel durch medikamentöse (Fibrinolyse) und mechanische (PTCA, Stentimplantationen, Bypass-Operationen) Interventionen (Koren et al., 1985, Weaver et al., 1997) ab.

Die Reperfusion, also die Wiederherstellung des Blutflusses in einem ischämischen Areal ist einerseits unerlässlich um Nekrosen zu verhindern oder deren Ausdehnung zu reduzieren, kann aber andererseits auch selbst zu einer Schädigung des Myokards beitragen.

Die Reoxygenierung des Herzmuskelgewebes in der frühen Phase der Reperfusion kann paradoxerweise zu einem zusätzlichen funktionellen Zellschaden (negative Inotropie) und sogar zu strukturellen Schäden (Zellnekrosen) führen, die durch unterschiedliche Zelltypen und pathologische Stoffwechselprozesse im Myokard hervorgerufen werden (Entman und Smith, 1994). Der funktionelle Schaden ist meist reversibel und wird als „myocardial stunning“

bezeichnet, der strukturelle Schaden ist oft irreversibel und wird der Schädigung durch Myokardinfarkt zugeordnet (Lefer und Granger, 2000).

Man unterscheidet den

- akuten und
- subakuten Reperfusionsschaden:

An der Pathogenese des myokardialen Reperfusionsschadens sind ortsständige Zellen wie Endothelzellen, Makrophagen, Mastzellen und Kardiomyozyten, aber auch infiltrierende Entzündungszellen (Monozyten und andere Leukozyten) in gegenseitiger Interaktion beteiligt (Lucchesi, 1990). Diese bilden reaktive Sauerstoff-Verbindungen (ROS), welche die Gefäßendothelien und die Kardiomyozyten direkt schädigen können.

Die ROS besitzen einen direkten, depressiven Effekt auf die myokardiale Pumpfunktion, der auf einer gestörten Kalzium-Verteilung im Zytosol und den intrazellulären Speichern (Sarkoplasmatisches Retikulum, Mitochondrien) beruht.

In der Summe der Ereignisse erhöht sich die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration und verursacht eine Kalzium-Überladung der Kardiomyozyten mit einer initial diastolischen und später auch systolischen Dysfunktion (Meldrum, 1998).

Die ROS induzieren auch chemische Veränderungen des kontraktile Apparates (Aktin- und Myosinfilamente, Tropomyosin, Troponin) wodurch die Sensitivität der kontraktile Proteine für Kalzium-Ionen abnimmt. Beide Mechanismen zusammen – die Kalzium-Überladung und die Kalzium-Desensitivierung – tragen zum „myocardial stunning“ bei, das über Stunden und Tage nach der Reperfusion anhalten kann und als akuter reversibler Reperfusionsschaden gilt (Bolli, 1990).

Bei stärkeren funktionellen und metabolischen Schäden der Herzmuskelzellen durch lang anhaltende Ischämien und eine extrem hohe Radikal-Bildung in der anschließenden Reperusionsphase ist der Übergang zu irreversiblen Schäden mit Einzelzellnekrosen und Infarktarealen vorgezeichnet.

In der subakuten Phase des Reperfusionsschadens lösen zahlreiche Mediatoren, wie z.B. Tumornekrose-Faktor- α , Interleukine (z.B. IL-6), Plättchen aktivierender Faktor (PAF) und reaktive Sauerstoffspezies (ROS), die während Ischämie und Reperfusion in dem betroffenen Areal gebildet bzw. eingeschwemmt werden, eine Entzündungsreaktion aus (Reil, 2005).

Den von den Sauerstoffradikalen aktivierten gewebsständigen Makrophagen kommt dabei eine zentrale Rolle im weiteren Entzündungsgeschehen zu. Sie entfalten eine starke proinflammatorische Wirkung, welche die Adhäsionskaskade und damit die Entzündungsreaktion aktiviert (Frangogiannis, 2006, Kupatt, et al., 2000, Ren, et al., 2003).

4.2.2 TNF-alpha als Schlüsselmediator der postischämischen Entzündungsreaktion

TNF- α spielt eine Schlüsselrolle im Ablauf dieser Entzündungsreaktion (Vilcek und Lee, 1991). Als Stimuli für die TNF- α -Bildung und -Freisetzung in speziellen Zellen des Immunsystems (z.B. Makrophagen) und Geweben (Organparenchym) werden Endotoxine und Viren (Giroir et al., 1992, Kapadia et al., 1995, Mann, 2001), Sauerstoffradikale (Lefer und Granger, 2000), Gewebe-Verletzungen nach Verbrennungen ("burn shock") (Mann, 2003) und Dehnungsreize der Herzmuskelfasern nach Druck- und Volumenbelastung (Kapadia et al., 1997) genannt.

Neben der Einleitung einer Entzündungsreaktion bei der Abwehr von mikrobiellen Erregern bestehen Untersuchungen, welche TNF- α auch bei nichtinfektiösen Schädigungen des Herzens eine wichtige Rolle zuweisen. TNF- α kann grundsätzlich in allen kernhaltigen Organzellen gebildet werden, ohne dass das Immunsystem über eine Entzündungsreaktion gestartet oder primär beteiligt werden muss (Kubota et al., 1997, Mann, 2001).

Der Mechanismus der TNF- α -Bildung ist für Makrophagen gut beschrieben, gilt aber prinzipiell auch für die Kardiomyozyten (Meldrum, 1998). In den meisten Zellen liegt das TNF- α -Gen inaktiv („silent gene“) vor und muß erst durch einzelne Stimuli über spezielle intrazelluläre Signalkaskaden aktiviert werden. In der Reperfusionphase haben die ROS eine Schlüsselrolle über ihre Wirkung auf die Genexpression und Sekretion von TNF- α . Durch Ischämie geschädigte Myokardzellen führen in der frühen Reperfusionphase eine inkomplette Sauerstoffreduktion innerhalb der Atmungskette durch und bewirken dadurch eine erhöhte Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) (Reil, 2005).

Bei Ischämie/Reperfusion permeieren die reaktiven Sauerstoffspezies die Zellmembran direkt und greifen in den intrazellulären Signalweg auf der Ebene der NF- κ B-Aktivierung ein, was zur TNF- α -Bildung führt (s. Abb. 34). Die ROS können auf diese Weise direkt im Zytosol NF- κ B aktivieren (Chandrasekar und Freeman, 1997, Guyton et al., 1996, Hattler et al., 1995). NF- κ B transloziert aber auch in den Zellkern und führt zur Transkription unter anderem des TNF- α -Gens. Die transkribierte TNF- α m-RNA wird im rauen Endoplasmatischen Retikulum zum Pro-TNF- α translatiert und in die Zellmembran inseriert (Dinarello und Margolis, 1995). Das TNF- α -

Cleaving-Enzyme (TACE) führt zum “shedding” des membrangebundenen TNF- α und setzt es damit in das Interstitium frei (Black et al., 1997, Moss et al., 1997).

Für die TNF- α -Produktion und -Freisetzung im Herzmuskel werden unterschiedliche Zelltypen verantwortlich gemacht. An einem experimentellen Hundeherz-Modell konnten Mastzellen als TNF- α -freisetzende Zellen in einer Frühphase der Ischämie identifiziert werden (Frangogiannis et al., 1998). Durch immunhistologische Analysen wurde gezeigt, daß diese Zellspezies durch Degranulation bereits präformiertes TNF- α in die Umgebung freisetzt (Walsh et al., 1991). Andere Autoren fanden in der postischämischen Reperfusionphase Kardiomyozyten, Gefäßendothelien und Makrophagen als Bildungsort von TNF- α (Gurevitch et al., 1997, Kapadia, et al., 1995).

