

Aus der Klinik und Poliklinik für Thorax-, Herz- und Thorakale

Gefäßchirurgie

der Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr. med. Rainer G. Leyh

**Einsatz der Raman-Spektroskopie zur Analyse der
mitochondrialen Funktion im Ischämie-Reperfusionsschaden
des Herzens**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Simon Ruppert

aus Würzburg

Würzburg, August 2018

Referent:	Prof. Dr. Christoph Schimmer
Korreferentin:	Prof. Dr. Heike Walles
Dekan:	Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 11.04.2019

Der Promovend ist Arzt.

In dankbarer Erinnerung an
Dr. Lothar Kieselowski-Ruppert
13.05.1950 – 14.06.2014

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung.....	1
1.1	Klinische Bedeutung des Ischämie-Reperfusionsschadens	1
1.2	Grundlagen der Mitochondrien	3
1.2.1	Physiologie der Mitochondrien.....	3
1.2.2	Struktur von Mitochondrien	4
1.2.3	Oxidative Phosphorylierung.....	5
1.2.4	Atmungskontrolle und Kopplung	7
1.2.5	Respirationsstadien und Hemmstoffe der Atmungskette	8
1.2.6	Mitochondrialer Ca ²⁺ -Stoffwechsel.....	9
1.3	Pathophysiologie des myokardialen Ischämie-Reperfusionsschadens	10
1.3.1	Reaktive Sauerstoff-Spezies (ROS)	10
1.3.2	pH-Wert und Stoffwechsel.....	12
1.3.3	Ca ²⁺ -Überladung.....	12
1.3.4	mPTP-Öffnung.....	13
1.3.5	Inflammation.....	14
1.3.6	Nekrose und Apoptose.....	14
1.4	Forschungsstand und klinische Anwendung.....	15
1.5	Raman-Spektroskopie	16
1.6	Zielsetzung und Durchführung.....	20
1.6.1	Zielsetzung der vorliegenden Arbeit	20
1.6.2	Durchführung und Versuchsaufbau	21
2.	Material und Methoden.....	22
2.1	Material	22
2.1.1	Versuchstiere.....	22
2.1.2	Testkits	22
2.1.3	Chemikalien.....	22
2.1.4	Puffer.....	23
2.1.5	Medikamente	24
2.1.6	Geräte.....	24
2.1.7	Verbrauchsmaterial.....	25
2.1.8	Software	26
2.2	Methoden.....	27
2.2.1	Entnahme und Präparation des Herzens	27
2.2.2	Langendorff-Perfusion	28

Inhaltsverzeichnis

2.2.3	Isolation der Mitochondrien	30
2.2.4	Proteinbestimmung.....	31
2.2.5	Clark-Type Elektrode	32
2.2.6	Mitochondriales Membranpotential.....	35
2.2.7	Mitochondriale ATP-Bestimmung	35
2.2.8	K ⁺ -Permeabilität der inneren Mitochondrien-Membran	36
2.2.9	Ca ²⁺ -induzierte Schwellung via mPTP.....	36
2.2.10	Mitochondriale Ca ²⁺ -Retentions-Kapazität (CRC).....	36
2.2.11	Statistik.....	37
2.2.12	Raman-Spektroskopie	37
3.	Ergebnisse	41
3.1	Myokardiale Funktion während der Langendorff-(Re-)Perfusion.....	41
3.2	Atmungskettenfunktion an der Clark-Elektrode.....	43
3.3	Mitochondriales Membranpotential.....	46
3.4	ATP-Gehalt und –Produktion	47
3.5	K ⁺ -Permeabilität	48
3.6	Mitochondriale Schwellung nach Öffnen der mPTP	49
3.7	Mitochondriale Ca ²⁺ -Retentionskapazität (CRC).....	50
3.8	Raman-Spektroskopie	52
3.8.1	Vorversuche zur Etablierung der Raman-Spektroskopie	52
3.8.2	Einfluss von IR40/30 auf die Atmung von SSM	61
4.	Diskussion.....	73
4.1	Analyse des IR mit etablierten Methoden	73
4.2	Diskussion Raman-Spektroskopie	78
4.2.1	Vorversuche zur Etablierung der Raman-Spektroskopie	78
4.2.2	Einfluss von IR in den Respirationsstadien.....	84
4.2.3	Bewertung und Ausblick.....	89
5.	Zusammenfassung.....	90
6.	Literaturverzeichnis.....	92
7.	Abbildungs-, Abkürzungs- und Tabellenverzeichnis.....	103

1. Einleitung

1.1 Klinische Bedeutung des Ischämie-Reperfusionsschadens

Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems stellten mit über 350 000 Todesfällen im Jahr 2015 in Deutschland die führende Todesursache dar. Eine besondere Rolle spielt der akute Myokardinfarkt (AMI). Dieser verursachte 2015 fast 50 000 Todesfälle und Krankheitskosten von über zwei Milliarden Euro (Quelle: Statistisches Bundesamt im August 2018).

Der akute Myokardinfarkt bezeichnet eine myokardiale Schädigung (definiert unter anderem durch den Anstieg des kardialen Troponins als Biomarker) mit Nekrose der Kardiomyozyten durch einen Mechanismus, der mit myokardialer Ischämie einhergeht [1]. Klinisch erfolgt die Diagnose des AMI unter anderem durch typische Beschwerden, Biomarker- und EKG-Veränderungen, angiographisch und durch weitere bildgebende Verfahren [2].

Nach der dritten universellen Definition des AMI aus dem Jahr 2012 erfolgt eine Unterteilung in fünf Subtypen [2]. Häufigster Auslöser eines AMI ist die Okklusion eines Koronargefäßes durch einen Koronarthrombus, meist auf dem Boden einer vorbestehenden Atherosklerose (Typ I) [3]. Die Ruptur einer vulnerablen Plaque führt zur Freisetzung thrombogenen Materials in das Koronargefäß [4]. Der darauf folgende Verschluss resultiert in einer Ischämie der Kardiomyozyten mit einem Ausbreitungsmuster von subendo- nach subepikardial [5]. Als Maximalform präsentiert sich der transmurale Infarkt im EKG mit Hebungen der ST-Strecke („STEMI“ – ST-segment elevation myocardial infarction) [6].

Klinisch äußert sich der AMI typischerweise mit ausstrahlenden, retrosternalen Schmerzen, vegetativer Symptomatik und Todesangst [1]. Die große Breite möglicher Komplikationen erklärt die hohe Mortalität des AMI: diese beinhalten unter anderem Herzrhythmusstörungen, Abriss des Papillarmuskels und akutes Linksherzversagen mit kardiogenem Schock bis zum plötzlichen Herztod [7].

Im AMI durchlaufen Kardiomyozyten zeitabhängig die Stadien reversibler Ischämie bis zur irreversiblen Nekrose [8]. Die Therapie der ersten Wahl ist daher die zeitnahe Wiederherstellung der Perfusion, in Europa in der Regel mittels der perkutanen koronaren Intervention (PCI) im Rahmen der initialen Untersuchung im Herzkatheter-Labor [1].

Paradoxerweise bewirkt die Wiederherstellung der Perfusion häufig eine weiterführende Schädigung des Myokards. Erstmals beschrieben wurde dieser Reperfusionsschaden im Jahr 1960 von Jennings et al., die eine Zunahme des Nekroseareals in reperfundierten Hundeherzen beobachteten [9]. Im Verlauf der Forschung zu dieser Beobachtung ergaben sich unterschiedliche Definitionen des Ischämie-Reperfusionsschadens. Heute wird der myokardiale Ischämie-Reperfusionsschaden (IR) definiert als die Gesamtschädigung des Myokards, ausgelöst durch pathologische Prozesse während Ischämie und anschließender Reperfusion [10-12]. Der Begriff „letale Reperfusion“ beschreibt dabei die irreversible Schädigung zuvor nur reversibel geschädigter, also eigentlich überlebensfähiger Kardiomyozyten durch Reperfusion [10, 13, 14]. Im Tiermodell zeigte sich, dass die „letale Reperfusion“ für bis zu 50 % des Nekroseareals nach einem AMI verantwortlich ist [13]. Eine tragende Rolle spielt der IR auch in der Herz-Thorax-Chirurgie, wo Reperfusion nach Kardioplegie myokardiale Schäden bedingt [15].

Klinisch manifestiert sich der IR in verschiedenen pathologischen Mechanismen: Das „Myocardial stunning“ beschreibt eine über Tage bis Wochen verlängerte mechanische Dysfunktion nach erfolgreicher Reperfusion des okkludierten Gefäßes. Erhöhte Ca^{2+} -Konzentration und oxidativer Stress sind für diese Dysfunktion verantwortlich [5]. Als weitere Manifestation des IR besteht bei bis zu 30% aller AMI-Patienten nach erfolgreich durchgeführter PCI das Phänomen der mikrovaskulären Obstruktion, auch „No-reflow“-Phänomen genannt. Trotz erfolgreicher Reperfusion des Koronargefäßes besteht auf mikrovaskulärer Ebene keine Durchgängigkeit. Bedingt durch Endotheldysfunktion, Vasokonstriktion, Leukozyten-Aktivierung sowie Mikroembolisierung führt das „No-reflow“-Phänomen zu einer Ausdehnung des Nekroseareals und einem verschlechterten Outcome [5, 16, 17]. Als weitere, typische Pathologien im Rahmen des IR bestehen nach Wiederherstellung des Blutflusses häufig systolische und diastolische Dysfunktion sowie behandlungsbedürftige Arrhythmien [18].

Zur Aufrechterhaltung der physiologischen Funktion konsumiert das Myokard große Mengen Energie. Kardiomyozyten enthalten daher eine hohe Anzahl von Mitochondrien; bis zu 35 % des Zellvolumens eines Kardiomyozyten entfallen auf Mitochondrien [19]. Es überrascht daher nicht, dass die mitochondriale Dysfunktion im IR eine wesentliche Rolle spielt: ATP-Depletion, Ca^{2+} -Überladung, ROS-Generation, mPTP-Öffnung und die Induktion von Nekrose und Apoptose laufen als zentrale mitochondriale Prozesse ab und werden in den folgenden Kapiteln detailliert erläutert. Die vorliegende Arbeit soll daher die pathophysiologischen, mitochondrialen Prozesse im Ischämie-Reperfusionsschaden beleuchten.

1.2 Grundlagen der Mitochondrien

1.2.1 Physiologie der Mitochondrien

In der Alltagssprache werden Mitochondrien als „Kraftwerke der Zellen“ bezeichnet. In allen Eukaryoten, die keine Photosynthese betreiben, stellen Mitochondrien den Hauptlieferanten von ATP dar [20]. Dieses gilt im menschlichen Körper als universeller Energieträger und ist für physiologische Prozesse wie Muskelkontraktion, aktiven Ionen-transport und Proteinfaltung essentiell [20]. Allein das menschliche Herz setzt durchschnittlich sechs kg ATP pro Tag um [21].

Nach der Endosymbionten-Theorie repräsentieren Mitochondrien ehemals autonome Prokaryoten, die von einer Wirtszelle aufgenommen wurden. Als Korrelate dieser nun semiautonomen Funktion finden sich die mitochondriale Doppelmembran und die mitochondriale DNA, die für 13 Mitochondrien-spezifische Proteine codiert und für ROS besonders anfällig ist [22, 23]. Anhand ihrer intrazellulären Lage lassen sich interfibrilläre von subsarkolemmalen Mitochondrien unterscheiden. Die maximale Respirationsrate und die maximale Kapazität zur Calcium-Akkumulation subsarkolemmaler Mitochondrien (SSM) sind geringer ausgeprägt als die interfibrillärer Mitochondrien (IFM) [22]. Des Weiteren reagieren SSM auf Ischämie sensibler [22], so dass in der vorliegenden Arbeit Experimente zum IR mit SSM durchgeführt wurden. Die Morphologie von Mitochondrien variiert, abhängig von Stoffwechsel und pathologische Einflüssen, ständig [24]. Mitochondrien bilden intrazellulär ein tubuläres Netz, das durch Fusion und Spaltung seine Form verändert [20, 25].

1.2.2 Struktur von Mitochondrien

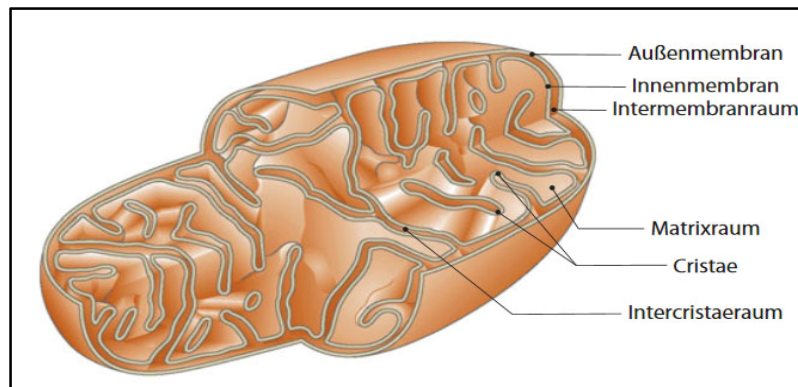


Abbildung 1: Struktur eines Mitochondriums. Abbildung aus Buselmaier - Biologie für Mediziner, Springer-Verlag 2015

Die Existenz einer Doppelmembran bewirkt eine Kompartimentierung des Mitochondriums. Den innersten Raum bildet die Matrix, umgeben von der inneren Mitochondrienmembran (iMM). Diese verfügt über Ausstülpungen, die tief in die Matrix reichen und als Cristae bezeichnet werden [22]. Nach außen schließt sich der Intermembranraum (IMR) an, der gegenüber dem kardiomyozytären Cytosol durch die äußere Mitochondrienmembran (äMM) abgegrenzt wird [20].

Die äMM ist für kleine Moleküle bis 5000 Dalton Größe frei passierbar [26]. Ermöglicht wird dies durch Poren, die von spannungsabhängigen Anionen-Kanälen („VDAC“) gebildet werden [26]. In Folge der Permeabilität ist die Konzentration cytosolischer Ionen gleich der im IMR, was die Ausbildung eines Membranpotentials verhindert [20]. Der IMR verfügt über eine exklusive Protein-Ausstattung, wobei die Existenz von Cytochrom C für die Atmungskette eine wichtige Rolle spielt [26].

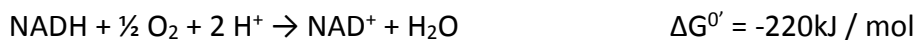
Im Gegensatz zur äMM ist die iMM für Ionen, Metabolite und Proteine impermeabel [26]. Spezielle Transportsysteme ermöglichen ihre Passage über die iMM [23]. Die Undurchlässigkeit der Membran bedingt das Entstehen eines Membranpotentials, das für die ATP-Synthese Voraussetzung ist. Die Cristae dienen der Oberflächenvergrößerung und enthalten Proteine der Atmungskette und Transporter [22]. Eine Besonderheit ist das Vorkommen von Cardiolipin. Dieses Phospholipid interagiert mit den Proteinen der iMM und ist essentiell für deren Funktionen und die Integrität der Membran [27].

Die mitochondriale Matrix stellt einen zentralen Ort wichtiger Enzymreaktionen dar [28]. Unter anderem finden dort die β -Oxidation von Fettsäuren sowie die Pyruvat-Dehydrogenase-Reaktion des Kohlenhydrat-Metabolismus statt. In beiden Reaktionen entsteht Acetyl-CoA [28, 29]. Ziel des sich anschließenden Citratzyklus ist die Generierung energiereicher Elektronen in Form von NADH und FADH₂ [30]. Diese werden als Substrate für die ATP-Synthase in die Atmungskette eingeschleust [31].

1.2.3 Oxidative Phosphorylierung

Der Begriff „mitochondriale Atmungskette“ charakterisiert ein komplexes Redoxsystem an der IMM [31]. Die Atmungskette lässt sich untergliedern in die Elektronentransportkette (ETK) sowie die F₁F₀-ATPase. Vier große Proteinkomplexe, benannt als „Komplex I-IV“, sowie zwei Elektronen-Transportsysteme (Ubichinon und Cytochrom C) bilden die ETK [22]. Die F₁F₀-ATPase wird auch als ATP-Synthase oder „Komplex V“ bezeichnet [32].

Die oxidative Phosphorylierung funktioniert nach dem Prinzip der stark exergonen „Knallgasreaktion“, wobei energiereiche Elektronen stufenweise auf niedrigere Energieniveaus übertragen und Substrate wie NADH oder FADH₂ oxidiert werden [23]:



Die frei werdende Energie wird genutzt, um über Komplex I, III und IV Protonen aus der mitochondrialen Matrix in den Intermembranraum zu translozieren [31]. Der H⁺-Ausstrom resultiert in dem Aufbau eines elektrochemischen H⁺-Gradienten. Dieser H⁺-Gradient fungiert anschließend als protonenmotorische Triebkraft (Δp_m) für den Ablauf der ATP-Synthase an Komplex V [26].

Die protonenmotorische Kraft umfasst zwei Komponenten: die Änderung des pH-Wertes (ΔpH) sowie die Änderung des Membranpotentials ($\Delta \psi_m$) an der IMM [33]. Dabei kommt dem Membranpotential der entscheidende Anteil an der protonenmotorischen Kraft zu [33]. Werte von -100 bis -140 mV ermöglichen eine optimale ATP-Synthase an

Komplex V [34]. Hypo- und Hyperpolarisation des $\Delta\psi_m$ spielen in pathophysiologischen Mechanismen eine wichtige Rolle.

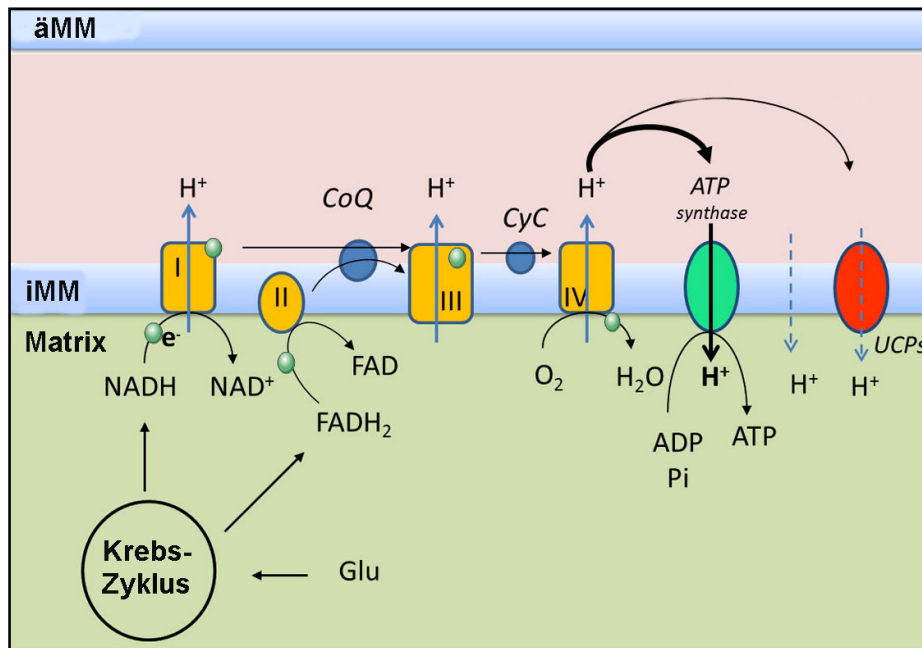


Abbildung 2: Schematischer Überblick über die Physiologie der Atmungskette [31].

Die detailreichen Vorgänge an der ETK sind komplex und immer noch nicht komplett erforscht [35], so dass im Folgenden nur ein kurzer Überblick gegeben werden soll: energiereiche Elektronen in Form von NADH werden an Komplex I (NADH:Ubichinon-Oxidoreduktase) in die ETK eingespeist und auf Coenzym Q übertragen [23]. Über Komplex II (Succinat:Ubichinon-Oxidoreduktase), eine direkte Verbindung zum Krebszyklus [31, 35], können ebenfalls Elektronen in Form von FADH₂ eingebracht und auf Coenzym Q übertragen werden [23]. Das so entstandene Ubichinol wird an Komplex III der ETK (Ubihydrochinon:Cytochrom-c-Oxidoreduktase) mittels des Q-Zyklus oxidiert und die transportierten Elektronen auf Cytochrom C transferiert [23]. Komplex IV (Cytochrom-c-Oxidase) katalysiert die Reduktion von O₂ durch die mittlerweile energiearmen Elektronen, wodurch Wasser entsteht. Die frei werdende Energie wird durch Erzeugung des H⁺-Gradienten zwischengespeichert (s.o.) [23]. Der Rückfluss von Protonen durch Komplex V (F₁F₀-ATPase) treibt die ATP-Synthese an.

1.2.4 Atmungskontrolle und Kopplung

Die Fähigkeit von Mitochondrien, auf wechselnden ATP-Umsatz exakt zu reagieren, ist überlebenswichtig. Nach dem klassischen Konzept der Atmungskontrolle gilt die ADP-Konzentration als wichtigster Regulator für die Funktion der Atmungskette [23]. Geringe ADP-Konzentrationen repräsentieren einen niedrigen Energiebedarf und führen zu einer verminderten Aktivität von Komplex V. Der H^+ -Ausstrom in den IMR durch Komplex I, III und IV resultiert in einer Hyperpolarisation von $\Delta\psi_m$ [33]. Folge ist die Inhibition von Substratoxidation und O_2 -Verbrauch [33]. Weitere Kontrollmechanismen wie Superkomplex-Bildung, Phosphorylierung, allosterische Inhibition einzelner Atmungskettenkomplexe und veränderte Ca^{2+} -Konzentrationen sind in Diskussion [34, 36]. Kadenbach et al. und Hüttemann et al. postulieren außerdem die Bedeutung von Komplex IV als wichtigstem, geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Atmungskontrolle [34, 37].

Voraussetzung für eine effektive Atmungskettenkontrolle ist die enge Kopplung von Substratoxidation in der ETK und ATP-Synthese an Komplex V. Allerdings wird auch unter physiologischen Bedingungen ein Teil des aufgebauten H^+ -Gradienten für andere Prozesse als die ATP-Synthese genutzt: beispielsweise verbraucht die ATP/ADP-Translokase zur Freisetzung des neu synthetisierten ATPs H^+ als Triebkraft [23]. Der Verlust von Protonen aus dem IMR, die nicht für die ATP-Synthese genutzt werden, wird unter dem Begriff „ H^+ -Leck“ subsummiert [31, 38] und durch IR erheblich vergrößert (s. Kap. 1.3.1). Als Beispiel für eine physiologische, regulierte Entkopplung steht die Rolle von Entkopplungsproteinen (UCPs) zur Thermogenese in braunem Fettgewebe [23].

Der Einsatz von Protonophoren wie FCCP (Carbonylcyanid-p-trifluoromethoxyphenylhydrazon) dient in der mitochondrialen Funktionsanalyse der Bestimmung der maximalen Rate der Substratoxidation in der ETK und des maximalen O_2 -Konsums [38]. Die lipophilen, aromatischen Protonophoren translozieren Protonen in Richtung des Konzentrationsgradienten über die IMM. Auf Grund der Entkopplung kommt die ATP-Synthese dabei zum Erliegen [23].

1.2.5 Respirationsstadien und Hemmstoffe der Atmungskette

Um eine Analyse von Atmungsketten-Komplexen und Atmungskontrolle zu ermöglichen, definierten B. Chance et al. bereits 1956 fünf Respirationsstadien (RS) [39, 40]. Substrate wie Malat, Pyruvat oder Succinat sorgen für den Elektronenfluss in der ETK („Energetisierung“). In RS 3 verläuft die oxidative Phosphorylierung mit maximaler Geschwindigkeit. Das Verhältnis von RS 3 zu RS 4 wird als respiratorischer Kontroll-Index (RCI) bezeichnet und definiert das Maß der Kopplung [34].

Inhibitoren der Atmungskette dienen der Analyse einzelner Komplexe: So blockiert Rotenone Komplex I, Oligomycin inhibiert die ATP-Synthase durch Bindung an die F_0 -Untereinheit und erlaubt die Bestimmung des Protonen-Lecks. [23, 38].

Tabelle 1: Respirationsstadien nach B. Chance [41].

<u>Respirationsstadium</u>	<u>Im Überschuss</u>	<u>Begrenzung v_{max} AK durch</u>
Grundbedarf-Messung	O_2	ADP und Substrat
2	O_2 , ADP	Substrat
3 (aktiv)	O_2 , ADP, Substrat	
4 (kontrolliert)	O_2 , Substrat	ADP
5	ADP, Substrat	O_2
Entkopplung durch Protonophore	O_2 , Substrat	Maximalgeschwindigkeit Substratoxidation in der ETK
Blockade Komplex V mit Oligomycin	O_2 , ADP, Substrat	Blockade Komplex V

1.2.6 Mitochondrialer Ca^{2+} -Stoffwechsel

Mitochondriales Calcium spielt in der Physiologie des Herzens eine wichtige Rolle. Es dient als „second messenger“ und ist beteiligt an der Kontraktion des Kardiomyozyten [19]. Darüber hinaus reguliert Ca^{2+} den mitochondrialen Metabolismus sowie die ATP-Synthese [42].

Auf Grund des Vorkommens von VDAC (s. Kap 1.2.2) in der äMM können Ca^{2+} -Ionen diese frei passieren [43]. Der am besten erforschte Kanal zur Passage der iMM ist der mitochondriale Ca^{2+} -Uniporter (MCU) [44]. Das mitochondriale Membranpotential und der hohe Gradient zwischen IMR und Matrix ermöglichen den Einstrom von Ca^{2+} in die Matrix [19]. Die Ca^{2+} -Konzentration in der Matrix ruhender Kardiomyozyten beträgt ungefähr 100 nmol/Liter, steigt aber durch Erhöhung der Herzarbeit langsam auf bis zu ein bis drei $\mu\text{mol/Liter}$ an [36]. Erhöhte Ca^{2+} -Konzentrationen stimulieren den Citratzyklus durch Aktivierung Ca^{2+} -abhängiger Dehydrogenasen und erhöhen dadurch die NADH-Produktion [45]. Auch auf Komplex III und V der Atmungskette sowie die ATP/ADP-Translokase wirkt die Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration stimulierend [36].

Die Funktion von Mitochondrien als Calcium-Speicher wird kontrovers diskutiert. Entgegen bestehender Vermutungen zeigten Boyman et al. 2014, dass die Netto-Calcium-Aufnahme von Mitochondrien unter physiologischen Bedingungen gering ist und Mitochondrien keine direkte Funktion als Puffer ausüben [44, 46]. Relevant wird die Pufferfunktion unter pathologischen Bedingungen. Im Rahmen pathologisch erhöhter cytosolischer Ca^{2+} -Konzentrationen können Mitochondrien große Mengen Ca^{2+} in Form von Calcium-Phosphat speichern [42, 47].

Unter physiologischen Bedingungen befindet sich die Ca^{2+} -Konzentration in einem Fließgleichgewicht, so dass neben dem Einstrom über den MCU-Kanal ein kontinuierlicher Ausstrom von Ca^{2+} -Ionen erfolgt. Dies geschieht im Austausch gegen Na^+ -Ionen durch den NCLX-Transporter [48]. Bis dato bestehen nur Vermutungen, wie viele Na^+ -Ionen im Austausch für Ca^{2+} die iMM passieren und ob der Kanal damit eine elektrogene Aktivität besitzt [36]. Die erhöhte Na^+ -Konzentration der Matrix wird durch den Export mittels Na^+/H^+ -Antiport normalisiert [48].

1.3 Pathophysiologie des myokardialen Ischämie-Reperfusionsschadens

Der IR ist gekennzeichnet durch ein komplexes Zusammenspiel zahlreicher pathophysiologischer Prozesse. Obwohl schon lange bekannt, sind noch nicht alle Details des IR erforscht. Die folgenden Kapitel geben einen Überblick über den aktuellen Wissensstand zu den wichtigen, pathophysiologischen Vorgängen.

1.3.1 Reaktive Sauerstoff-Spezies (ROS)

Der Begriff ROS umfasst hochreaktive, von O₂ abgeleitete Radikale [49, 50]. Auf Grund ihrer hohen Instabilität und Reaktivität besitzen ROS eine nur geringe Halbwertszeit [49]. In Gewebe mit hohem Energiebedarf wie dem Myokard stellen Mitochondrien die Hauptquelle von ROS dar: 90 % der kardialen ROS entstammen Mitochondrien [45, 51]. Im Mitochondrium sind Enzyme des Citratzyklus und vor allem Komplex I und III der Atmungskette für die Generierung von ROS verantwortlich [22, 31]. Abhängig vom Substratangebot entfallen 0,1 - 2 % des in der Atmungskette verstoffwechselten O₂ nicht auf die ATP-Synthese, sondern auf die ROS-Entstehung [27].

Zu Grunde liegt der ROS-Genese ein Elektronen (e⁻)-Leck in der Atmungskette: e⁻ verlassen diese vor der Reduktion von molekularem O₂ an Komplex IV [22, 31]. Die verfrühte, univalente Reduktion von O₂ durch diese Elektronen an Komplex I und III der AK führt zur ROS-Entstehung [12]. Besonders das Etablieren der Reperfusion resultiert in einer massiven Entstehung von ROS [31]. Eine hohe Zahl in die Atmungskette eingebrachter e⁻ begünstigt diese Entstehung: dazu zählen unter anderem eine Hyperpolarisation von $\Delta\psi_m$, ein hoher NADH/NAD⁺-Quotient, stark reduzierte Komplexe der Atmungskette und eine geringe ATP-Synthese [49, 50]. Hüttemann et al. beschreiben in diesem Kontext einen „hyperaktiven“ Zustand der Atmungskette bei Reperfusion, der die ROS-Entstehung begünstigt [34]. Die oben genannten Bedingungen liegen vor allem im Respirationsstadium 4 vor [22, 49]. Eine Besonderheit ist der reverse Elektronentransport (RET): während der Ischämie-Phase akkumulierendes Succinat reduziert über Komplex II der AK Coenzym Q. Durch Umkehr des e⁻-Flusses wird an Komplex I anschließend NAD⁺ reduziert, wobei gleichzeitig ROS entstehen [49, 50]. Neu entstandene ROS

induzieren die Synthese weiterer ROS und potenzieren so in einem sich verstärkenden Kreislauf die schädliche Wirkung [52].

Das in den Mitochondrien am häufigsten entstehende ROS ist das Superoxid-Anion (O_2^-) [49]. Dieses zerfällt entweder spontan oder wird durch die Superoxid-Dismutase zu H_2O_2 katalysiert [49]. In geringen Konzentrationen dient H_2O_2 als physiologischer second messenger [53, 54]. In hohen Konzentrationen entstehen durch Reaktion mit Eisenionen im Rahmen der Fenton-Reaktion hochreaktive Hydroxyl-Ionen, $HO\cdot$ [12]. Diese verursachen im Körper oxidativen Stress [50].

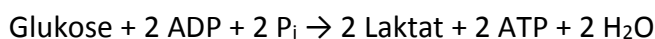
Mitochondrien sind sowohl Quelle, als auch Ziel von ROS [31]. Die pathologische Wirkung entfaltet sich durch Schädigung von Lipiden, Proteinen und mitochondrialer DNA [31, 55]. Besonders Cardiolipin scheint auf Grund seines hohen Gehaltes an Doppelbindungen ein Ziel für die Peroxidation durch ROS darzustellen [27]. Die Schädigung der IMM und der Komplexe der Atmungskette führt zu einem pathologisch gesteigerten H^+ -Leck mit zunehmender Entkopplung und reduzierter Effektivität der ATP-Synthese [31, 56]. Darüber hinaus induzieren hohe ROS-Konzentrationen die Öffnung der mPTP (s. Kap. 1.3.4).