Wieso TNF- α eine so entscheidende Rolle in der Aktivierung der Entzündungsreaktion darstellt konnte auch gut in einer Studie von Kupatt dargestellt werden: in einem ex-vivo Modell wurden isolierte Herzen einer 15-minütigen Ischämie mit anschließender Reperfusion unterzogen. Im Gewebe dieser Herzen konnte eine erhöhte Aktivität von NF- κ B und eine gesteigerte Expression von ICAM-1 mRNA nachgewiesen werden. Dies ging mit einer 2,5-fach verstärkten Leukozytenadhäsion an venolären Endothelzellen einher. Durch Inhibition von NF- κ B konnten sowohl die Expression von ICAM-1, als auch die gesteigerte Leukozytenadhäsion supprimiert werden. Ähnliche Effekte konnten durch Inhibition von TNF- α dargestellt werden. Diese Untersuchungen konnten also eine Schlüsselrolle von TNF- α bei der Aktivierung der Entzündungskaskade in der subakuten Phase nach Ischämie/Reperfusion nachweisen (Kupatt et al., 2000, Kupatt et al., 1999). Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit ebenfalls TNF- α zur Aktivierung der kultivierten Endothelzellen eingesetzt. Die These, dass TNF- α bei der Induktion der inflammatorischen Reaktion nach Ischämie und Reperfusion die Schlüsselrolle spielt, wird auch durch eine in vitro-Studie unterstützt, in der TNF- α im Vergleich zu anderen proinflammatorischen Zytokinen (IL-1-alpha und -beta) die stärkste Expression von ICAM-1 auf Endothelzellen induzierte (Poher, 1987). Auf Grundlage dieser Vorbefunde wurde in der vorliegenden Arbeit ebenfalls TNF- α zur Aktivierung der kultivierten Endothelzellen eingesetzt. Die These einer starken inflammatorischen Reaktion im Rahmen der Ischämie und Reperfusion des Myokards wurde auch in zahlreichen klinischen Studien untermauert. So konnten bei Patienten mit Myokardinfarkt in der Phase des subakuten Reperfusionsschadens deutlich erhöhte Pasmakonzentrationen von IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α , sowie von löslichem E-Selektin und ICAM-1 gemessen werden. Dabei wurden 24 Patienten über 96 Stunden nach einem akuten Myokardinfarkt beobachtet. Die TNF- α Konzentration war während des gesamten

Beobachtungszeitraum mit einem Mittelwert von 46,8 pg/ml (Normalwert: ca. 4,35 pg/ml) massiv erhöht. Auch die Konzentration löslichen E-Selektins war mit 145,1 ng/ml (Normalwert: 29,1-63,4 ng/ml) deutlich erhöht. Die ICAM-1-Konzentration stieg nur langsam (Pudil et al., 1999).

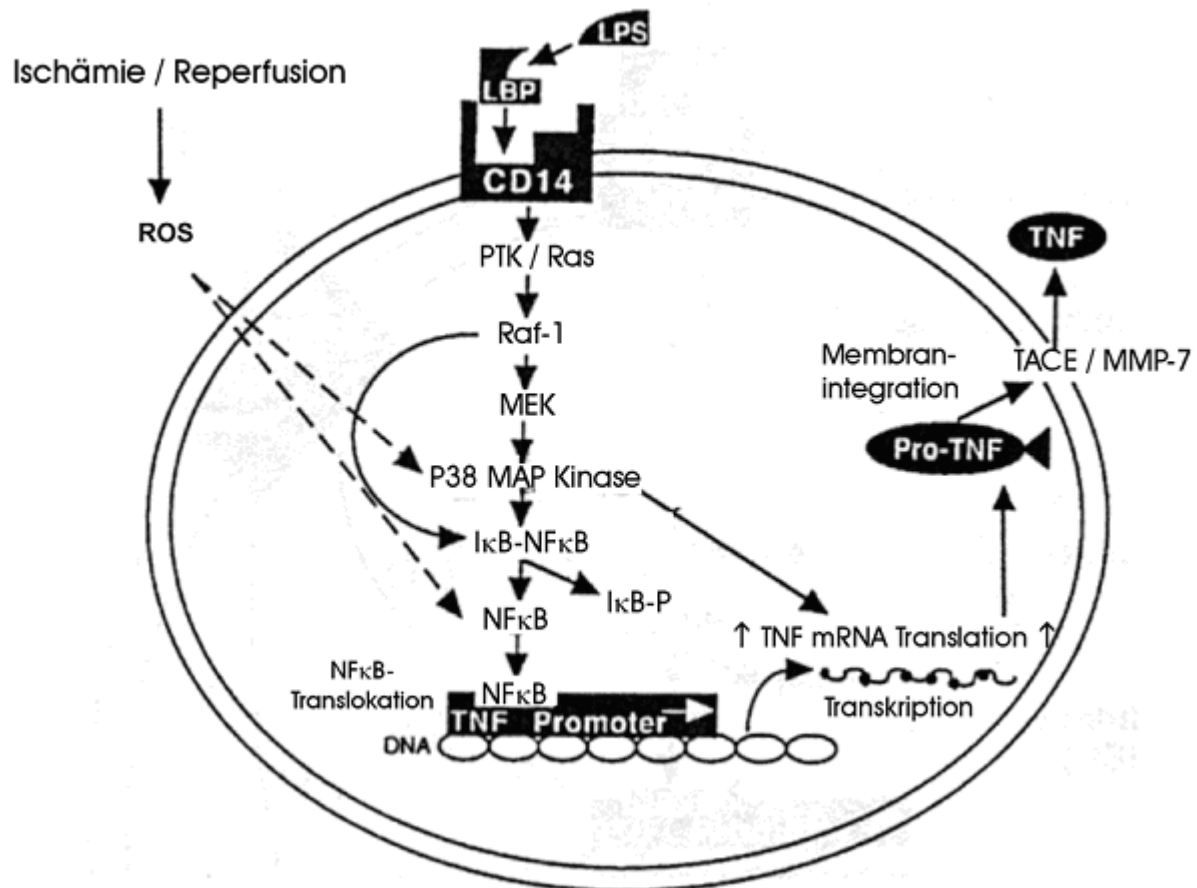


Abb.34 : Schema der Regulation der TNF- α -Freisetzung (modifiziert nach Meldrum 1998)

4.2.3 Cariporide als mögliches Therapeutikum zur Supprimierung des subakuten Reperfusionsschadens

Unsere Untersuchungen basieren auf den bisher bekannten Mechanismen der Induktion des subakuten Gewebeschadens nach Ischämie/Reperfusion. Aufgrund der oben genannten Zusammenhänge, simulierten wir demnach eine Entzündungsreaktion durch Stimulation von HUVECs mit TNF- α und untersuchten daraufhin die potentiellen antiinflammatorischen Effekte des NHE-Inhibitors Cariporide. TNF- α induzierte eine deutlich vermehrte Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und E-Selektin bei HUVEC-Zellen. Cariporide supprimierte in

unserer Studie die von TNF- α induzierte Expression von ICAM-1 und E-Selektin, und somit zwei unverzichtbare Schritte der Adhäsionskaskade. Unsere Ergebnisse bestätigen die in früheren Studien formulierte Hypothese einer Supprimierung der Adhäsionskaskade durch Cariporide und identifizieren die Expression der endothelialen Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und E-Selektin als wahrscheinlichste Targets dieses Effekts.

Eine durch Cariporide verringerte L-Selektin Expression auf Leukozyten war, wie bereits in der Einleitung beschrieben, ebenso bekannt, wie eine verringerte P-Selektin Expression. Dabei wurde mit Thrombin die Adhäsionskaskade im Rattenversuch ausgelöst und Leukozytenrollen, -Adhäsion und -Extravasion beobachtet. Bei Ratten, welche mit Cariporide behandelt waren, konnte eine Reduktion des Leukozytenrollens beobachtet werden was gut zu der ebenfalls gezeigten verringerten Expression von P-Selektin passt (Buerke et al., 2008).

In einer weiteren in vitro-Studie wurden glatte Gefäßmuskelzellen durch LPC (Lysophosphatidylcholin) zur Expression der Adhäsionskaskade stimuliert. Die ICAM-1 Expression wurde dabei mit ELISA registriert. Bei mit Cariporide behandelten Zellen konnte eine verringerte ICAM-1-Expression und dazu passend eine verringerte Adhäsion von Monozyten an den glatten Muskelzellen beobachtet werden (Li, et al., 2006).

Einen weiteren Hinweis auf eine mögliche anti-inflammatorische Wirkung von Cariporide durch Verminderung der Expression von Adhäsionsmolekülen gibt eine in-vitro-Studie, bei der eine verminderte Expression von ICAM-1 auf Endothelzellen sowie eine verminderte Adhäsion von Monozyten beschrieben wurden. Allerdings war der pro-inflammatorische Stimulus in dieser Studie eine Hyperglykämie, so dass die Ergebnisse wie die der anderen o.g. Studien nicht direkt auf den Ischämie-Reperfusionsschaden im Myokard übertragen werden können (Wang et al., 2006).

Eine Studie deren Protokoll der Situation des Ischämie/Reperfusionsschadens am nächsten kommt wurde an der Kansai Medical University, Moriguchi, in Japan in einem in vitro Ansatz durchgeführt: Endothelzellen aus den Koronararterien von Ratten wurden dabei einer 30-minütigen Hypoxie mit anschließender Reoxigenierung unterzogen. Dabei konnte eine vermehrte Expression von ICAM-1-mRNA nachgewiesen werden und diese wurde signifikant durch Cariporide oder Inkubation der Zellen in kalziumfreien Medium supprimiert. Diese Ergebnisse zeigen somit einen Zusammenhang zwischen der endothelialen zytosolischen Kalziumkonzentration, der ICAM-1 Expression und dem NHE (Hattori et al., 2001).

4.2.4 Mögliche Mechanismen der Wirkung von Cariporide

Während Ischämie/ Reperfusion kommt es in Gefolge des durch Hypoxie ausgelösten anaeroben Metabolismus und der folgenden intrazellulären Azidose zur schnellen Aktivierung des NHE1, der die intrazelluläre Protonenkonzentration im Austausch gegen Natrium absenkt. Der erhöhte intrazelluläre Natriumgehalt wird demzufolge durch Aktivierung des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers gesenkt, was eine erhöhte zytosolische Kalziumkonzentration zur Folge hat, die während der gesamten Ischämie bestehen bleibt (Linz und Busch, 2003). Diese Prozesse werden durch zunehmende Angleichung der intra- und extrazellulären Protonen- und Kalziumkonzentrationen begrenzt.

Mit Beginn der Reperfusion werden die extrazellulären Protonen- und Kalziumkonzentrationen rasch normalisiert, wodurch die Konzentrationsgradienten für die oben beschriebenen Austauschvorgänge über den NHE und den $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher wieder hergestellt werden, sodass es zu einem weiteren massiven Kalziumeinstrom in die Kardiomyozyten kommt. Die erhöhte intrazelluläre Kalziumkonzentration kann direkten Zelltod vermitteln, indem zum Einem Proteasen aktiviert werden und zum Anderen die Zellen hyperkontrahieren können wodurch die Zellmembranen rupturieren.

Durch Inhibition des Na^+/H^+ -Austauscher durch einen selektiven NHE-Inhibitoren kann der Kalziumeinstrom in Kardiomyozyten im Rahmen von Ischämie und Reperfusion vermindert werden. Dies kann ein Schutzmechanismus für das Myokard nach Ischämie/Reperfusion sein, wie mehrere experimentelle Studien zeigen:

Isoliert perfundierte Rattenherzen wurden einer 30-minütigen Ischämie ausgesetzt, welcher eine 30-minütige Reperfusion folgte. Ein Teil der Ratten erhielt in der Phase der Reperfusion Cariporide. Der Versuch konnte eine verbesserte Myokardfunktion und eine Verminderung der intrazellulären Kalziumkonzentration in Kardiomyozyten im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigen (Stromer, et al., 2000).

Ein ähnliches Ergebnis konnte eine experimentelle Studie aufzeigen, in der isolierte Kaninchenherzen einer 60-minütigen Ischämie mit folgender 60-minütiger Reperfusion unterzogen wurden. Im Vergleich zur Kontrollgruppe waren dabei in der Cariporide-Gruppe sowohl die Konzentrationen von CK, CK-MB und LDH ($p < 0.05$) im koronarvenösen Effluat, als auch die intrazelluläre Kalziumkonzentration (265.8 ± 41.1 vs 408.5 ± 56.8 mg/kg Trockengewicht; $p < 0.05$) deutlich reduziert. Elektronenmikroskopisch konnte, dazu passend, eine Reduktion der ultrastrukturellen Schädigung der Kardiomyozyten in der Cariporide-Gruppe nachgewiesen werden (Zhou et al., 2008).

Eine vergleichbare Studie an isolierten Kaninchenherzen aus China bestätigt dieses Ergebnis: nach einer 60-minütigen Ischämie folgte eine 45-minütige Reperfusion in der Kontrollgruppe und in einer mit Cariporide vorbehandelten Gruppe. Der linksventrikuläre entwickelte Druck (LVDP) und der Koronarfluss erreichten in der Reperfusionsphase ca. 90% des Ausgangswerts in der Cariporide-Gruppe, dagegen nur um 50% in der unbehandelten Kontrollgruppe ($p < 0.05$). Die Konzentrationen von CK, CK-MB und LDH im koronarvenösen Effluat sowie die intrazelluläre Kalziumkonzentration (265.8 ± 41.1 vs. 500.7 ± 60.8 mg/l) waren ebenfalls in der Cariporide-Gruppe ($p < 0.05$) reduziert. Elektronenmikroskopisch konnte wiederum in der Cariporide-Gruppe eine Reduktion der ultrastrukturellen Schädigung der Kardiomyozyten nachgewiesen werden. Die Autoren schließen aus diesen Ergebnissen, dass die Reduktion des intrazellulären Kalziumgehaltes den Schutzmechanismus von Cariporide bei Ischämie/Reperfusion darstellt (Cun et al., 2007).

Dieser Schutzmechanismus durch Verminderung des intrazellulären Kalziumgehaltes durch Blockierung des Na^+/H^+ -Austauschers ist u.a. durch in vitro-Untersuchungen bestätigt worden (Zhang et al., 2005).

Die oben aufgeführten Studien zeigen zwar eine protektive Wirkung von Cariporide durch Reduktion der intrazellulären Kalziumkonzentration in Kardiomyozyten während akuter Reperfusion, doch diese Befunde sind nicht direkt auf Endothelzellen und deren pro-inflammatorische Aktivierung im Rahmen des subakuten Reperfusionsschadens übertragbar.

Die Bedeutung der intrazellulären Kalziumkonzentration für die endothelial vermittelte Adhäsionskaskade und die mögliche Bedeutung von Cariporide in diesem Zusammenhang wurden bisher nur unzureichend untersucht.

Eine Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration konnte in kultivierten Endothelzellen, die einer hypoxischen Azidose ausgesetzt waren, nachgewiesen werden. Dabei stellt offensichtlich das endoplasmatische Retikulum die Hauptquelle für die intrazelluläre Erhöhung der Kalziumkonzentration dar (Ladilov et al., 2000).