Wie beschrieben, bedingt eine Hyperpolarisation von $\Delta\psi_m$ eine vermehrte ROS-Entstehung. Eine milde, physiologische Entkopplung scheint daher einen mitochondrialen Schutzmechanismus vor vermehrter ROS-Produktion darzustellen [33]. Entkopplungsproteinen (UCPs) wurde bisher vor allem eine Rolle als Regulatoren der Thermogenese zugeschrieben [57]. Mittlerweile gelten sie als wichtige Regulatoren der ROS-Synthese und vermitteln so einen kardioprotektiven Effekt [34].

1.3.2 pH-Wert und Stoffwechsel

Unter physiologischen Bedingungen erzeugen Mitochondrien ATP durch oxidative Phosphorylierung. Pro mol Glucose entstehen ungefähr 30 mol ATP [57]. Ischämie verursacht eine O₂-Minderversorgung des Mitochondriums. Der Mangel von O₂ als Elektronenakzeptor führt zur Inhibition der ETK [31]. Folge ist eine Hypopolarisation von $\Delta\psi_m$ sowie eine supprimierte ATP-Synthese [31]. Die unter O₂-Mangel auftretende, reverse Funktion von Komplex V verschärft den Energie-Mangel: Die Hydrolyse von ATP ermöglicht zwar die Aufrechterhaltung von $\Delta\psi_m$, verbraucht aber ATP [22].

Zur Sicherstellung der Energieversorgung im Kardiomyozyten wird in dessen Cytosol die anaerobe Glykolyse aktiviert [12]. Durch die Reduktion von Pyruvat zu Laktat wird ATP generiert und NAD⁺ zurückgewonnen. Die anaerobe Metabolisierung ist weniger effektiv als die oxidative Phosphorylierung. Pro mol Glucose entstehen nur zwei mol ATP [58]:



Als Folge der Reaktion akkumuliert Laktat und verursacht eine schwere Azidose des Kardiomyozyten [56]. Lang anhaltende Azidose und ATP-Depletion können die Ruptur des Sarkolemms und den Zelltod auslösen [36].

1.3.3 Ca²⁺-Überladung

Ausgangspunkt einer Ca²⁺-Überladung während der Ischämiephase ist die Azidose durch Stimulation der anaeroben Glykolyse (s. Kap. 1.3.2) [31]. Der Azidose-Ausgleich erfolgt mittels des Na⁺/H⁺-Antiporters, der Protonen aus dem Kardiomyozyten entfernt [12]. Die resultierende Na⁺-Überladung begünstigt eine Schwellung und Ruptur des Sarkolemms. Die reverse Funktion des NCLX-Transporters ermöglicht die Abgabe von Na⁺-Ionen, wobei Ca²⁺ akkumuliert [31]. Der Ausfall ATP-abhängiger Ca²⁺-Transporter steigert diese Überladung [56].

Während der Reperfusion verstärkt sich die Ca²⁺-Überladung [59]. Die Wiederherstellung und Hyperpolarisation von $\Delta\psi_m$ stellt die Triebkraft für einen weiteren Ca²⁺-Einstrom dar [5]. Reperfusions-bedingte Schäden an Sarkolemm und sarkoplasmatischem Retikulum erhöhen die Ca²⁺-Konzentration weiter [13]. Folge der massiv erhöhten Ca²⁺-

Konzentration ist eine Hyperkontraktur der Myofibrillen sowie ein Öffnen der mPTP (s. Kap.1.3.4) – beides resultiert im Zelltod des Kardiomyozyten [36]. Durch hohe Ca^{2+} -Konzentrationen aktivierte Calpain-Proteasen zerstören außerdem Proteine und hemmen so die Integrität von Kardiomyozyten und Mitochondrien [12, 60].

1.3.4 mPTP-Öffnung

Unter physiologischen Bedingungen ist die Permeabilität der IMM gering. Im Rahmen des IR vermittelt die mitochondriale Permeabilitäts-Transitions-Pore (mPTP) einen plötzlichen Anstieg dieser Permeabilität [61]. Die mPTP repräsentiert einen unselektiven Kanal in der IMM, den Moleküle bis 1,5 kDa Größe frei passieren können [43]. Das dauerhafte Öffnen der mPTP stellt in der Pathophysiologie des IR einen wichtigen Schritt dar und manifestiert sich in einer Vergrößerung der Nekrosezone um bis zu 50 % nach Reperfusion [62, 63]. Von der dauerhaften Öffnung ist ein kurzzeitiges, transientes Öffnen der mPTP abzugrenzen: dieses vermittelt den Ausstrom von akkumuliertem Ca^{2+} sowie ROS und dient damit mutmaßlich der Aufrechterhaltung der physiologischen Funktion [62, 64].

Während der Ischämiephase erhöhen gesteigerte P_i - und Ca^{2+} -Konzentrationen sowie reduzierte ADP- und ATP-Spiegel die Offenheitswahrscheinlichkeit der mPTP [43, 63]. Der durch anaerobe Energiegewinnung reduzierte pH-Wert inhibiert aber noch die Öffnung der Pore [65]. Die rasche Wiederherstellung des physiologischen pH-Wertes sowie eine massive Freisetzung von ROS während der ersten Minuten der Reperfusion resultieren in der Öffnung der mPTP [62].

Die dauerhafte Öffnung der Pore hat für den Kardiomyozyten dramatische Folgen: der Anstieg der Permeabilität bedingt den Zusammenbruch von $\Delta\psi_m$ mit Entkopplung der Atmungskette und Ausfall der ATP-Produktion [43, 61]. Der Konzentrationsausgleich zwischen Matrix und Cytosol bewirkt das Anschwellen der Mitochondrien und eine mögliche Ruptur der IMM [63]. Die Freisetzung proapoptotischer Faktoren wie Cytochrom C aus dem IMR in das Cytosol leitet schließlich den Zelltod ein [62].

1.3.5 Inflammation

IR führt zu einer sterilen Entzündungsreaktion des Myokards [66]. Proinflammatorische Prozesse wie ROS-Produktion, „damage-associated molecular pattern“-Freisetzung und „Toll-like receptor“-Erkennung resultieren in der Ausschüttung von Chemo- und Cytokinen [67, 68]. Folge ist die Invasion proinflammatorischer Zellen in das betroffene Gebiet. Die Aktivierung des Komplementsystems verstärkt die Entzündungsreaktion [59]. Neutrophile Granulozyten, die in großer Zahl in das reperfundierte Gebiet einwandern [66], verstärken den durch IR induzierten Schaden: die Freisetzung endogener ROS und hydrolytischer Enzyme führt zur Schädigung kardiomyozytärer Membranen und zum Zelltod [59].

1.3.6 Nekrose und Apoptose

Ischämie-Reperfusion führt sowohl durch Apoptose als auch durch Nekrose zum Zelltod von Kardiomyozyten [59, 65]. Apoptose bezeichnet einen regulierten Zelltod, der durch Aktivierung von Signalmolekülen aktiv gesteuert wird [69]. Morphologische Kriterien der Apoptose sind unter anderem: Reduktion des Zellvolumens, Fragmentierung des Zellkerns (Karyorrhexis), Vesikelbildung der Plasmamembran und die Aufnahme von Zellbestandteilen in Phagozyten [70]. Die Apoptose lässt sich über zwei unterschiedliche Signalwege induzieren. Gemeinsame Endstrecke ist die Aktivierung proteolytischer Effektor-Caspasen. Vor allem Caspase-8 und Caspase-3 spielen eine entscheidende Rolle bei der Zerstörung von Proteinen des Cytosols, des Cytoskeletts und des Nukleus [69].

Der extrinsische Apoptose-Signal-Weg wird durch Bindung von Liganden wie TNF- α oder Fas-Ligand aktiviert [51]. Folge ist die Formation des Zelltod-induzierenden Signal-Komplexes, der Effektorcaspasen stimuliert [71]. Schädigung der Mitochondrien durch oxidativen Stress, mPTP -Öffnung und Ca²⁺-Überladung aktivieren den intrinsischen Signalweg [65]. Proteine der Bcl2-Superfamilie regulieren im Apoptose-Prozess die Permeabilität der äMM und induzieren die Freisetzung proapoptotischer Faktoren wie Cytochrom C [70]. Dieses bildet im Cytosol mit Apaf-1 und dATP das Apoptosom, welches Effektorcaspasen zur Proteolyse stimuliert [51].

Morphologisch unterscheidet sich die Nekrose von der Apoptose unter anderem durch die Schwellung des Cytoplasmas, die Ruptur von Plasmamembranen und eine moderate Chromatin-Kondensation [70]. Nekrotische Prozesse werden häufig von einer Entzündungsreaktion begleitet [71]. Als typische Auslöser nekrotischer Prozesse im Kardiomyozyten gelten eine Ca^{2+} -Überladung sowie die Öffnung der mPTP [69-71]. Folge ist die Aktivierung von Calpainen, Cathepsinen und anderen Proteasen, die schließlich zur Lyse der Zelle führt [71].

1.4 Forschungsstand und klinische Anwendung

Die Risiko-adjustierte Mortalität hospitalisierter AMI-Patienten sank im Zeitraum von Ende der 1980er Jahre bis 2008 von 20 % auf ungefähr 5 % [11]. Dieser Erfolg beruht auf der Implementierung von Reperfusion-Strategien in den klinischen Alltag [13]. Wegweisende Studien von Maroko et al. [72], Ginks et al. [73] und Rentrop et al. [74] zeigten früh die Effektivität dieser Maßnahmen. Die zeitnahe Reperfusion ermöglicht es, den durch Ischämie verursachten Schaden effektiv zu reduzieren [10]. Nach dem „time is muscle“-Prinzip gilt die PCI mit kurzer „Door-to-balloon“-Zeit heute in Europa als effektive Maßnahme zur Reduktion der Infarktgröße und zur Verbesserung des Outcomes [1, 14].

Während es heute möglich ist, die durch Ischämie verursachte Schädigung zu therapieren, ist es nicht gelungen, eine Therapie für die von letaler Reperfusion bedingten Schäden zu etablieren [11]. In Folge der Beobachtungen von Jennings et al. (s. Kap. 1.1) wurde eine Vielzahl von Studien zu Pathophysiologie und Therapie des Reperfusionsschadens durchgeführt. Im Tiermodell zeigten sich dabei effektive Möglichkeiten zur Reduktion dieses Schadens, beispielsweise durch Blockade der mPTP mittels Ciclosporin A [75]. Eine in großen klinischen Studien gesicherte Übertragung auf den Menschen gelang allerdings mit keiner der Therapieoptionen [10]. Die Verwendung von jungen und genetisch identischen Tieren, das Fehlen von Dauermedikation und Komorbiditäten im Tiermodell sowie Unterschiede in Reperfusionsdauer, Komplexität der Organsysteme und Dosierung der Medikamente erschweren eine Übertragung der Ergebnisse auf den Menschen [11, 76].

Das Vorkommen letaler Reperfusion wurde mehrfach angezweifelt [77]. Zhao et al. zeigten 2003, dass aufeinander folgende Phasen von Reokklusion während der Reperfusion eines Gefäßes die Größe des Nekroseareals reduzieren [78]. Dieses als „post conditioning“ bezeichnete Verfahren war beweisend für die Existenz und Modifizierbarkeit letaler Reperfusion. In klinischen Studien an AMI-Patienten erwies sich das „post conditioning“ jedoch als nicht effektiv [10]. Nach einer hohen Anzahl enttäuschender Ergebnisse gelten heute das Konzept des „remote ischaemic conditioning“ sowie der Einsatz von ANP, GLP-1 und β -Blockern wie Metoprolol als am ehesten erfolgsversprechend und werden in großen klinischen Studien erprobt [10, 76, 79].

Die mangelnde Übertragbarkeit erfolgreicher Therapieoptionen vom Tiermodell auf den Menschen zeigt, dass es weiterer, intensiver Forschung zum IR bedarf. Mitochondrien spielen dabei weiterhin eine Schlüsselrolle in der Vermittlung einer effektiven Kardioprotektion [10]. Weitere Erkenntnisse zur Rolle von Mitochondrien im IR sind daher wünschenswert.

1.5 Raman-Spektroskopie

Die Raman-Spektroskopie hat im Bereich der Biologie und Biomedizin im Laufe der letzten Jahre zunehmend an Bedeutung gewonnen [80]. Bewährte Techniken wie Polymerasekettenreaktion, Immunfluoreszenz und Immunhistochemie ermöglichen zwar einen hohen Informationsgewinn aus biologischen Proben, sind aber durch die Notwendigkeit von Färbung, Fixierung oder Zell-Lyse in der Diagnostik intakter, lebender Zellen limitiert [81]. Dagegen bietet die Raman-Spektroskopie die Möglichkeit einer nicht-invasiven, Marker-freien Diagnostik bei hoher räumlicher Auflösung [82]. In Kombination mit dem Vorteil der fehlenden Wasser-Interferenz erlaubt die Raman-Spektroskopie derzeit die Darstellung von (patho-) physiologischen Prozessen in vitro [83].

Die Laser-basierte Raman-Spektroskopie beruht auf der inelastischen Streuung von monochromatischem Licht („Raman-Streuung“) [83]. Streuung bezeichnet einen Zwei-Photonen-Prozess, wobei ein Photon durch Kollision mit dem streuenden Molekül

absorbiert und gleichzeitig ein Photon freigesetzt wird [80]. In der Regel besitzen absorbiertes und emittiertes Photon die gleiche Energie. Diese Form der Streuung wird als „elastisch“ oder auch als „Rayleigh-Streuung“ bezeichnet [80] (s. Abb. 3).

Dagegen wird der Energie-Verlust von Photonen durch Interaktion mit dem Schwingungsmodus von Bindungen als inelastische Streuung bezeichnet [83]. Diese sogenannte Stokes-Streuung zeigt sich in einer Abnahme der Frequenz beziehungsweise Zunahme der Wellenlänge des emittierten Lichtes [83]. Genau gegensätzlich verhält sich die anti-Stokes-Strahlung, bei der ein Energie-Zugewinn in einer Zunahme der Frequenz resultiert [81]. Raman-Spektroskope erfassen die Verschiebung der Frequenz des monochromatischen Lichtes durch Stokes-Strahlung und stellen diese Verschiebung als Spektrum dar [84].

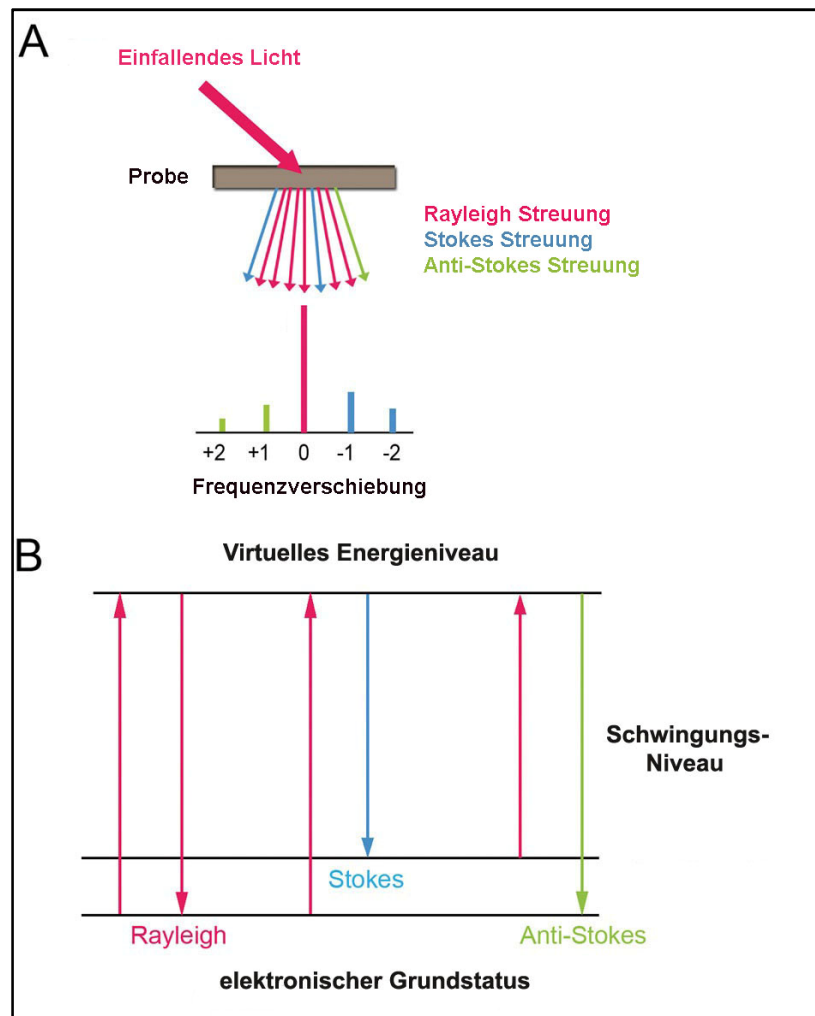


Abbildung 3: Frequenzverschiebungen (A) und Virtuelle Energieniveaus (B) bei Rayleigh-, Stokes- und Anti-Stokes-Streuung [80].

Einleitung

Der Versuchsaufbau in der Raman-Spektroskopie biologischer Proben besteht typischerweise aus einer Laserquelle, die monochromatisches Licht im sichtbaren oder Nahe-Infrarot-Bereich (785 nm Wellenlänge) erzeugt [83] (s. Abb. 4). In der Raman-Mikrospektroskopie wird der Laserstrahl durch Kopplung mit einem Mikroskop durch ein Objektiv auf die Probe gerichtet [81].

Das von der Probe abgestrahlte Licht wird durch Linsen gesammelt und umgelenkt. Da das Licht nach Rayleigh-Streuung eine ähnliche Wellenlänge und Frequenz, aber eine deutlich höhere Intensität besitzt, werden die Rayleigh-gestreuerten Photonen mittels eines Filters entfernt [83]. Das Verhältnis von Rayleigh- zu Stokes-Streuung ist stark un- ausgeglichen: nur eines von 10^6 bis 10^8 Photonen erfährt die inelastische Stokes-Streuung [80]. Die nach Filterung verbleibenden Photonen werden durch ein optisches Gitter gestreut [85]. Anschließend wird mittels CCD-Kamera ein Spektrum erzeugt.

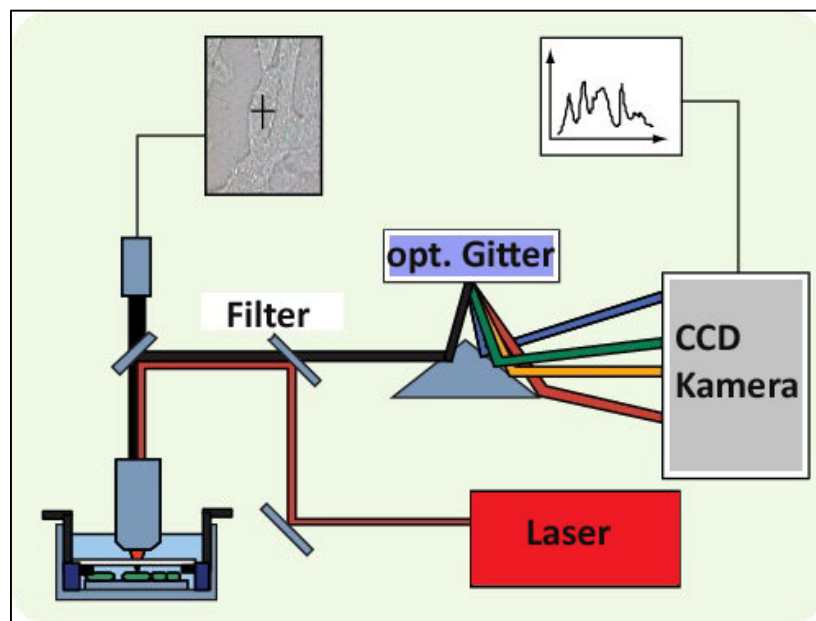


Abbildung 4: Aufbau eines Raman-Spektroskops [85].

Konventionell genutzte Raman-Spektroskope arbeiten meist mit einem Laser von 400-600 nm Wellenlänge. Die Intensität des Raman-Signals ist indirekt proportional zu der vierten Potenz der Wellenlänge [83]. Daher bieten Laser mit einer Wellenlänge von 400-600 nm die Möglichkeit einer kurzen Aufnahmedauer bei hoher räumlicher Auflösung [86]. Allerdings führt die Absorption von Photonen bei dieser Wellenlänge zu einer Schädigung biologischer Proben [87]. Notingham et. al zeigten, dass bereits eine kurze

Messdauer (fünf bis zwanzig Minuten) und eine geringe Leistung (5 mW), appliziert durch eine Laserquelle von 488 nm Wellenlänge, zu morphologischen Schäden und Zelltod führen [88].

Dagegen ermöglichen es Laser mit einer Wellenlänge von 785 nm, biologische Proben über einen langen Zeitraum auch bei hoher Leistung des Lasers (bis 180 mW) ohne Induktion von Photoschäden zu analysieren [89]. Dadurch lassen sich Zustände wie Zellatmung, Ischämie oder Nekrose in vitro in Echtzeit verfolgen [90]. Nachteile ergeben sich, bedingt durch die geringere Intensität des Raman-Signals, aus der längeren Aufnahmedauer und der etwas geringeren Auflösung. Durch den Einsatz hochsensitiver CCD-Detektoren und leistungsfähiger Laser lassen sich diese Nachteile teilweise kompensieren [88].

Bei der Anwendung der Raman-Spektroskopie entstehen große Datensätze und komplexe Spektren. Die Multivariate Datenanalyse in Form der Hauptkomponenten-Analyse (PCA) eignet sich dazu, große Trends und Unterschiede darzustellen [82]. Dazu werden die komplexen Datensätze auf mehrere Hauptkomponenten reduziert. Hauptkomponenten enthalten die größten Variationen innerhalb der erstellten Spektren [83]. Das Auftragen zweier Hauptkomponenten gegeneinander ergibt den Scores-Plot. Jeder Punkt im Scores-Plot entspricht einem Raman-spektroskopisch erstellten Spektrum [82]. Ähnliche Spektren gruppieren sich im Scores-Plot als Punkte bei einander, so dass Gemeinsamkeiten und Unterschiede analysiert werden können [90].

1.6 Zielsetzung und Durchführung

Trotz intensiver Forschung ist es bislang nicht gelungen, eine effektive Therapie des myokardialen IR, besonders im Hinblick auf die letale Reperfusion, zu etablieren. Am Universitätsklinikum Würzburg hat die Arbeitsgruppe von Frau Dr. Sommer die mitochondriale Funktionsanalyse zur Analyse des Ischämie-Reperfusion-Schadens erfolgreich etabliert [91]. Die verwendeten Methoden umfassen u.a. die Analyse von Atmungskettenfunktion, Membranpotential, ATP-Gehalt und Ca^{2+} -induzierter Schwellung. Die genannten Experimente erfordern die Verwendung isolierter oder Fluoreszenz-markierter Mitochondrien. Im Zuge der Mitochondrien-Aufbereitung sowie durch die Verwendung von Farbstoffen können die Messergebnisse aber beeinflusst und verzerrt werden. Die Übertragbarkeit auf den intakten Organismus muss daher kritisch hinterfragt werden.

Neu entwickelte Raman-Spektroskope mit Laserquellen von 785 nm Wellenlänge erlauben die nicht-invasive und nicht-destruktive Analyse von Zellen in vitro. Bis dato wurde die Raman-Mikrospektroskopie zur mitochondrialen Funktionsanalyse am Universitätsklinikum Würzburg nicht durchgeführt. Die vorliegende Arbeit soll daher erst das Potential der Raman-Spektroskopie zur Analyse von Mitochondrien im Allgemeinen und anschließend zur Analyse speziell des mitochondrialen IR untersuchen. Bei erfolgreicher Etablierung sollen durch den Abgleich mit bewährten Methoden neue Einblicke in die Pathophysiologie des IR ohne verzerrenden Bias gewonnen werden.

1.6.1 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Ziel dieser Arbeit soll daher sein,

- den Ischämie-Reperfusion-Schaden am Rattenmodell zu induzieren.
- den induzierten IR mit den bereits von der AG Sommer etablierten Methoden zu analysieren.
- die Anwendbarkeit der Raman-Spektroskopie zur mitochondrialen Funktionsanalyse im Allgemeinen zu evaluieren.
- die Anwendbarkeit der Raman-Spektroskopie zur mitochondrialen Funktionsanalyse im Ischämie-Reperfusion-Schaden zu evaluieren. Ergebnisse der Analyse der

Atmungskettenfunktion an der Clark-Elektrode im IR sollen dazu mit den Ergebnissen der Analyse der Atmungskettenfunktion der Raman-Spektroskopie im IR verglichen werden.

1.6.2 Durchführung und Versuchsaufbau

Zum Erreichen der oben genannten Ziele sollen mit Hilfe der Langendorff-(Re-)Perfusion am Rattenmodell zwei Versuchsgruppen eingeteilt werden:

- Eine Gruppe, in der ein globaler Ischämie-Reperfusions-Schaden induziert wird (im Folgenden „IR40/30“ oder „IR-Gruppe“ genannt).
- Eine Gruppe, in der kein Ischämie-Reperfusions-Schaden induziert wird (im Folgenden „IR0/30“ oder „Kontrollgruppe“ genannt).

Der IR soll durch den Vergleich der beiden Gruppen mit den bereits etablierten Methoden der mitochondrialen Funktionsanalyse dargestellt werden.

Vorversuche mit Puffern, gefrorenen Mitochondrien und Mitochondrien der Kontrollgruppe sollen die Raman-Spektroskopie etablieren.

Anschließend soll die Anwendbarkeit der Raman-Spektroskopie zur Analyse des IR überprüft werden. Dazu erfolgt ein Vergleich mit der bewährten Analyse der Atmungskettenfunktion an der Clark-Elektrode. Analog zum Messprotokoll der Clark-Elektrode werden die unterschiedlichen Respirationsstadien induziert und relevante Unterschiede zwischen den beiden Versuchsgruppen herausgearbeitet.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Versuchstiere

16 männliche Wistar-Ratten wurden von Harlan-Winkelmann (Borchen, Deutschland) bezogen. Das Gewicht der Tiere betrug zum Zeitpunkt der Organentnahme zwischen 280 und 320 g. Die Haltung erfolgte unter Einhaltung der Richtlinien zur Unterbringung und Pflege von Labortieren in einem klimatisierten Container und in einem Zwölf-Stunden Tag-Nacht-Rhythmus [92]. Die Anzeige der Organentnahme und Genehmigung lag der Regierung von Unterfranken vor (Anzeigennummer 93/13).

2.1.2 Testkits

Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Testkits.

Testkit	Hersteller
BCA Protein Assay Kit Nr 23225	Thermo Scientific, Waltham MA (USA)
ATP Determination Kit Nr A22066	Thermo Scientific, Waltham MA (USA)

2.1.3 Chemikalien

Soweit hier nicht anders aufgeführt, wurden die Chemikalien bestellt bei Sigma-Aldrich, Taufkirchen (D).

Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Chemikalien.

Chemikalie	Lieferant
Albumin Bovine Fraction V pH 7	ServaElectrophoresis, Heidelberg (D)
Carbogen-Gas, 95 % O ₂ , 5% CO ₂	Riessner Gase, Lichtenfels (D)
Oligomycin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (D)
Calcium Green-5 N	Thermo Scientific, Waltham MA (USA)
Rhodamin 123	Life Technologies GmbH, Darmstadt (D)
Carbonyl-Cyanid-3-chlorophenylhydrazon (CCCP)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (D)
Carbonyl-Cyanid-4-(trifluoromethoxy)-phenylhydrazon (FCCP)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (D)

Material und Methoden

2.1.4 Puffer

Tabelle 4: Zusammensetzung der verwendeten Puffer.

<u>Puffer</u>	<u>Zusammensetzung</u>
Wasch-Puffer	225 mM Mannitol 75 mM Sucrose 20 mM TRIS/HCl pH 7,4. Verwendet bei 4° C.
Mess-Puffer	130 mM KCl 5 mM K ₂ HPO ₄ 20 mM MOPS 1 mM EGTA 0,1 % BSA pH 7,2. Verwendet bei 25° C.
Isolations-Puffer	180 mM KCl 10 mM EDTA 0,5 % BSA pH 7,4. Verwendet bei 4° C.
Krebs-Henseleit-Bicarbonat-Puffer	118 mM NaCl 4,7 mM KCl 1,2 mM MgSO ₄ 1,25 mM CaCl ₂ 1,2 mM KH ₂ PO ₄ pH 7,4. Verwendet bei 37° C.
PBS-Puffer	10,6 mM KH ₂ PO ₄ 1551,7 mM NaCl 29,7 mM Na ₂ HPO ₄ -7 H ₂ O pH 7,4. Verwendet bei 4° C.
Schwellungspuffer	250 mM Sucrose 5 mM KH ₂ PO ₄ pH 7,2. Verwendet bei 28° C.
Permeabilisations-Puffer	135 mM KNO ₃ 5 mM HEPES 0,1 mM EGTA 0,2 mM EDTA pH 7,1. Verwendet bei 28° C.
Potential-Puffer	250 mM Sucrose 12,5 mM KH ₂ PO ₄ 20 mM HEPES 10 mM MgCl ₂ pH 7,2. Verwendet bei 28° C.

Material und Methoden

2.1.5 Medikamente

Tabelle 5: Auflistung der verwendeten Medikamente.

<u>Medikament</u>	<u>Hersteller</u>
Isofluran	CP-Pharma, Burgdorf (D)
Custodiol	Dr. Franz Köhler Chemie, Bensheim(D)

2.1.6 Geräte

Tabelle 6: Auflistung der verwendeten Geräte.

<u>Gerät</u>	<u>Hersteller</u>
BioRam® Raman Spektroskop	CellTool, Bernried (D)
Brutschrank BB16	Thermo Scientific, Waltham MA (USA)
Dispergierwerk T25 digital Ultra-Turrax	IKA, Staufen (D)
Entnahme- und Präparationsbesteck	B.Braun, Melsungen (D)
Feinwaage SBC 33	Scaltec, Heiligenstadt (D)
Herzschrittmacher Pace 100	Osypka, Rheinfelden-Herten (D)
Herzschrittmacher-Sonde TME Unipolar	Osypka, Rheinfelden-Herten (D)
Photometer Spectra II	Tecan, Crailsheim (D)
Infinite® 200 Pro multimodereader	Tecan, Crailsheim (D)
Ultrospect 3000 Spectrophotometer	GE Healthcare, München (D)
Homogenisator DUALL 5 ml Größe 22	Omnilab, Bremen (D)
Langendorff-Apparat	Föhr Medical, Seeheim (D)
Hamilton-Spritze Gastight #1001	Hamilton Company, Reno, Nevada (USA)
Drucktransducer	Föhr Medical, Seeheim (D)
MIO-0501 DC-Brückenmessverstärker	Föhr Medical, Seeheim (D)
Transonic TS410 2Kanal-Grundgerät	Transonic, Ithaca NY (USA)
Puffer-Pumpe	IdexHealth& Science, Wertheim (D)

Material und Methoden

Flussmesssonde Flow Probe ME2PXN	Transsonic, Ithaca NY (USA)
Fixations-Kanüle	Föhr Medical, Seeheim (D)
Wasserbad und Wärmetauscher	Thermo Scientific, Waltham MA (USA)
Oxytherm Clark Electrode Unit	Hansatech, Norfolk (UK)
Pipetten	Eppendorf, Hamburg (D)
Rührwerk Eurostar 20 digital	IKA, Staufen (D)
Perfusor fm	B.Braun, Melsungen (D)
AlarisAsena CC MK II	CareFusion, San Diego (USA)
Vortex Genius 5	IKA, Staufen (D)
Zentrifuge Rotanta 46 R	Hettich, Tuttlingen (D)
Zentrifuge Multifuge 1 s-r Heraeus	Thermo Scientific, Waltham MA (USA)

2.1.7 Verbrauchsmaterial

Tabelle 7: Auflistung des verwendeten Verbrauchsmaterials.