Eine sehr interessante in vitro-Studie aus Houston, untersuchte HUVECs, bei denen eine erhöhte intrazelluläre Kalziumkonzentration nach Zugabe von Calmodulin-Inhibitoren nachweisbar war. Gleichzeitig war die TNF- α induzierte Expression von E-Selektin erhöht, während die Expression von ICAM-1 vermindert war. Wurden die HUVECs mit einem Kalziumchelator

vorbehandelt, so trat diese Beobachtung nicht ein (Chen et al., 2002). Diese Beobachtungen belegen eine kausale Beteiligung von Kalzium bei der endothelialen Expression von Adhäsionsmolekülen. Dies wird durch eine weitere Studie bestätigt, bei der in HUVECs eine Supprimierung der ICAM-1-Expression bis zu 77,2% durch Calmodulin-Inhibitoren erzielt wurde. Die Autoren dieser Studie sahen in Kalziumkanalblockern eine Möglichkeit der Immunsupprimierung und postulierten ebenfalls Kalzium als möglichen second-messenger in der Aktivierung der Adhäsionskaskade (Hailer et al., 1994).

Aus den genannten Studien ergibt sich also, dass eine Reduktion der endothelialen Kalziumkonzentration die Aktivierung der Adhäsionskaskade bei Ischämie/Reperfusion günstig beeinflussen könnte.

Unsere Ergebnisse zeigen nun, dass Cariporide einerseits die intrazelluläre Kalziumkonzentration unter Normalwert senken konnte und andererseits die durch TNF- α vermittelte Expression von E-Selektin und ICAM-1 blockierte. Ein kausaler Zusammenhang dieser Wirkungen liegt zwar nahe, ist damit aber noch nicht bewiesen. Dies gilt umso mehr als TNF- α keinen Einfluss auf die intrazelluläre Kalziumkonzentration hatte, was, in Übereinstimmung mit den bekannten Signaltransduktionsmechanismen von TNF- α , gegen eine direkte Beteiligung von Kalzium als second messenger dieser Reaktion spricht.

Die oben genannten Studien (Chen et al., 2002 und Hailer et al., 1994) belegen jedoch indirekt, dass eine ausreichend hohe intrazelluläre Kalziumkonzentration für die durch TNF- α induzierte Adhäsionskaskade bei Ischämie/ Reperfusion erforderlich ist. Dies spricht dafür, dass die von uns beobachtete Absenkung der endothelialen Kalziumkonzentration durch Cariporide kausal an der verminderten Expression der Adhäsionsmoleküle E-Selektin und ICAM-1 beteiligt ist. Unklar bleibt jedoch, wie genau Kalzium an der intrazellulären Signalkaskade bei Aktivierung der Adhäsionskaskade durch TNF- α mitwirkt.

4.3 Klinische Bedeutung der Ergebnisse

NHE1-Inhibitoren wurden bisher nicht nur in einer Vielfalt von experimentellen Modellen, sondern auch in klinischen Studien untersucht. Der GUARDIAN Trial (GUARd During Ischemia Against Necrosis) war die erste groß angelegte Phase II/III-Studie, um die protektiven Effekte der NHE-Inhibition mit Cariporide am Menschen zu untersuchen. 11.590 Patienten mit akutem Koronarsyndrom, unabhängig welcher Genese, wurden als Risikopatienten für einen Myokardinfarkt in die Studie aufgenommen, deren Endpunkt Myokardinfarkt bzw. Mortalität

war. Weiterhin wurden die Patienten in die Gruppen instabile Angina pectoris/Nicht-Q-Wellen-Infarkt, PTCA (percutaneous transluminal coronary angioplasty; Ballondilatation) und CABG (coronary arterybypass graft; Bypass-Operation) unterteilt (Erhardt, 1999). Die Patienten erhielten 20, 80 oder 120mg Cariporide alle 8 Stunden bzw. ein Placebo über 48h bis 1 Woche in dem Zeitraum des höchsten Risikos für akute Ischämie/Reperfusionsschäden.

Während keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen und Dosierungen gezeigt werden konnten, ergab sich eine Reduktion der Todes- und Myokardinfarktrate von -24,7% in der Subgruppe von Patienten, die die höchste Dosierung von Cariporide erhalten (120 mg i.v. alle 8 Std.) und sich einer Bypass-Operation unterzogen hatten (Weber et al., 2002). Aufgrund dieses Ergebnisses wurde eine weitere Studie initiiert, in welcher die Subgruppe der CABG-Patienten herausgegriffen und einer Cariporide-Medikation unterzogen wurde.

Die Ergebnisse des EXPEDITION Trial (the sodium-hydrogen exchange inhibition to prevent coronary events in acute cardiac conditions) (Bolli, 2003) konnte den Wirkungsmechanismus, den kardialen Na^+/H^+ -Ionen Antiporter mit Cariporide zu hemmen, und hierüber indirekt die Ca^{2+} -Überlastung des Zytoplasmas über den $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austausch zu verringern, bestätigen. Das Ziel, die Infarkthäufigkeit in der frühen postoperativen Phase zu senken wurde erreicht. Die beobachteten schweren Nebenwirkungen (Erhöhte Anzahl von Schlaganfällen in der Cariporide-Gruppe) führte jedoch zum Abbruch der Studie.

Die Ergebnisse des EXPEDITION Trial bestätigen somit die experimentellen Befunde zur Verminderung des akuten Reperfusionsschadens. Dagegen untersuchten wir in unserer Studie den Einfluss von Cariporide auf die inflammatorische Reaktion im Rahmen des subakuten Reperfusionsschadens zu dem bisher keine klinischen Untersuchungen vorliegen. Durch unsere Experimente konnten wir die Supprimierung der Adhäsionskaskade mittels Cariporide belegen, auf die bereits vorangegangene Arbeiten hingewiesen hatten. Darüber hinaus konnten wir zeigen, dass diese Wirkung vermutlich auf einer Absenkung der endothelialen Kalziumkonzentration auf subnormale Werte beruht. Ob diese Befunde allerdings eine weitere klinische Studie zum Nachweis der protektiven Wirkung von Cariporide rechtfertigen, erscheint angesichts der enttäuschenden Ergebnisse der oben angeführten Studien fraglich. In jedem Fall müssten zunächst in einer präklinischen tierexperimentellen Studie der optimale Behandlungszeitraum und die für die Suppression der endothelialen Adhäsionskaskade erforderliche Dosierung von Cariporide ermittelt und die protektive Wirkung dieses Therapieansatzes belegt werden.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Bei Myokardischämie ist eine schnelle und wirksame Reperfusion des ischämischen Gewebes, in der Regel durch medikamentöse und mechanische Interventionen, wichtigste Maßnahme.

Die Reperfusion, also die Wiederherstellung des Blutflusses in einem ischämischen Areal, kann dabei Gewebsnekrosen verhindern, kann aber auch zu einer Schädigung des Myokards führen. Dieser Reperfusionsschaden tritt sowohl akut, also in den ersten Minuten der Reperfusion, als auch subakut über Stunden und Tage auf.

Während Ischämie/Reperfusion kommt es in Gefolge des durch Hypoxie ausgelösten anaeroben Metabolismus zur Aktivierung des Na^+/H^+ -Austauschers (NHE), der die intrazelluläre Protonenkonzentration im Austausch gegen Natrium reduziert. Der erhöhte intrazelluläre Natriumgehalt wird durch Aktivierung des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers gesenkt, was eine erhöhte Kalziumkonzentration zur Folge hat und während der gesamten Ischämie bestehen bleibt. Die erhöhte intrazelluläre Kalziumkonzentration vermittelt direkten Zelltod, indem sie einerseits Proteasen aktiviert, andererseits Hyperkontraktionen auslöst und die Zellmembran rupturieren lässt.