<u>Verbrauchsmaterial</u>	<u>Hersteller</u>
Discardit II 20 ml Spritze	BD, Franklin Lakes (USA)
Messkammer stickyslide 8 Well	Ibidi, Martinsried (D)
Mullkompresse	Noba Verbandmittel, Wetter (D)
Omnifix-F 1 ml Tuberkulin Spritze	B.Braun, Melsungen (D)
Perfusor 50 ml Spritze	B.Braun, Melsungen (D)
Perfusor Leitung	B.Braun, Melsungen (D)
Prolene-Faden 6-0	Johnson & Johnson, Norderstedt (D)
Seide Silkam 2-0	B.Braun, Melsungen (D)
96 Mikrotiter Platte Rotilabo	Carl-Roth, Karlsruhe (D)
Zentrifugationsröhrchen 50 ml	Greiner bio-one, Kremsmünster (AUT)
Ampuwa Sterilwasser	Fresenius, Schweinfurt (D)

Material und Methoden

2.1.8 Software

Tabelle 8: Auflistung der verwendeten Software.

<u>Software</u>	<u>Hersteller</u>
Excel 2013	Microsoft, Unterschleißheim (D)
Word 2013	Microsoft, Unterschleißheim (D)
LabChart 7.3.7	ADInstruments, Spechbach (D)
Prism 6.0e	GraphPad Software, La Jolla CA (USA)
The Unscrambler X 10.3	Camo Software, Oslo (NOR)
easyWINfittings 6.0a	Tecan, Crailsheim (D)
O ₂ View 1.04	Hansatech, Norfolk (UK)

2.2 Methoden

2.2.1 Entnahme und Präparation des Herzens

Die Narkoseeinleitung erfolgte in einer mit steriler Unterlage ausgekleideten Box. Ein Gasgemisch, bestehend aus 5 % Isofluran und 95 % O₂, wurde eingeleitet. Verlust der Körperspannung und Ausbleiben von Cornealreflex und Schmerzreaktion an den Krallen dienten zur Verifikation einer suffizienten Narkosetiefe. Nach Eintritt der Narkose wurde das Tier gewogen. Anschließend wurde die Ratte mittels Decapitation getötet. Es folgte die Positionierung auf einer handelsüblichen Korkplatte mit steriler Unterlage.

Mit Hilfe einer chirurgischen Schere erfolgte ein medianer Hautschnitt von xiphoidal nach kranial. Thymus und umliegendes Fettgewebe wurden entfernt, das Perikard eröffnet.

Vena cava superior und -inferior wurden herznah abgetrennt, Aorta und Trachea auf Höhe des Aortenbogens abgesetzt. Anschließend wurde das Herz-Lungen-Paket stumpf aus dem Thorax präpariert. Um einen Herzstillstand zu induzieren, wurde das Präparat für 30 Sekunden in eisgekühlte PBS-Lösung getaucht.

Die Präparation des Herzens erfolgte auf einer mit Eis gefüllten und mit Wasser befeuchteten Mullkompressen. Herzohren und Lungen samt Pulmonalvenen wurden reseziert, die Trachea stumpf abpräpariert. Die Kanüle zur Konnektion am Langendorff-Apparat wurde retrograd in der Aorta kranial der Aortenklappe platziert. Mit medizinischer Seide der Stärke 2-0 erfolgte eine sichere Fixierung in der Aorta ascendens.

Anschließend wurde die Kanüle durch zweimaliges Spülen mit einer Ein-ml-Tuberkulin-Spritze entlüftet. Als Spüllösung diente kardioplege Custodiol-Lösung. Nach manuellem Spülen wurde die Kanüle mittels Drei-Wege-Hahn an eine Spritzenpumpe angeschlossen und mit eisgekühlter Custodiol-Lösung mit einem Fluss von 10 ml/min für zwei Minuten perfundiert. Es folgte die Feinpräparation des Herzens. Anschließend wurde ein epikardialer Schrittmacherdraht Apex-nah ventrikulär mittels 6-0 Faden fixiert.

2.2.2 Langendorff-Perfusion

Versuchsaufbau

Ein Fünf-Liter-Reservoir wurde über eine Pumpe mit einem Kolben (im Folgenden „Behälter A“) verbunden (s. Abb. 5). Wasserbad und Wärmetauscher im System sorgten für eine konstante Temperierung der Perfusionslösung auf 37 °C. Behälter A wurde luftdicht verschlossen und diente als Blasenfalle für das Perfusat. Überschüssiger Puffer wurde mittels eines Überlaufventils zum Reservoir zurückgeleitet. Über eine Fritte eingeleitetes Carbogen-Gas oxygenierte den Puffer. Die Verbindung mit einem Steigrohr ermöglichte die Einstellung eines konstanten Druckes.

Ein Latexballon wurde mit einer wassergefüllten Hamiltonspritze verbunden. Über Messverstärker wurde eine Verbindung zwischen einem Computer und zwei Drucktransducern geschaffen. Die Transducer dienten zur Messung des Druckes innerhalb des Ballons und des Perfusatdruckes. Unterhalb Behälter A befand sich ein Durchlaufventil sowie die Möglichkeit zur Bestimmung des Koronarflusses (s. Abb. 5). Über einen Analog-Digital-Wandler wurde eine Messsonde mit dem Computer verbunden. Ein Drei-Wege-Hahn oberhalb der Kanüle ermöglichte die Applikation von Custodiol. Kanüle und Herz befanden sich in einer abgedeckten und beheizbaren Kammer, um die Temperatur konstant auf 37° C zu halten.

Erhobene Daten und Auswertung

Die Darstellung der Messwerte auf dem Computer erfolgte mit LabChart 7.3.7. Die Perfusat-Flusssonde ermöglichte die Messung des Koronarflusses. Mit Hilfe des Ballons wurden die Herzfrequenz, der Koronarfluss, der maximale linksventrikuläre Druck (LVP_{max}) und die Ableitung $LVP dp/dt$, also die Kontraktilität, bestimmt.

Einteilung der Versuchsgruppen

Kontrollgruppe (IR0/30)

Diese Versuchsgruppe fungierte als Kontrolle zur Ischämie-Reperfusion-Gruppe (s.u.). Zur Stabilisierung wurde das Herz für fünf Minuten vorperfundiert. Anschließend wurde die Perfusion für 30 Minuten fortgeführt (n = 8).

Ischämie-Reperfusions-Gruppe (IR40/30)

In dieser Versuchsgruppe wurde ein IR induziert. Im Folgenden wird diese Gruppe auch als „IR-Gruppe“ bezeichnet. Zur Stabilisierung wurde das Herz für fünf Minuten vorperfundiert. Daraufhin wurde durch Schließen des Durchlaufventils eine globale Ischämie für 40 Minuten bei 37 °C induziert. Gleichzeitig wurde durch Herabsetzen des LVEDP auf null mmHg für eine gleichmäßige Ausprägung der Ischämie über das ganze Organ gesorgt. Anschließend folgten 30 Minuten Reperfusion (n = 8).

2.2.3 Isolation der Mitochondrien

Die Isolation der Mitochondrien erfolgte nach einem modifizierten Protokoll von Bugger et al. [94] bei konstanter Kühlung auf 4°C. Verwendete Puffer und Materialien wurden auf Eis gelagert, die Zentrifugen auf 4°C gekühlt. Auf zügiges Arbeiten zur Erhaltung der Vitalität der Mitochondrien wurde geachtet.

Der Herzschrittmacher-Draht wurde mit Hilfe einer Pinzette gelöst. Die Vorhöfe wurden reseziert, das bindegewebige Herzskelett samt Atrioventrikularklappen entfernt. Es folgte die Gewichtsbestimmung mittels Feinwaage. Mindestens 700 mg Herzmuskel wurden benötigt, um eine ausreichende Menge an Mitochondrien zu erhalten.

Mit einer Schere wurde das Gewebe in kleine Stücke geschnitten und in ein Plastikgefäß überführt. Isolationspuffer, im Folgenden „Puffer I“ genannt, wurde hinzugefügt. Durch

mechanisches Zerkleinern in einem Ultra-Turrax (30 Sekunden auf Stufe 8,5) entstand eine Dispersion des Gewebes in Puffer I. Jeweils zwei ml wurden für 30 Sekunden bei 500 rpm in einem Glas-Potter fein zerrieben. Das so erhaltene Homogenat wurde in einem Zentrifugationsröhrchen gesammelt, mit Puffer I auf 20 ml aufgefüllt und bei 500 G zehn Minuten zentrifugiert.

Der Überstand, der die SSM-Fraktion enthielt, wurde abgenommen und in ein zweites Zentrifugationsröhrchen, genannt „SSM“, überführt. Dieses Röhrchen wurde zehn Minuten bei 3000 G zentrifugiert. Der Überstand wurde scharf dekantiert und das Pellet mit zwei ml Waschpuffer gelöst. Die Zentrifugation wurde nach diesem Schema zweimal wiederholt. Anschließend wurde der Überstand verworfen, das Pellet mit jeweils 500 µl Waschpuffer resuspendiert und in ein Zwei-ml-Eppendorf-Gefäß überführt.

2.2.4 Proteinbestimmung

Zur quantitativen Protein-Bestimmung der Mitochondrien-Fraktion wurde ein BCA-Testkit (s. Tab. 2) verwendet. Dieses beruht auf dem Bicinchoninsäure-Ansatz nach Smith et al. [95]. In alkalischem Medium reduzieren Peptidbindungen zweiwertiges Kupfer zu einwertigem Kupfer [95]. Bicinchoninsäure als Chelatbildner bildet mit einwertigem Kupfer einen stabilen, purpurfarbenen Komplex mit einem Absorptionsmaximum von Licht bei 562 nm Wellenlänge [95].

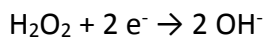
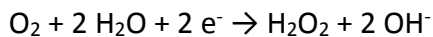
Jeweils 25 µl Albumin-Standard wurden in aufsteigender Konzentration von 0 – 2000 µg/ml in eine 96-Well-Mikrotiterplatte pipettiert. Ebenso wurden 25 µl SSM pipettiert. BCA-Reagenz A und B wurden im Verhältnis 50:1 vermischt und jeweils 200 µl auf die mit Albumin-Standard und Mitochondrien besetzten Wells pipettiert. Die Mikrotiterplatte wurde für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach Inkubation erfolgte die Messung der Extinktion in einem Photometer (s. Tab. 6) bei 562 nm Wellenlänge. Als Software diente easyWINfittings 6.0a. Anhand des Albumin-Standards wurde die Proteinkonzentration ermittelt.

2.2.5 Clark-Type Elektrode

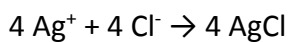
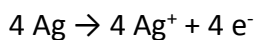
Versuchsaufbau und Funktion

Die polarographische Messung des mitochondrialen O₂-Verbrauchs erfolgte mit Hilfe einer Clark-Elektrode (s. Tab. 6). Eingegrenzt von einer ringförmigen Silber-Anode befand sich eine zentrale Platin-Kathode von zwei mm Durchmesser in einem Epoxid-Harzblock. Über ein mit KCl getränktes Zigarettenpapier, umgeben von einer O₂-permeablen PTFE-Membran, wurde eine Verbindung zwischen den beiden Elektroden hergestellt.

An der Pt-Kathode wurde eine Polarisierungsspannung von -700 mV gegenüber der Ag-Anode angelegt. Aus der Testlösung diffundierende O₂-Moleküle wurden an der Kathode unter Bildung von kurzlebigen H₂O₂ reduziert [96].



An der Anode wurde Silber oxidiert und fiel als AgCl-Salz aus.



Der Elektronenfluss zwischen beiden Elektroden wurde per Voltmeter gemessen und zeigte sich direkt proportional zum O₂-Partialdruck der Testflüssigkeit. Die Software O₂View (s. Tab. 8) diente zur Erfassung der Daten. Eine Kalibration mit vollentsalztem Wasser wurde bei 21 % O₂ und 0 % O₂ vor Beginn der Experimente durchgeführt. 0 % O₂ wurden durch Zugabe von Dithionit-Kristallen im Überschuss erzielt. 150 µg SSM wurden in 1 ml Messpuffer (Puffer M) unter permanentem Rühren eines Rührstabes (75 rpm) bei 25° C analysiert. Als Vorlage für die Versuche dienten modifizierte Protokolle nach Lanza et al. und Rustin et al. [97, 98].

Material und Methoden

Messprotokoll Komplex I-V-Funktion

Grundbedarf-Messung

Der O₂-Verbrauch wurde über 30 Sekunden ohne Zugabe von Substrat gemessen.

Respirationsstadium 2

5 mM Malat und 5 mM Pyruvat wurden als Substrat zugegeben (Energetisierung Komplex I). Der O₂-Verbrauch wurde über eine Minute aufgezeichnet.

Respirationsstadium 3

Nach Zugabe von 250 mM ADP (Start der ATP-Synthese) wurde der deutlich erhöhte O₂-Verbrauch gemessen.

Respirationsstadium 4

Nach ADP-Verbrauch kennzeichnete der gesunkene O₂-Verbrauch den Übergang von Respirationsstadium 3 in Respirationsstadium 4. Dieser wurde über 30 Sekunden registriert.

Respirationsstadium 3'

Erneute ADP-Zugabe überführte Respirationsstadium 4 in Respirationsstadium 3'. Der deutlich erhöhte O₂-Verbrauch wurde gemessen.

Oligomycin-Zugabe

Zur Ermittlung des Protonenleaks wurde in Respirationsstadium 3 0,125 µM Oligomycin zugegeben. Der O₂-Verbrauch wurde über 30 Sekunden aufgezeichnet.

FCCP-Zugabe

Der maximale O₂-Verbrauch nach Zugabe von 250 nM FCCP (Entkopplung der Atmungskette) wurde durch mehrfaches Hinzufügen bis zum Erreichen des maximalen O₂-Verbrauchs bestimmt.

Material und Methoden

Messprotokoll Komplex II – V-Funktion

Die Messung erfolgte analog zum oben genannten Messprotokoll. Zur Induktion von Respirationsstadium 2 wurden 5 mM Succinat (Energetisierung Komplex II) und 2,5 μ M Rotenone (Inhibition Komplex I) titriert.

Berechnung wichtiger Kenngrößen

Die Berechnung der unten genannten Parameter diente zur Beurteilung der Mitochondrienfunktion.

Protonen-Leck

Der Komplex-V-unabhängige O_2 -Verbrauch wurde über die Zugabe von 0,125 μ M Oligomycin in Respirationsstadium 3 gemessen. Durch Bindung von Oligomycin an den F_0 -Teil der F_1 - F_0 -Synthase kommt die ATP-Produktion zum Erliegen. Danach messbarer O_2 -Verbrauch ist zurückzuführen auf das Protonen-Leck in der inneren Mitochondrien-Membran und somit ein Maß für deren Integrität [99].

$$H^+\text{-Leck} = \frac{O_2\text{-Verbrauch Respirationsstadium 3 Oligomycin}}{O_2\text{-Verbrauch Respirationsstadium 3}}$$

Respiratorischer Kontrollindex (RCI)

Als Maß der Kopplung zwischen ATP-Produktion und Substratoxidation diente der RCI [38]. In Respirationsstadium 3 ist ADP im Überschuss vorhanden. Dessen maximaler Umsatz zu ATP ist abhängig vom Ausmaß der Atmungskontrolle: der Fähigkeit, die Substratoxidation in Anwesenheit von ADP zu maximieren. Zur Berechnung des RCI wurde der maximale O_2 -Verbrauch in Respirationsstadium 3 in Bezug zum limitierten Verbrauch in Respirationsstadium 4 gesetzt.

$$RCI = \frac{O_2\text{-Verbrauch Respirationsstadium 3}}{O_2\text{-Verbrauch Respirationsstadium 4}}$$

2.2.6 Mitochondriales Membranpotential

Zur Erfassung des $\Delta\psi_m$ wurden 100 μg SSM in 200 μl Potential-Puffer suspendiert und mit 200 μM Rhodamin 123 versetzt. Dieser kationische, fluoreszierende Farbstoff zeigt in isolierten Mitochondrien ein $\Delta\psi_m$ -abhängiges Verteilungsverhalten: Die Akkumulation von Rhodamin 123 in der mitochondrialen Matrix erfolgt direkt proportional zu $\Delta\psi_m$. In wässriger Phase liegt das Emissionsmaximum von Rhodamin 123 bei 525 nm Wellenlänge. Akkumulation im Mitochondrium resultiert in einer Rot-Verschiebung des emittierten Lichtes sowie einem Abfall des Fluoreszenz-Signals [100].