Inhibition des Na^+/H^+ -Austauscher durch den selektiven NHE-Inhibitoren Cariporide kann die intrazelluläre Kalziumkonzentration nach Ischämie/Reperfusion vermindern und so diesen akuten Ischämie-Reperfusionsschaden einschränken.

Im Rahmen des subakuten Reperfusionsschadens führen zahlreiche Mediatoren, wie z.B. Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α), Interleukine (z.B. IL-6), Plättchen aktivierender Faktor (PAF), die u.a. durch freie Sauerstoffradikale (ROS) aktiviert werden, zur gesteigerten Expression von Zytokinen und Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen und somit zur Aktivierung der Adhäsionskaskade mit gesteigerter Adhäsion von Leukozyten am venolären Endothel und anschließender Emigration dieser Leukozyten in das Myokard.

Unsere Studie basiert auf früheren Befunden, wonach Cariporide im Rattenmodell die post-ischämische Leukozytenadhäsion reduziert und somit auch den subakuten inflammatorischen Ischämie/Reperfusionsschaden einschränken könnte.

In der vorliegenden Studie überprüften wir folgende Hypothesen: 1) die Verminderung der Leukozytenadhäsion durch Cariporide wird durch eine reduzierte Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und CD62E auf Endothelzellen vermittelt; 2) der zelluläre Wirkmechanismus von Cariporide involviert eine Absenkung der endothelialen Kalziumkonzentration.

Zur Überprüfung dieser Hypothesen simulierten wir eine endotheliale Entzündungsreaktion durch Stimulation von „Human Umbilical Vein Endothelial Cells“ (HUVECS) mit unterschiedlichen Dosierungen von TNF- α und untersuchten in diesem Modell die anti-inflammatorischen Effekte des NHE-Inhibitors Cariporide durch Messung der Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und CD62E mittels FACS Analyse. Dabei wurde ein Teil der HUVECS mit Cariporide (3 μ mol/l), der andere Teil mit dem Lösungsmittel DMSO für 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Die einzelnen HUVECS wurden darauf jeweils mit 0; 0,5; 1; 3;5; 10; 25; 50 und 100 U/ml TNF- α bei 37°C inkubiert (24h für die Versuchsreihe von ICAM-1 und 5h für E-Selektin). Es erfolgte die Applikation von 20 μ l des jeweiligen mit Fluoreszenzfarbstoff markierten Antikörpers gegen E-Selektin und ICAM-1. Die Auswertung erfolgte mit dem FACS.

In der statistischen Auswertung induzierte TNF- α einen deutlichen Anstieg der Fluoreszenz für ICAM-1 in der Kontrollgruppe ohne den Einfluss von Cariporide (bei 0 U TNF- α 8,5; bei 100 U TNF- α 164,6; $p=0,001$). Der Anstieg der Fluoreszenz für E-Selektin war ebenfalls deutlich ausgeprägt (bei 0 U TNF- α 8,8; bei 100 U TNF- α 29,3; $p<0,001$) In den Cariporide-Gruppen hatte TNF- α keine signifikante Wirkung. Für ICAM-1 betrug die Fluoreszenz bei 0 U TNF- α 14,5 bei 100 U TNF- α 16,4 ($p=0,998$). Für E-Selektin betrug die Fluoreszenz bei 0 U TNF- α 6,8; bei 100 U TNF- α 7,6 ($p=0,842$). Damit induzierte TNF- α dosisabhängig eine massive Steigerung der Expression von ICAM-1 und CD62E, die durch Vorbehandlung der HUVECs mit Cariporide jeweils vollständig supprimiert wurde.

Zur Untersuchung weiterer möglicher zellulärer Mechanismen der anti-inflammatorischen Effekte von Cariporide wurde ebenfalls in HUVECs die Bedeutung von Ca²⁺ für die TNF- α induzierte Expression der Adhäsionsmoleküle untersucht.

HUVECS wurden mit 4 μ mol/ml Fluo-4 (Fluoreszenz-Kalzium-Indikator) für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Ein Teil der Zellen wurden mit kalziumhaltigen PBS, der andere Teil mit kalziumfreien PBS resuspendiert. Ein Teil der Zellen wurde mit 3 μ mol/l Cariporide, der andere Teil mit DMSO, jeweils für 30 min bei 4°C inkubiert. Die Zellen wurden mit einer submaximalen Stimulationskonzentration von 50 U/ml TNF- α inkubiert. Die Messung der Fluoreszenz erfolgte nach 2,5,10,15, 30 und 60 Minuten am FACS.

Dabei verminderten sowohl die Inkubation in kalziumfreiem Medium als auch Cariporide die intrazelluläre Kalziumkonzentration unter den Normalwert, der bei Kultivierung der HUVECs in kalziumhaltigem Medium gefunden wurde. In Übereinstimmung mit den bekannten

Mechanismen der Signaltransduktion hatte TNF- α keinen Einfluss auf die intrazelluläre Kalziumkonzentration.

Diese Ergebnisse lassen im Zusammenhang mit der bisher zu diesen Themen veröffentlichten Literatur folgende Schlussfolgerungen zu: 1) die anti-inflammatorische Wirkung von Cariporide nach Ischämie/Reperfusion beruht in erster Linie auf einer Hemmung der u.a. durch TNF- α induzierten endothelialen Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und CD62E; 2) obwohl Kalzium nicht direkt als second messenger in der Signaltransduktion des TNF- α -Rezeptors involviert ist, scheint eine Reduktion der zytosolischen Kalziumkonzentration auf subnormale Werte durch Cariporide kausal an dieser Hemmung der TNF- α -Wirkung beteiligt.

Vor einer möglichen klinischen Studie zur Überprüfung der protektiven Wirkung von Cariporide im Rahmen des subakuten inflammatorisch vermittelten Ischämie/Reperfusionsschadens müsste dieser Effekt in einer präklinischen tierexperimentellen Untersuchung bestätigt werden.

VI. ABKÜRZUNGEN

ATP	Adenosintriphosphat
CD	Cluster Designation
EDRF	endothelium-derived relaxing factor
DMSO	Dimethylsulfoxid
ECV- 304	künstliche Endothelzelllinie mit immortalisierten Endothelzellen
EGTA	Ethylenglykol-bis(aminoethylether)-N,N`-Tetraessigsäure
ENaC	epithelialer Natriumkanal
Fa.	Firma
FACScan	FACS für englisch Flurescent Activated Cell Sorting
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	Forward Scatter
HUVEC	human umbilical vein endothelial cell
HOE 642	4-isopropyl-3-metylsulfonyl-benzoyl-guanidine-methanesulfunat
ICAM	Intercellular adhesion molecule
IgSF	Immunglobulinsuperfamilie
Il	Interkeukin
kDa	kilo Dalton
LFA-1	Lymphocyte Function associated Antigen-1
MAC	macrophage adhesion molecule
MFI	mean fluorescence intensity
mouse IgG	Maus Immunglobulin G
NHE	Natrium-Wasserstoff-Austauscher
NO	Stickstoffmonoxid
PAF	Platelet activating factor
PAI-1	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1-Protein
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung
PE	Phycoerythrinin
PECAM	Platelet endothelial cell adhesion molecule
PMNs	Polymorphonuclear Neutrophils
ROI	Region of interest
SSC	Side Scatter VCAM
TNF- α	Tumor-Nekrosis-Faktor-alpha

VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule-1
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
w	with
w/o	without