Nach Inhibition von Komplex I durch Zugabe von 2,5 μM Rotenone wurde die Atmungskette durch Zusatz von 5 mM Succinat energetisiert. Nach 300 Sekunden erfolgte die Zugabe von 0,3 mM ADP zur Induktion von Respirationsstadium 3. Nach 900 Sekunden wurden 20 μM CCCP zur Entkopplung der AK pipettiert. Die Änderung der Rhodamin123-vermittelten Fluoreszenz bei 530 nm Wellenlänge wurde bei Anregung mit Licht von 500 nm Wellenlänge in einem Infinite 200 Pro multimode reader (s. Tab. 6) erfasst.

2.2.7 Mitochondriale ATP-Bestimmung

Zur quantitativen Bestimmung von ATP-Gehalt und -Produktion wurde ein ATP Determination Testkit (s. Tab. 2) verwendet. Das Prinzip dieser Methode beruht auf der Umsetzung von Luciferin und ATP durch rekombinante Leuchtkäfer-Luciferase. Dabei wird Licht emittiert, dessen Intensität mittels eines Luminometers bestimmt wird [101].



50 μg Mitochondrien wurden mit 2,5 mM Malat und Pyruvat oder 2,5 mM Succinat und 5 mM Rotenone energetisiert. Diese Suspension wurde gemäß Herstellerangaben mit der Reaktionslösung inkubiert. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Intensität im Emissionsmaximum von 560 nm Wellenlänge bei 28 °C in einem Infinite® 200 Pro multimode reader (s. Tab. 6). Gleichzeitig durchgeführte Messungen mit ATP-Standard-Proben dienten zur Identifikation des ATP-Gehaltes.

Zur Bestimmung der absoluten ATP-Produktion wurde derselben Menge energetisierter Mitochondrien ADP in ansteigender Konzentration von 0,4, 0,5 und 0,6 μM ADP zugesetzt. Die Messung der Lichtintensität erfolgte in Analogie zur Messung des ATP-Gehaltes.

2.2.8 K^+ -Permeabilität der inneren Mitochondrien-Membran

Nach einem modifizierten Protokoll von Simon et al. [102] wurden 150 μg SSM mit 2 μM Rotenone in 400 μl Permeabilitäts-Puffer (s. Tab. 4) inkubiert. Die Schwellung als Folge der erhöhten K^+ -Permeabilität wurde durch die Abnahme der Licht-Absorption bei 520 nm Wellenlänge in einem Infinite[®] 200 Pro multimode reader (s. Tab. 6) gemessen [103].

2.2.9 Ca^{2+} -induzierte Schwellung über die Mitochondrial permeability transition pore (mPTP)

Die Messung dieser Ca^{2+} -induzierten Schwellung folgte einem modifizierten Protokoll von Simon et al. [102]. 150 μg Mitochondrien wurden in 200 μl Puffer, bestehend aus 250 mM Sucrose und 5 mM KH_2PO_4 bei pH 7,2 suspendiert. Nach Energetisierung mit 2,5 mM Malat und Pyruvat wurden 50 mM CaCl_2 appliziert. Die durch Ca^{2+} -Zugabe induzierte Schwellung wurde durch die Abnahme der Licht-Absorption bei 520 nm Wellenlänge in einem Ultrospect 3000 Spectrophotometer (s. Tab. 6) gemessen.

2.2.10 Mitochondriale Ca^{2+} -Retentions-Kapazität (CRC)

Die Bestimmung der mitochondrialen Ca^{2+} -Retentions-Kapazität (CRC) erfolgte nach einem modifizierten Protokoll von Matas et al. [104]. 150 μg SSM wurden in 400 μl Schwellungspuffer suspendiert und mit 2,5 mM Malat und Pyruvat oder 2,5 mM Succinat und 5 mM Rotenone energetisiert. Die Ca^{2+} -Konzentration wurde mittels 0,5 μM des Calcium-Indikators Calcium-Green[®] 5-N in einem Infinite[®] 200 Pro multimode reader (s. Tab. 6) bei 520 nm Wellenlänge und 25 °C detektiert. Alle 60 Sekunden wurden 5 μl einer 1 mM CaCl_2 -Stammlösung per Mikroinjektor appliziert. Eine rasche Abnahme der Fluoreszenz nach Ca^{2+} - Bolus implizierte eine Aufnahme von Ca^{2+} in das Mitochondrium, ein rascher Anstieg der Fluoreszenz die Ca^{2+} -induzierte Ca^{2+} -Freisetzung über die mPTP. Die

CRC wurde als Gesamtzahl aller applizierten Ca^{2+} -Pulse bis zum Öffnen der mPTP dargestellt. Die Messung wurde unter Zugabe von $0,5 \mu\text{M}$ Ciclosporin A zur Blockade der mPTP wiederholt.

2.2.11 Statistik

Die Erfassung der Daten erfolgte mit Hilfe von Microsoft Excel, die Auswertung mittels GraphPadPrism. Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte \pm Standard-Abweichung dargestellt.

Zur Testung auf Normalverteilung der Messergebnisse wurde der Kolmogorow-Smirnow-Test durchgeführt. Anschließend erfolgte ein ungepaarter, zweiseitiger t-Test. Zur Korrektur für Messwiederholungen wurde die Holm-Sidak-Methode genutzt. Fortlaufende Daten wurden durch die Nutzung einer zwei-wegigen (2-Way-) ANOVA in Kombination mit dem Fisher's-LSD Test analysiert. p-Werte unter $0,05$ wurden als statistisch signifikant (*), p-Werte unter $0,01$ als hochsignifikant (**) definiert und gekennzeichnet.

2.2.12 Raman-Spektroskopie

Die Untersuchung der Mitochondrien erfolgte mittels des BioRam[®]-Systems der Firma CellTool (s. Tab. 6). Dieses Gerät vereint einen nicht-zelldestruktiven [105] 785-nm -Dioden-Laser mit einem 60-fach Wasserimmersionsobjektiv zur Fokussierung der Proben. Vor Messbeginn wurde das Gerät unter Verwendung eines Silizium-Standards kalibriert.

$500 \mu\text{g}$ Mitochondrien wurden zehn Minuten bei 3000 G zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in $200 \mu\text{l}$ Puffer M gelöst. Die Suspension wurde in eine Glas-Messkammer überführt und diese im Messsystem fixiert. In der digitalen Hellfeldmikroskopie stellten sich die Mitochondrien als rundliche, sedimentierte Strukturen oberhalb des Glasbodens dar (s. Abb. 6). Der circa $1 \mu\text{m}^3$ große Laserfokus wurde direkt auf diese Strukturen gerichtet. Bei einer Leistung des Lasers von 80 mW wurden akkumulierte Scans von jeweils $4 \times 10 \text{ s}$ Messdauer durchgeführt [106].

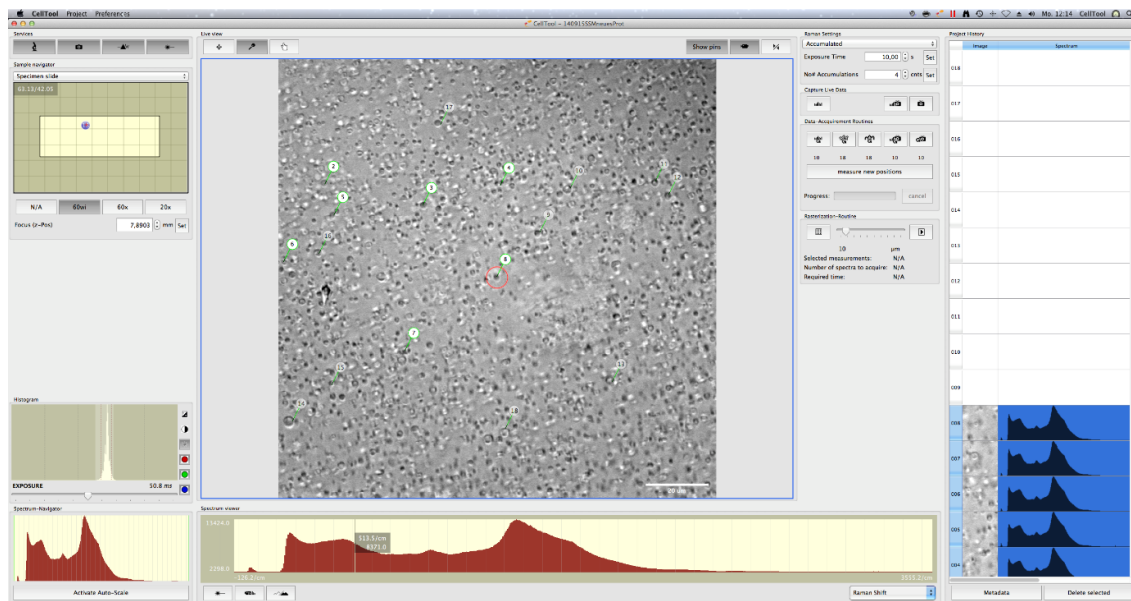


Abbildung 6: Mitochondrien in der digitalen Hellfeldmikroskopie des BioRam-Systems. Die nummerierten Markierungshilfen zeigen die genaue Messposition an.

Messprotokoll

Da an diesem Standort zum ersten Mal eine Raman-spektroskopische Untersuchung von Mitochondrien erfolgte, dienten Vorversuche zur Etablierung der Methode. Tabelle 9 gibt einen Überblick über die verwendeten Substanzen, Anzahl der Experimente sowie Messpunkte. Für den zweiten Vorversuch wurden SSM ohne Zusatz eines Membranschutzes rasch eingefroren, um die Integrität der Mitochondrien-Membran zu zerstören.

Tabelle 9: Für Vorversuche durchgeführte Messungen am Raman-Spektroskop.

<u>Testsubstanz</u>	<u>Anzahl Experimente (n)</u>	<u>Anzahl Messpunkte</u>
Puffer M	1	40
Gefrorene SSM	1	100

Zur Vergleichbarkeit der Respirationsstadien wurden die Messungen analog zum Protokoll der Clark-Elektrode durchgeführt. Um die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen, ein Mitochondrium in den Laserfokus zu ziehen, wurde am Raman-Spektroskop eine höhere Konzentration der Mitochondrien verwendet. Entsprechend wurden die Substrate zur Induktion der Respirationsstadien in äquimolarer Konzentration pipettiert. Tabelle 10 gibt

Material und Methoden

einen Überblick über die Respirationsstadien, Mindestanzahl der Experimente sowie Mindestanzahl der Messpunkte.

Tabelle 10: Zur IR-Analyse in den Respirationsstadien durchgeführte Messungen am Raman-Spektroskop.

Respirationsstadium	Mindestzahl Experimente (n)	Mindestzahl Messpunkte
Grundbedarf	4	80
RS 2	4	80
RS 3	4	12
RS 4	4	80
Oligomycin-Zugabe	4	80
FCCP-Zugabe	4	80

Datenbehandlung

Mit Hilfe der systeminternen Software wurde der Datensatz in einen Wellenzahl-Bereich von 400 - 1800 cm^{-1} geschnitten. Die darauf folgende Basislinien-Korrektur [107] korrigierte den Einfluss des Glasbodens auf die Spektren.

Die Software „The Unscrambler X“ (s. Tab. 8) diente zur Anwendung von Median Filter und Einheitsvektor-Normalisierung. Anschließend erfolgte eine Hauptkomponenten-Analyse der mittenzentrierten Daten mit zehn Hauptkomponenten unter Nutzung von NIPALS-Algorithmus und Kreuzvalidation [106]. Die Ergebnisse wurden als Scores-Plot dargestellt. Mittelwertspektren wurden erstellt und markante Wellenzahl-Bereiche auf ihre biologische Relevanz überprüft.

Darstellung der Ergebnisse

Die Ergebnisse der Hauptkomponenten-Analyse (PCA) wurden als Scores-Plot mit den jeweiligen Hauptkomponenten (PC's) dargestellt. Um zu überprüfen, ob einzelne Messstage für eine Aufteilung des gesamten Datensatzes verantwortlich waren, wurden die Messtage einzeln markiert und erneut eine PCA durchgeführt. Anschließend wurden die Mittelwert-Spektren analysiert. Dabei zeigt die Y-Achse die relative Intensität. Die X-Achse gibt Auskunft über die Wellenzahl (WZ) in $1 / \text{cm}$.

Material und Methoden

Markante WZ-Bereiche, in denen sich Gruppen im Mittelwertspektrum unterschieden, wurden identifiziert und auf ihre Relevanz zur Auftrennung des Datensatzes überprüft. Dazu erfolgte eine erneute PCA selektiv im zu überprüfenden Bereich. Eine klare Auftrennung über die PC-1 mit mindestens 90 % sprach für den hohen Einfluss und damit die Relevanz des WZ-Bereiches.

3. Ergebnisse

3.1 Myokardiale Funktion während der Langendorff-(Re-)Perfusion

Der maximale, linksventrikuläre Druck (LVP_{max}), die Kontraktilität ($LVP dp/dt_{max}$), der mittlere Koronarfluss und die Herzfrequenz wurden während der (Re-)Perfusion in der Langendorff-Anlage kontinuierlich gemessen und die Werte in Fünf-Minuten-Intervallen ausgewertet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 11 dargestellt.

LVP_{max}

Zu Beginn der Messung, sowie nach fünf, zehn und 25 Minuten reduzierte IR40/30 den LVP_{max} im Vergleich zur Kontrollgruppe (IR0/30) tendenziell. Nach 15-minütiger Reperfusion führte IR40/30 zu einem signifikanten Abfall des LVP_{max} ($p = 0,02$). Verglichen mit der Kontrollgruppe reduzierte IR40/30 nach 20-minütiger Reperfusion den LVP_{max} signifikant ($p = 0,004$). Sowohl in der Kontroll- als auch in der IR-Gruppe sank der LVP_{max} mit zunehmender Messdauer und näherte sich einem ähnlichen Niveau (s. Tab. 11).

$LVP dp/dt_{max}$

IR40/30 reduzierte die Kontraktilität der Herzen. Im Vergleich zur Kontrollgruppe war $LVP dp/dt_{max}$ von Beginn bis zu Minute 25 der Langendorff-Reperfusion durch IR40/30 signifikant verringert (s. Tab. 11). In beiden Gruppen sank mit zunehmender Dauer der (Re-)Perfusion die Kontraktilität der Herzen (s. Tab. 11).

Mittlerer Koronarfluss

Im Vergleich zur Kontrollgruppe reduzierte IR40/30 den mittleren Koronarfluss von Beginn bis zu Minute 25 der Reperfusion signifikant. Der mittlere Koronarfluss nach IR40/30 stieg mit zunehmender Dauer der Reperfusion, ohne jedoch das Niveau der Kontrollgruppe zu erreichen (s. Tab. 11).

Herzfrequenz

Der Herzfrequenzverlauf stellte sich inhomogen dar. In Minute fünf, 15, 20 und 25 der Langendorff-Reperfusion war eine signifikante Reduktion der Herzfrequenz durch IR40/30 zu beobachten (s. Tab. 11).

Ergebnisse

Tabelle 11: Herzfunktion in der Langendorff-Anlage; Ergebnisse der 2-wegigen (2-Way-) ANOVA in Kombination mit dem Fisher's LSD-Test sind als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt. n = 8 pro Gruppe; * p < 0,05; ** p < 0,01.

	Reperfu- sions- zeit [min]	Kontrolle IRO/30	IR-Gruppe IR40/30	p-Wert
LVP_{max} [mmHg]	0	92,6 \pm 17,4	72,8 \pm 25,4	0,093
	5	93,6 \pm 20,8	71,3 \pm 32,9	0,058
	10	92,0 \pm 19,2	73,4 \pm 36,1	0,113
	15	86,7 \pm 17,2	59,3 \pm 31,8	0,021 *
	20	81,0 \pm 18,9	46,4 \pm 24,3	0,004 **
	25	66,0 \pm 16,5	46,6 \pm 21,8	0,098
	30	53,6 \pm 17,3	52,6 \pm 22,4	0,933
LVP dp/dt_{max} [mmHg/s]	0	2477,3 \pm 1046,6	1476,6 \pm 753,6	0,004 **
	5	2283,6 \pm 489,8	1323,7 \pm 865,7	0,005 **
	10	2184,6 \pm 388,3	1439,0 \pm 1056,1	0,029 *
	15	2010,7 \pm 361,7	1014,8 \pm 812,1	0,004 **
	20	1798,6 \pm 491,2	666,5 \pm 639,4	0,001 **
	25	1320,5 \pm 509,7	608,4 \pm 583,4	0,037 *
	30	1041,0 \pm 537,9	975,9 \pm 490,4	0,847
Mittlerer Koronar- fluss [ml / min]	0	18,2 \pm 4,1	12,4 \pm 3,8	0,021 *
	5	18,3 \pm 3,8	12,8 \pm 4,0	0,026 *
	10	18,9 \pm 3,5	13,5 \pm 4,2	0,028 *
	15	19,6 \pm 3,5	13,8 \pm 4,5	0,021 *
	20	20,2 \pm 4,2	14,3 \pm 4,9	0,018 *
	25	20,7 \pm 6,7	14,2 \pm 4,9	0,009 **
	30	19,8 \pm 7,4	15,8 \pm 4,7	0,104
Herzfrequenz [1/s]	0	227,8 \pm 89,4	180,1 \pm 49,1	0,179
	5	263,6 \pm 62,7	165,0 \pm 50,2	0,006 **
	10	252,3 \pm 82,6	185,3 \pm 70,0	0,060
	15	245,3 \pm 79,5	172,1 \pm 50,0	0,040 *
	20	249,0 \pm 84,8	159,7 \pm 63,4	0,013 *
	25	242,3 \pm 60,2	163,0 \pm 61,2	0,027 *
	30	245,6 \pm 67,8	216,0 \pm 75,6	0,403

3.2 Atmungskettenfunktion an der Clark-Elektrode

Komplex I-V-Funktion

In der Grundbedarf-Messung bestand kein Unterschied zwischen IR- und Kontrollgruppe. Auch im Respirationsstadium (RS) 2 war kein Einfluss von IR40/30 festzustellen. Im RS 3 reduzierte IR40/30 den O₂-Verbrauch hochsignifikant ($p = 0,0001$). Im RS 4 ergaben sich keine Unterschiede zwischen IR- und Kontrollgruppe. Bei erneuter Stimulation mit ADP war der O₂-Verbrauch im RS 3' durch IR40/30 signifikant verringert ($p = 0,0002$) (s. Abb. 7).

Bei Oligomycin-Zugabe zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen IR- und Kontrollgruppe. Bei Entkopplung der Atmungskette mit FCCP reduzierte IR40/30 den Sauerstoffverbrauch signifikant ($p = 0,009$) (s. Abb. 7).

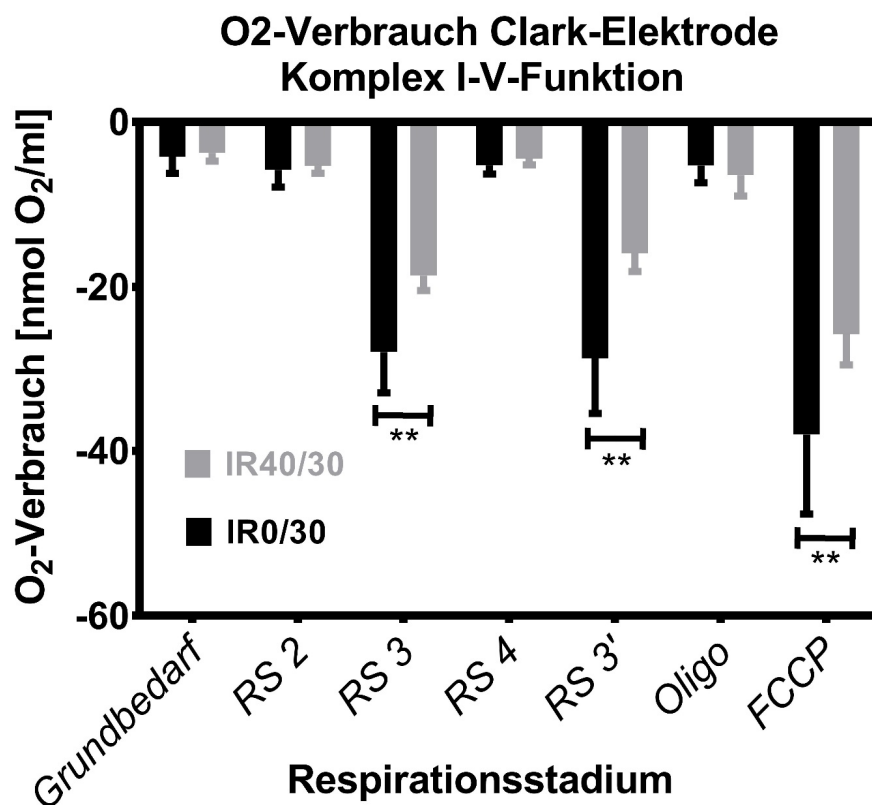


Abbildung 7: Komplex-I-V-Funktion bei Energetisierung der Atmungskette mit Malat/Pyruvat. Der gemessene O₂-Verbrauch über 30 Sekunden in den jeweiligen Respirationsstadien (RS) ist mit negativem Vorzeichen dargestellt. „Oligo“ = gemessener O₂-Verbrauch bei Oligomycin-Zugabe. „FCCP“ = gemessener O₂-Verbrauch bei FCCP-Zugabe. Die Ergebnisse des ungepaarten, zweiseitigen t-Tests sind als Mittelwert + Standardabweichung dargestellt. $n = 8$ pro Gruppe. ** $p < 0,01$.

Komplex II-V-Funktion

Im RS 2 reduzierte IR40/30 den mitochondrialen O₂-Verbrauch hochsignifikant (p = 0,005). Auch im RS 3 supprimierte IR40/30 den O₂-Verbrauch (p < 0,0001). Im RS 4 bestand kein Unterschied zwischen IR- und Kontrollgruppe. Bei erneuter ADP-Gabe verminderte IR40/30 den O₂-Verbrauch im RS 3' signifikant (p = 0,0004). Unter Oligomycin-Einfluss zeigte sich kein relevanter Unterschied zwischen IR- und Kontrollgruppe. Bei Entkopplung der Atmungskette mit FCCP reduzierte IR40/30 den mitochondrialen O₂-Verbrauch hochsignifikant (p = 0,0007) (s. Abb. 8).

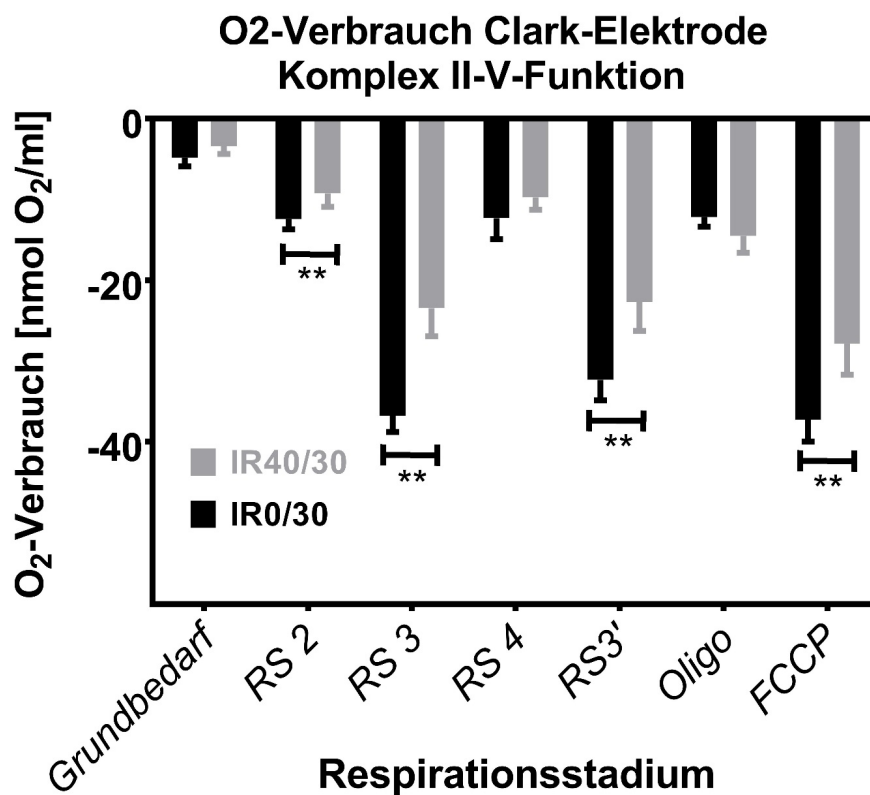


Abbildung 8: Komplex-II-V-Funktion bei Energetisierung der Atmungskette mit Succinat und Inhibition Komplex I mit Rotenone. Der gemessene O₂-Verbrauch über 30 Sekunden in den jeweiligen Respirationsstadien (RS) ist mit negativem Vorzeichen dargestellt. „Oligo“ = gemessener O₂-Verbrauch bei Oligomycin-Zugabe. „FCCP“ = gemessener O₂-Verbrauch bei FCCP-Zugabe. Die Ergebnisse des ungepaarten, zweiseitigen t-Tests sind als Mittelwert + Standardabweichung dargestellt. n = 8 pro Gruppe. **p < 0,01.

Respiratorischer Kontrollindex und Protonen-Leck

Im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigte sich der Respiratorische Kontrollindex (RCI) sowohl bei Komplex I-V-Energetisierung, als auch bei Komplex II-V- Energetisierung durch IR40/30 signifikant verringert (s. Tab. 12).

IR40/30 führte zu einem gesteigerten Protonen-Leck (H^+ -Leck) der inneren Mitochondrien-Membran. Unabhängig von der Energetisierung war das Ausmaß des Protonen-Lecks im Vergleich zur Kontrollgruppe hochsignifikant gesteigert ($p = 0,0009$ und $p = 0,0008$) (s. Tab. 12).

Tabelle 12: Parameter der Mitochondrienfunktion; Komplex I - V = Energetisierung mit Malat/Pyruvat; Komplex II - V= Energetisierung mit Succinat und Inhibition Komplex I mit Rotenone. Die Ergebnisse des ungepaarten, zweiseitigen t-Tests sind als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt; n = 6 pro Gruppe; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Parameter	Energetisierung	Kontrolle (IR0/30)	IR-Gruppe (IR40/30)	p-Wert
Respiratorischer Kontrollindex (RCI)	Komplex I - V	5,42 \pm 0,32	4,25 \pm 0,23	0,01 *
	Komplex II - V	3,11 \pm 0,18	2,41 \pm 0,04	0,003 **
H^+ -Leck	Komplex I - V	0,18 \pm 0,02	0,41 \pm 0,05	0,0009 **
	Komplex II - V	0,39 \pm 0,03	0,65 \pm 0,06	0,0008 **

3.3 Mitochondriales Membranpotential

Das mitochondriale Membranpotential bei Komplex II-V-Energetisierung ist in Abbildung 9 dargestellt. Das mitochondriale Membranpotential verhält sich dabei indirekt proportional zur Rhodamin123-vermittelten Fluoreszenz (RFU). Während der gesamten Messdauer bestand kein signifikanter Unterschied zwischen Kontroll- und IR-Gruppe. Sowohl IR40/30, als auch IR0/30 reagierten auf Entkopplung durch CCCP-Zugabe mit einem Abfall des Membranpotentials.

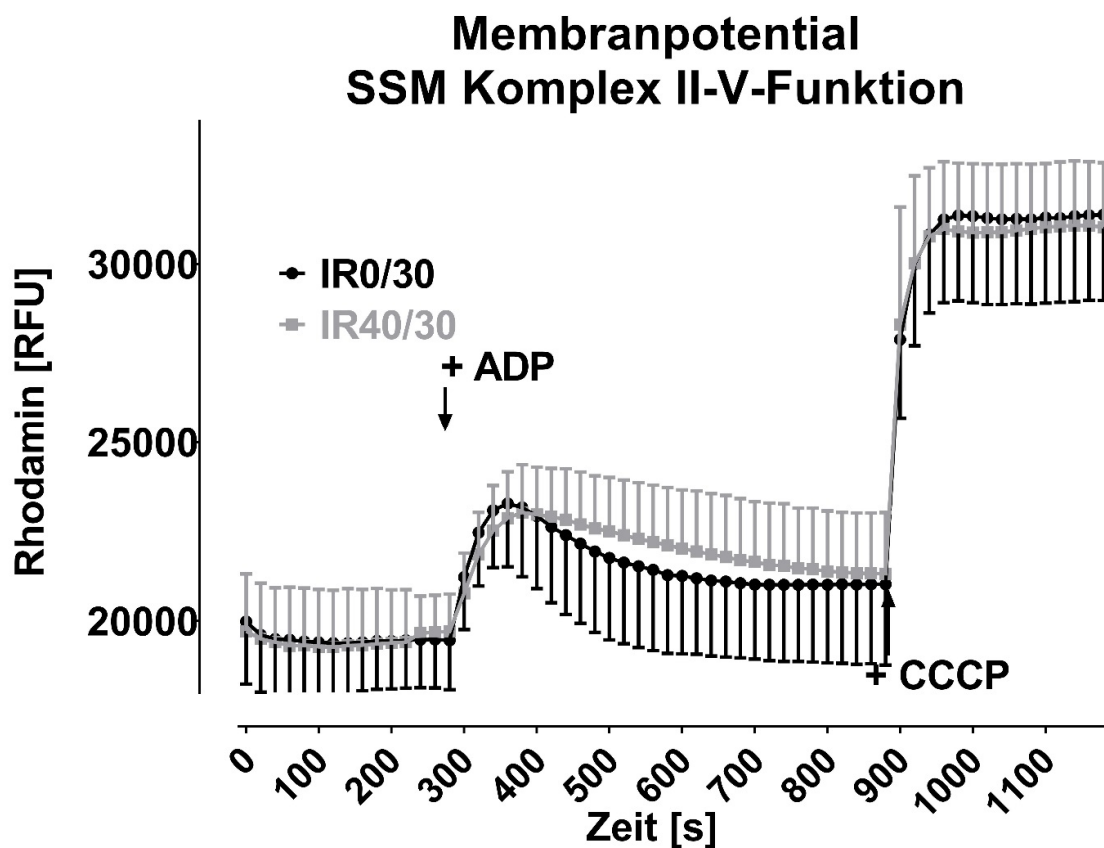


Abbildung 9: Rhodamin 123-vermittelte Fluoreszenz als Ausdruck des mitochondrialen Membranpotentials. Das Membranpotential verhält sich indirekt proportional zur Rhodamin-vermittelten Fluoreszenz (RFU). Energetisierung der AK mit Succinat und Inhibition von Komplex I mit Rotenone. Nach 300 Sekunden Zusatz von 250 mmol ADP. Nach 900 Sekunden Zusatz von 20 μ mol CCCP zur Entkopplung der Atmungskette. Ergebnisse der 2-wegigen (2-Way-) ANOVA in Kombination mit dem unkorrigierten Fisher's LSD-Test. Zur besseren Übersichtlichkeit sind die Ergebnisse von IR40/30 als Mittelwert + Standardabweichung, die Ergebnisse von IR0/30 als Mittelwert- Standardabweichung dargestellt; n = 8 pro Gruppe. In der Abbildung zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen.