VII. LITERATUR

- R. Alon, P.D. Kassner, M.W. Carr, E.B. Finger, M.E. Hemler und T.A. Springer (1995). The integrin VLA-4 supports tethering and rolling in flow on VCAM-1. *J Cell Biol.* 1243-53
- G. Ambrosio, J.L. Zweier, W.E. Jacobus, M.L. Weisfeldt und J.T. Flaherty (1987). Improvement of postischemic myocardial function and metabolism induced by administration of deferoxamine at the time of reflow: the role of iron in the pathogenesis of reperfusion injury. *Circulation.* 906-15
- P.S. Aronson (1985). Kinetic properties of the plasma membrane Na⁺-H⁺ exchanger. *Annu Rev Physiol.* 545-60
- G. Bendas, A. Krause, U. Bakowsky, J. Vogel und U. Rothe (1999). Targetability of novel immunoliposomes prepared by a new antibody conjugation technique. *Int J Pharm.* 79-93
- C. Berlin, R.F. Bargatze, J.J. Campbell, U.H. von Andrian, M.C. Szabo, S.R. Hasslen, R.D. Nelson, E.L. Berg, S.L. Erlandsen und E.C. Butcher (1995). alpha 4 integrins mediate lymphocyte attachment and rolling under physiologic flow. *Cell.* 413-22
- M.P. Bevilacqua und R.M. Nelson (1993). Selectins. *J Clin Invest.* 379-87
- R.A. Black, C.T. Rauch, C.J. Kozlosky, J.J. Peschon, J.L. Slack, M.F. Wolfson, B.J. Castner, K.L. Stocking, P. Reddy, S. Srinivasan, N. Nelson, N. Boiani, K.A. Schooley, M. Gerhart, R. Davis, J.N. Fitzner, R.S. Johnson, R.J. Paxton, C.J. March und D.P. Cerretti (1997). A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature.* 729-33
- S.C. Black (2000). In vivo models of myocardial ischemia and reperfusion injury: application to drug discovery and evaluation. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 153-67
- R. Bolli (1990). Mechanism of myocardial "stunning". *Circulation.* 723-38

R. Bolli (2003). The role of sodium-hydrogen ion exchange in patients undergoing coronary artery bypass grafting. *J Card Surg.* 21-6

M.P. Boyle und H.F. Weisman (1993). Limitation of infarct expansion and ventricular remodeling by late reperfusion. Study of time course and mechanism in a rat model. *Circulation.* 2872-83

U. Buerke, D. Pruefer, J.M. Carter, M. Russ, A. Schlitt, R. Prondzinsky, J. Makowski, S. Rohrbach, B. Niemann, C. Schulze, M. Dahm, C.F. Vahl, K. Werdan und M. Buerke (2008). Sodium/hydrogen exchange inhibition with cariporide reduces leukocyte adhesion via P-selectin suppression during inflammation. *Br J Pharmacol.* 1678-85

B. Chandrasekar und G.L. Freeman (1997). Induction of nuclear factor kappaB and activation protein 1 in postischemic myocardium. *FEBS Lett.* 30-4

K.H. Chen, B.H. Chang, P. Younan, S.G. Shlykov, B.M. Sanborn und L. Chan (2002). Increased intracellular calcium transients by calmodulin antagonists differentially modulate tumor necrosis factor-alpha-induced E-selectin and ICAM-1 expression. *Atherosclerosis.* 5-13

S.P. Crampton, J. Davis und C.C. Hughes (2007). Isolation of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC). *J Vis Exp.* 183

R.O. Cummins und M.F. Hazinski (2000). The most important changes in the international ECC and CPR guidelines 2000. *Circulation.* I371-6

L. Cun, Z. Ronghua, L. Bin, L. Jin und L. Shuyi (2007). Preconditioning with Na⁺/H⁺ exchange inhibitor HOE642 reduces calcium overload and exhibits marked protection on immature rabbit hearts. *ASAIO J.* 762-5

A.R. de Fougerolles, X. Qin und T.A. Springer (1994). Characterization of the function of intercellular adhesion molecule (ICAM)-3 and comparison with ICAM-1 and ICAM-2 in immune responses. *J Exp Med.* 619-29

- M.S. Diamond und T.A. Springer (1993). A subpopulation of Mac-1 (CD11b/CD18) molecules mediates neutrophil adhesion to ICAM-1 and fibrinogen. *J Cell Biol.* 545-56
- C.A. Dinarello und N.H. Margolis (1995). Cytokine-processing enzymes. Stopping the cuts. *Curr Biol.* 587-90
- M.L. Entman und C.W. Smith (1994). Postreperfusion inflammation: a model for reaction to injury in cardiovascular disease. *Cardiovasc Res.* 1301-11
- L.R. Erhardt (1999). GUARD During Ischemia Against Necrosis (GUARDIAN) trial in acute coronary syndromes. *Am J Cardiol.* 23G-25G
- J.T. Flaherty und M.L. Weisfeldt (1988). Reperfusion injury. *Free Radic Biol Med.* 409-19
- L. Fliegel (2001). Regulation of myocardial Na⁺/H⁺ exchanger activity. *Basic Res Cardiol.* 301-5
- N.G. Frangogiannis (2006). Targeting the inflammatory response in healing myocardial infarcts. *Curr Med Chem.* 1877-93
- N.G. Frangogiannis, M.L. Lindsey, L.H. Michael, K.A. Youker, R.B. Bressler, L.H. Mendoza, R.N. Spengler, C.W. Smith und M.L. Entman (1998). Resident cardiac mast cells degranulate and release preformed TNF-alpha, initiating the cytokine cascade in experimental canine myocardial ischemia/reperfusion. *Circulation.* 699-710
- Frank, Norbert: Auswirkung aktivierter polymorphkerniger neutrophiler Granulozyten und Hypoxie auf die β -adrenerge Ansprechbarkeit des Myokard. DiSSERTATION 2006 Universitätsmedizin Berlin, 9-11
- B.P. Giroir, J.H. Johnson, T. Brown, G.L. Allen und B. Beutler (1992). The tissue distribution of tumor necrosis factor biosynthesis during endotoxemia. *J Clin Invest.* 693-8
- J. Gurevitch, I. Frolkis, Y. Yuhas, B. Lifschitz-Mercer, E. Berger, Y. Paz, M. Matsa, A. Kramer und R. Mohr (1997). Anti-tumor necrosis factor-alpha improves myocardial recovery after ischemia and reperfusion. *J Am Coll Cardiol.* 1554-61

- K.Z. Guyton, Y. Liu, M. Gorospe, Q. Xu und N.J. Holbrook (1996). Activation of mitogen-activated protein kinase by H₂O₂. Role in cell survival following oxidant injury. *J Biol Chem.* 4138-42
- M.C. Haigney, E.G. Lakatta, M.D. Stern und H.S. Silverman (1994). Sodium channel blockade reduces hypoxic sodium loading and sodium-dependent calcium loading. *Circulation.* 391-9
- N.P. Hailer, R.A. Blaheta, S. Harder, M. Scholz, A. Encke und B.H. Markus (1994). Modulation of adhesion molecule expression on endothelial cells by verapamil and other Ca⁺⁺ channel blockers. *Immunobiology.* 38-51
- B.G. Hattler, A. Zeevi, C.V. Oddis und M.S. Finkel (1995). Cytokine induction during cardiac surgery: analysis of TNF-alpha expression pre- and postcardiopulmonary bypass. *J Card Surg.* 418-22
- R. Hattori, H. Otani, Y. Moriguchi, H. Matsubara, T. Yamamura, Y. Nakao, H. Omiya, M. Osako und H. Imamura (2001). NHE and ICAM-1 expression in hypoxic/reoxygenated coronary microvascular endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* H2796-803
- M.E. Hemler und R.R. Lobb (1995). The leukocyte beta 1 integrins. *Curr Opin Hematol.* 61-7
- G.E. Hill (1998). Cardiopulmonary bypass-induced inflammation: is it important? *J Cardiothorac Vasc Anesth.* 21-5
- Hoff, Uwe: Bedeutung der Alloantigen-unabhängigen Faktoren in der Frühphase nach tierexperimenteller Nierentransplantation. Dissertation 2005 Universitätsmedizin Berlin, 11-16
- E.D. Jarasch, G. Bruder und H.W. Heid (1986). Significance of xanthine oxidase in capillary endothelial cells. *Acta Physiol Scand Suppl.* 39-46
- R.B. Jennings und K.A. Reimer (1991). The cell biology of acute myocardial ischemia. *Annu Rev Med.* 225-46
- S. Kapadia, J. Lee, G. Torre-Amione, H.H. Birdsall, T.S. Ma und D.L. Mann (1995). Tumor

necrosis factor-alpha gene and protein expression in adult feline myocardium after endotoxin administration. *J Clin Invest.* 1042-52

S.R. Kapadia, H. Oral, J. Lee, M. Nakano, G.E. Taffet und D.L. Mann (1997). Hemodynamic regulation of tumor necrosis factor-alpha gene and protein expression in adult feline myocardium. *Circ Res.* 187-95

M. Karmazyn, J.V. Sostaric und X.T. Gan (2001). The myocardial Na⁺/H⁺ exchanger: a potential therapeutic target for the prevention of myocardial ischaemic and reperfusion injury and attenuation of postinfarction heart failure. *Drugs.* 375-89

N. Khandoudi, J. Ho und M. Karmazyn (1994). Role of Na⁽⁺⁾-H⁺ exchange in mediating effects of endothelin-1 on normal and ischemic/reperfused hearts. *Circ Res.* 369-78

Y. Kihara und J.P. Morgan (1991). Abnormal Ca²⁺ handling is the primary cause of mechanical alternans: study in ferret ventricular muscles. *Am J Physiol.* H1746-55

T.R. Kleyman und E.J. Cragoe, Jr. (1988). Amiloride and its analogs as tools in the study of ion transport. *J Membr Biol.* 1-21

G. Koren, A.T. Weiss, Y. Hasin, D. Appelbaum, S. Welber, Y. Rozenman, C. Lotan, M. Mosseri, D. Sapoznikov, M.H. Luria und et al. (1985). Prevention of myocardial damage in acute myocardial ischemia by early treatment with intravenous streptokinase. *N Engl J Med.* 1384-9

T. Kubota, C.F. McTiernan, C.S. Frye, A.J. Demetris und A.M. Feldman (1997). Cardiac-specific overexpression of tumor necrosis factor-alpha causes lethal myocarditis in transgenic mice. *J Card Fail.* 117-24

E.J. Kunkel, U. Jung, D.C. Bullard, K.E. Norman, B.A. Wolitzky, D. Vestweber, A.L. Beaudet und K. Ley (1996). Absence of trauma-induced leukocyte rolling in mice deficient in both P-selectin and intercellular adhesion molecule 1. *J Exp Med.* 57-65

C. Kupatt, H. Habazettl, B.F. Becker und P. Boekstegers (2000). Endothelial activation--a strategic event during postischemic myocardial inflammation. *Z Kardiol.* IX/96-100

- C. Kupatt, H. Habazettl, A. Goedecke, D.A. Wolf, S. Zahler, P. Boekstegers, R.A. Kelly und B.F. Becker (1999). Tumor necrosis factor-alpha contributes to ischemia- and reperfusion-induced endothelial activation in isolated hearts. *Circ Res.* 392-400
- C. Kupatt, R. Wichels, J. Horstkotte, F. Krombach, H. Habazettl und P. Boekstegers (2002). Molecular mechanisms of platelet-mediated leukocyte recruitment during myocardial reperfusion. *J Leukoc Biol.* 455-61
- Y. Ladilov, C. Schafer, A. Held, M. Schafer, T. Noll und H.M. Piper (2000). Mechanism of Ca(2+) overload in endothelial cells exposed to simulated ischemia. *Cardiovasc Res.* 394-403
- Lau, Susan Katrin: Adhäsionsmoleküle auf zirkulierenden humanen Monozyten bei essentieller Hypertonie. Dissertation 2004 Humboldt-Universität Berlin, 14-16
- D.J. Lefer und D.N. Granger (2000). Oxidative stress and cardiac disease. *Am J Med.* 315-23
- Z. Li, T. Song, G.Z. Liu und L.Y. Liu (2006). Inhibitory effects of cariporide on LPC-induced expression of ICAM-1 and adhesion of monocytes to smooth muscle cells in vitro. *Acta Pharmacol Sin.* 1326-32
- W.J. Linz und A.E. Busch (2003). NHE-1 inhibition: from protection during acute ischaemia/reperfusion to prevention/reversal of myocardial remodelling. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 239-46
- M. Lub, Y. van Kooyk und C.G. Figdor (1995). Ins and outs of LFA-1. *Immunol Today.* 479-83
- B.R. Lucchesi (1990). Modulation of leukocyte-mediated myocardial reperfusion injury. *Annu Rev Physiol.* 561-76
- D.L. Mann (2001). Interleukin-6 and viral myocarditis: the Yin-Yang of cardiac innate immune responses. *J Mol Cell Cardiol.* 1551-3
- D.L. Mann (2001). Recent insights into the role of tumor necrosis factor in the failing heart. *Heart Fail Rev.* 71-80

D.L. Mann (2003). Stress-activated cytokines and the heart: from adaptation to maladaptation. *Annu Rev Physiol.* 81-101

D.R. Meldrum (1998). Tumor necrosis factor in the heart. *Am J Physiol.* R577-95

R.M. Mentzer, Jr., R.D. Lasley, A. Jessel und M. Karmazyn (2003). Intracellular sodium hydrogen exchange inhibition and clinical myocardial protection. *Ann Thorac Surg.* S700-8

A.L. Moens, M.J. Claeys, J.P. Timmermans und C.J. Vrints (2005). Myocardial ischemia/reperfusion-injury, a clinical view on a complex pathophysiological process. *Int J Cardiol.* 179-90

M.L. Moss, S.L. Jin, M.E. Milla, D.M. Bickett, W. Burkhart, H.L. Carter, W.J. Chen, W.C. Clay, J.R. Didsbury, D. Hassler, C.R. Hoffman, T.A. Kost, M.H. Lambert, M.A. Leesnitzer, P. McCauley, G. McGeehan, J. Mitchell, M. Moyer, G. Pahel, W. Rocque, L.K. Overton, F. Schoenen, T. Seaton, J.L. Su, J.D. Becherer und et al. (1997). Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumour-necrosis factor-alpha. *Nature.* 733-6

W.A. Muller, S.A. Weigl, X. Deng und D.M. Phillips (1993). PECAM-1 is required for transendothelial migration of leukocytes. *J Exp Med.* 449-60

L.H. Opie (1991). Postischemic stunning--the case for calcium as the ultimate culprit. *Cardiovasc Drugs Ther.* 895-9

K. Petrecca, R. Atanasiu, S. Grinstein, J. Orłowski und A. Shrier (1999). Subcellular localization of the Na⁺/H⁺ exchanger NHE1 in rat myocardium. *Am J Physiol.* H709-17

O.I. Pisarenko (2004). [Na⁺/H⁺ exchange inhibitors: a new class of cardioprotectors]. *Russ Fiziol Zh Im I M Sechenova.* 1103-12

J.S. Pober (1987). Effects of tumour necrosis factor and related cytokines on vascular endothelial cells. *Ciba Found Symp.* 170-84

R. Pudil, V. Pidrman, J. Krejsek, J. Gregor, M. Tichy, C. Andrys und M. Drahosova (1999). Cytokines and adhesion molecules in the course of acute myocardial infarction. *Clin Chim Acta.* 127-34

M. Redlin, J. Werner, H. Habazettl, W. Griethe, H. Kuppe und A.R. Pries (2001). Cariporide (HOE 642) attenuates leukocyte activation in ischemia and reperfusion. *Anesth Analg.* 1472-9, table of contents

Reil, Jan-Christian, TNF α -Freisetzung bei Ischämie und Reperfusion von pharmakologisch behandelten und genetisch modifizierten Mäuseherzen. Dissertation 2005 Physiologischen Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München, S. 7-11

G. Ren, O. Dewald und N.G. Frangogiannis (2003). Inflammatory mechanisms in myocardial infarction. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy.* 242-56

C. Sardet, A. Franchi und J. Pouyssegur (1989). Molecular cloning, primary structure, and expression of the human growth factor-activatable Na⁺/H⁺ antiporter. *Cell.* 271-80

M. Scarpa, A. Rigo, M. Maiorino, F. Ursini und C. Gregolin (1984). Formation of alpha-tocopherol radical and recycling of alpha-tocopherol by ascorbate during peroxidation of phosphatidylcholine liposomes. An electron paramagnetic resonance study. *Biochim Biophys Acta.* 215-9

Schriek, Carsten; Untersuchungen zur Interaktion von Leukozyten und Thrombozyten bei Patienten mit arteriosklerotischen Stenosen der hirnversorgenden Arterien. Dissertation 2004 Universitätsklinikum Münster 2004, 24-27

Schulz, Sabine-Susan: Untersuchungen zum myokardialen Sauerstoffradikal-Stoffwechsel am Tiermodell 30-36 Stunden und 6 Wochen nach Myokardinfarkt unter medikamentöser Therapie mittels Ramipril, Metoprolol und Kombinationstherapie Metoprolol/Ramipril. Dissertation 2005 Humboldt Universität Berlin, 8-11

X.Z. Shang und A.C. Issekutz (1998). Contribution of CD11a/CD18, CD11b/CD18, ICAM-1 (CD54) and -2 (CD102) to human monocyte migration through endothelium and connective tissue fibroblast barriers. *Eur J Immunol.* 1970-9

S.S. Smyth, C.C. Joneckis und L.V. Parise (1993). Regulation of vascular integrins. *Blood.* 2827-43

T.A. Springer (1990). Adhesion receptors of the immune system. *Nature*. 425-34

H. Stromer, M.C. de Groot, M. Horn, C. Faul, A. Leupold, J.P. Morgan, W. Scholz und S. Neubauer (2000). Na(+)/H(+) exchange inhibition with HOE642 improves postischemic recovery due to attenuation of Ca(2+) overload and prolonged acidosis on reperfusion. *Circulation*. 2749-55

P. Th eroux, B.R. Chaitman, N. Danchin, L. Erhardt, T. Meinertz, J.S. Schroeder, G. Tognoni, H.D. White, J.T. Willerson und A. Jessel (2000). Inhibition of the sodium-hydrogen exchanger with Cariporide to prevent myocardial infarction in high-risk ischemic situations. *Circulation*. 102:3032-3038

A. van de Stolpe und P.T. van der Saag (1996). Intercellular adhesion molecule-1. *J Mol Med*. 13-33

U.H. von Andrian und C.R. Mackay (2000). T-cell function and migration. Two sides of the same coin. *N Engl J Med*. 1020-34

S. Wakabayashi, P. Fafournoux, C. Sardet und J. Pouyssegur (1992). The Na⁺/H⁺ antiporter cytoplasmic domain mediates growth factor signals and controls "H(+)-sensing". *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2424-8

L.J. Walsh, G. Trinchieri, H.A. Waldorf, D. Whitaker und G.F. Murphy (1991). Human dermal mast cells contain and release tumor necrosis factor alpha, which induces endothelial leukocyte adhesion molecule 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 4220-4

S. Walter, J. Carlsson, R. Schroder, K.L. Neuhaus, E. Sorges und U. Tebbe (1999). [Enzymatic markers of reperfusion in acute myocardial infarct. With data from the ISAM study]. *Herz*. 430-9

S.X. Wang, X.Y. Sun, X.H. Zhang, S.X. Chen, Y.H. Liu und L.Y. Liu (2006). Cariporide inhibits high glucose-mediated adhesion of monocyte-endothelial cell and expression of intercellular adhesion molecule-1. *Life Sci*. 1399-404

W.D. Weaver, R.J. Simes, A. Betriu, C.L. Grines, F. Zijlstra, E. Garcia, L. Grinfeld, R.J. Gibbons, E.E. Ribeiro, M.A. DeWood und F. Ribichini (1997). Comparison of primary coronary angioplasty and intravenous thrombolytic therapy for acute myocardial infarction: a quantitative review. *JAMA*. 2093-8

M. Wiltgen und G.P. Tilz (2008). Tumour necrosis factor and its receptor: a basic structural analysis of two counterparts. *Hematology*. 224-9

H. Xu, J.K. Bickford, E. Luther, C. Carpenito, F. Takei und T.A. Springer (1996). Characterization of murine intercellular adhesion molecule-2. *J Immunol*. 4909-14

M. Yasutake, R.S. Haworth, A. King und M. Avkiran (1996). Thrombin activates the sarcolemmal Na⁽⁺⁾-H⁺ exchanger. Evidence for a receptor-mediated mechanism involving protein kinase C. *Circ Res*. 705-15

X. Zhang, H.M. Liu, Y.J. Yang und T.F. Zhou (2005). [Protection of HOE642 against cardiomyocyte injury caused by anoxia and reoxygenation]. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*. 672-5

R.H. Zhou, C. Long, J. Liu und B. Liu (2008). Inhibition of the Na⁺/H⁺ exchanger protects the immature rabbit myocardium from ischemia and reperfusion injury. *Pediatr Cardiol*. 113-2

VIII. DANKSAGUNG

Mein herzlichster Dank gilt Herrn Prof. Dr.med. Helmut Habazettl (Institut für Physiologie – Charité -Universitätsmedizin Berlin) für die Überlassung des Themas und für die Anregung zur Gestaltung sowie die umfassende und freundliche Betreuung bei der Versuchsdurchführung und Anfertigung dieser Dissertationsschrift. Des Weiteren sei allen herzlichst gedankt, die zum Gelingen dieser Doktorarbeit beigetragen haben:

Allen Mitarbeitern des Labors von Herrn Prof. Dr.med. Axel R .Pries (Leiter des Instituts für Physiologie – Charité-Universitätsmedizin Berlin) für die Hilfe bei der Durchführung der Versuche und die stets angenehme Arbeitsatmosphäre.

Danken möchte ich aber von ganzem Herzen meiner Ma, die die beste Mutter ist, die man sich vorstellen kann. Meiner Freundin, Britta, die ich über alles liebe, und Judith mit Mircea, Brittas Eltern, für den nötigen Druck.

IX. LEBENSLAUF

"Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Versio meiner Arbeit nicht veröffentlicht."

Erklärung

„Ich, Andrea Matranga erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema:
[Antiinflammatorische Effekte des Na⁺/H⁺-Antiport-Inhibitors Cariporide]
selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die
(unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt
habe.“

Berlin, den 09.09.2011

(Andrea Matranga)