3.4 ATP-Gehalt und –Produktion

Basaler ATP-Gehalt

Der basale ATP-Gehalt energetisierter Mitochondrien ist in Tabelle 13 dargestellt. Verglichen mit der Kontrolle zeigte die IR-Gruppe bei Komplex-I-Energetisierung keinen signifikant reduzierten ATP-Gehalt. In Komplex-II-energetisierten Mitochondrien reduzierte IR40/30 den basalen ATP-Gehalt signifikant ($p = 0,03$).

Tabelle 13: Basaler ATP-Gehalt energetisierter SSM. Komplex I - V = Energetisierung mit Malat/Pyruvat; Komplex II - V= Energetisierung mit Succinat und Inhibition Komplex I mit Rotenone. Die Ergebnisse des ungepaarten, zweiseitigen t-Tests sind als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt; $n = 7$ pro Gruppe; * $p < 0,05$.

ATP Gehalt [μM]	Energetisierung	Kontrolle (IR0/30)	IR-Gruppe (IR40/30)	p-Wert
	Komplex I - V	0,23 \pm 0,16	0,12 \pm 0,08	0,11
	Komplex II - V	0,19 \pm 0,16	0,04 \pm 0,03	0,03 *

ATP-Produktion

Tabelle 14: ATP-Produktion energetisierter SSM. Komplex I - V = Energetisierung mit Malat/Pyruvat; Komplex II - V= Energetisierung mit Succinat und Inhibition Komplex I mit Rotenone. Die Ergebnisse des ungepaarten, zweiseitigen t-Tests sind als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt; $n = 7$ pro Gruppe.

ATP Produktion [μM]	Energetisierung	ADP [μM]	Kontrolle (IR0/30)	IR-Gruppe (IR40/30)	p-Wert
	Komplex I - V	0,4	0,77 \pm 0,39	0,83 \pm 0,32	0,74
		0,5	0,94 \pm 0,45	1,08 \pm 0,45	0,55
		0,6	1,26 \pm 0,63	1,26 \pm 0,57	0,98
	Komplex II - V	0,4	0,35 \pm 0,27	0,17 \pm 0,07	0,12
		0,5	0,41 \pm 0,30	0,22 \pm 0,09	0,13
		0,6	0,46 \pm 0,37	0,24 \pm 0,09	0,14

IR40/30 hatte keinen signifikanten Einfluss auf die ATP-Produktions-Fähigkeit Komplex-I-V-energetisierter Mitochondrien. Nach Energetisierung von Komplex II-V bestand nach IR40/30 ein Trend zu reduzierter ATP-Produktion, ohne jedoch signifikante p-Werte zu erreichen (s. Tab. 14).

3.5 K⁺-Permeabilität

Die Abnahme der Lichtabsorption bei 520 nm Wellenlänge (A_{520}) als Folge einer erhöhten K⁺-Permeabilität ist in Abbildung 10 dargestellt.

Die Kontrollgruppe (IR0/30) zeigte im zeitlichen Verlauf eine Zunahme der K⁺-Permeabilität (s. Abb. 10). Ischämie-Reperfusion (IR40/30) steigerte die K⁺-Permeabilität der inneren Mitochondrien-Membran. Die K⁺-Permeabilität bei IR40/30 lag zu jedem Zeitpunkt der Messung hochsignifikant über der der Kontrollgruppe (alle p-Werte < 0,01) (s. Abb. 10).

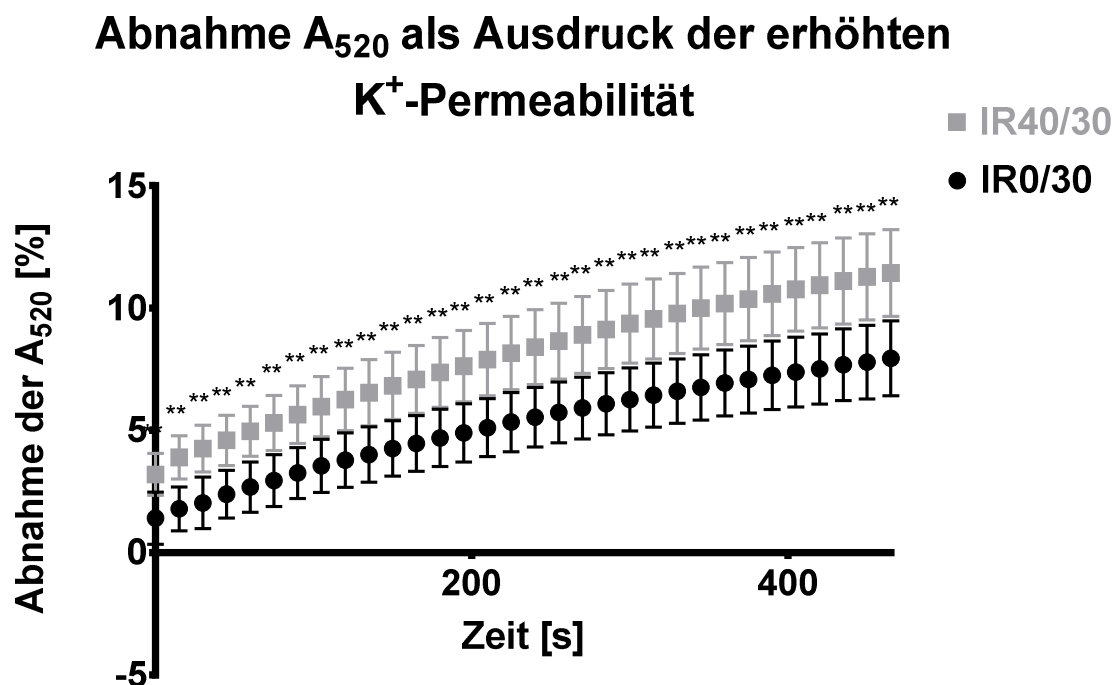


Abbildung 10: Abnahme der Licht-Absorption (A_{520}) bei 520 nm Wellenlänge in Prozent. SSM im Grundbedarf-Stadium ohne Energetisierung. Als Folge der erhöhten K⁺-Permeabilität der inneren Mitochondrien-Membran kommt es zu einer Schwellung der Mitochondrien, die sich in einer Abnahme der Lichtabsorption zeigt. Die Ergebnisse der 2-wegigen (2-Way-) ANOVA in Kombination mit dem unkorrigierten Fisher's LSD-Test sind als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt. n = 7 pro Gruppe; alle Messwertpaare unterscheiden sich hochsignifikant voneinander. **p < 0,01.

3.6 Mitochondriale Schwellung nach Öffnen der mPTP

Die Abnahme der Licht-Absorption (A_{520}) bei 520 nm Wellenlänge als Folge einer Ca^{2+} -induzierten Öffnung der mPTP mit nachfolgendem Anschwellen ist in Abbildung 11 dargestellt.

Im Vergleich zur Kontrollgruppe schwellen Komplex II-V-energetisierte SSM nach IR40/30 stärker an (s. Abb. 11). Ab der siebten Minute zeigten sich als Ausdruck unterschiedlicher mPTP-Empfindlichkeit auf Ca^{2+} signifikante Unterschiede zwischen IR- und Kontrollgruppe ($p = 0,04$). Der signifikante Einfluss von IR 40/30 auf das Anschwellen der Mitochondrien persistierte bis zum Ende der 30-minütigen Messdauer ($p < 0,05$).

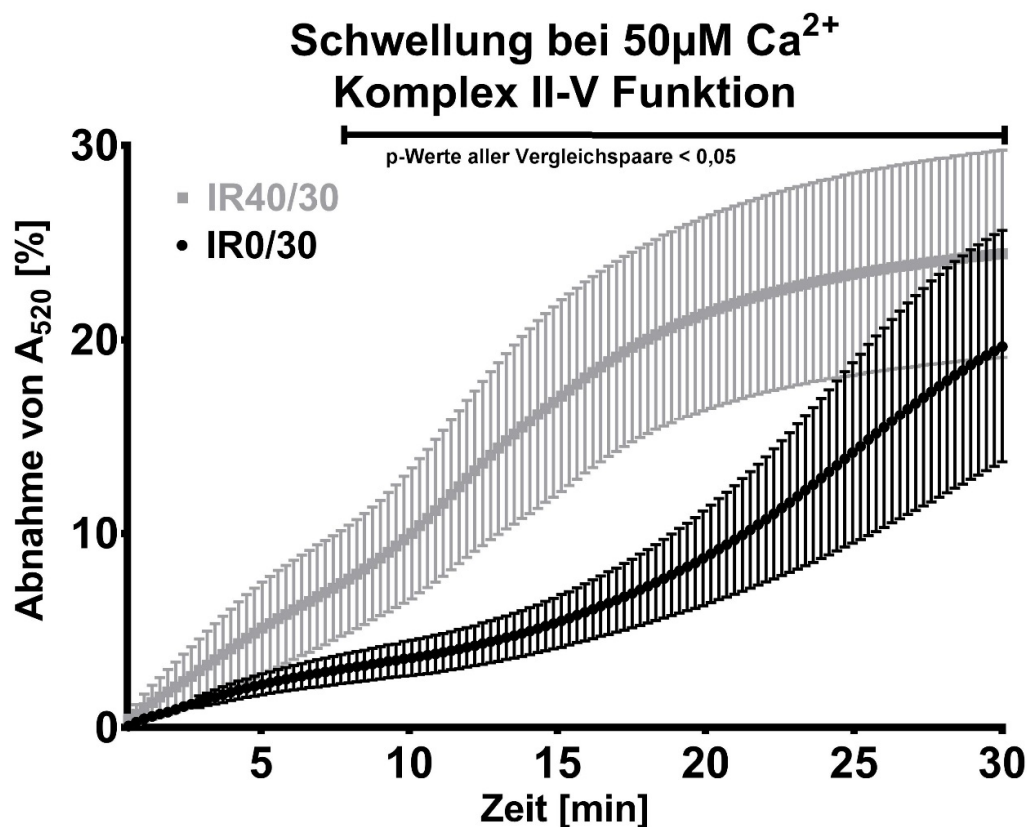


Abbildung 11: Abnahme der Absorption durch Ca^{2+} -induzierte Öffnung der mPTP mit daraus folgender Schwellung. Die Schwellung der Mitochondrien zeigt sich in einer Abnahme der Lichtabsorption. Energie-tisierung von Komplex II-V durch Zugabe von Succinat und Inhibition Komplex I mit Rotenone. Die Ergebnisse der 2-wegigen (2-Way-) ANOVA in Kombination mit dem unkorrigierten Fisher's LSD-Test sind als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt. $n = 7$ pro Gruppe.

3.7 Mitochondriale Ca^{2+} -Retentionskapazität (CRC)

Mitochondriale CRC Komplex-I-V-energetisierter SSM

Verglichen zur Kontrolle war die CRC Komplex-I-V-energetisierter SSM in der IR-Gruppe signifikant erniedrigt ($p = 0,001$) (s. Abb. 12). Der Zusatz von Cyclosporin A steigerte die CRC. Auch nach Zugabe von Cyclosporin A reduzierte IR40/30 die mitochondriale CRC signifikant ($p = 0,0005$).

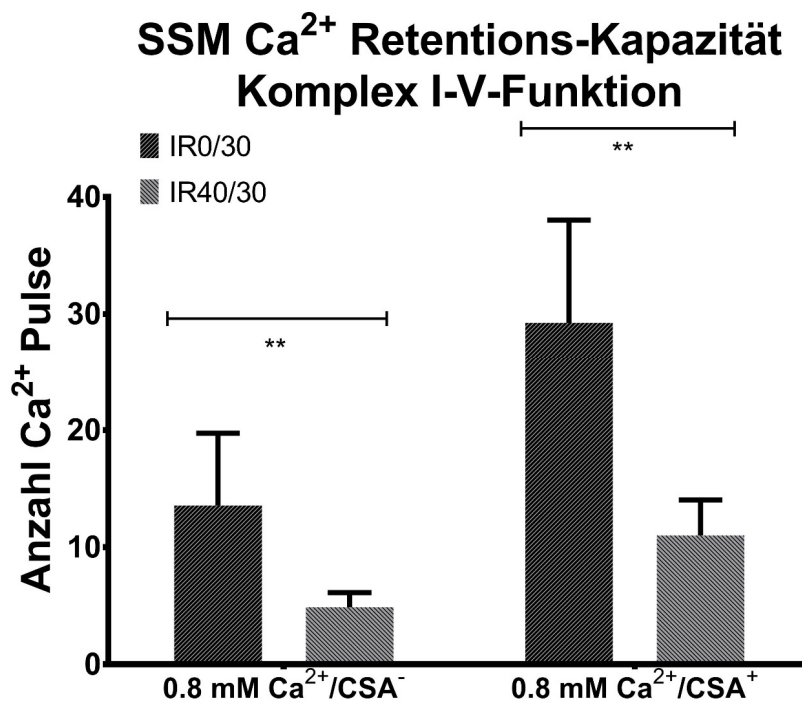


Abbildung 12: Darstellung der mitochondrialen Ca^{2+} -Retentionskapazität bei Komplex I-V-Energetisierung. Die Y-Achse zeigt die Anzahl applizierter CaCl_2 -Pulse bis zur Ca^{2+} -induzierten Öffnung der mPTP. Der linke Bildteil zeigt die CRC von KI-V-energetisierten SSM ohne Zusatz, der rechte Bildteil mit Zusatz von $0,5 \mu\text{M}$ Cyclosporin A zur Blockade der mPTP. Die Ergebnisse des ungepaarten, zweiseitigen t-Tests sind als Mittelwert + Standardabweichung dargestellt. $n = 8$ pro Gruppe. ** $p < 0,01$.

Mitochondriale CRC Komplex-II-V-energetisierter SSM

IR 40/30 führte zu einer signifikanten Reduktion der mitochondrialen CRC ($p = 0,03$).

Auch bei Zugabe von Cyclosporin A war die CRC in der IR-Gruppe signifikant reduziert ($p = 0,006$) (s. Abb. 13).

SSM Ca^{2+} Retentions-Kapazität Komplex II-V-Funktion

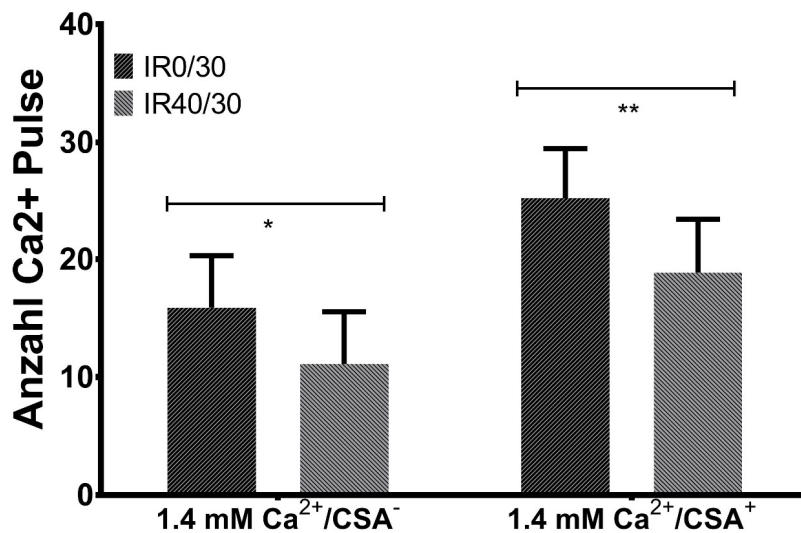


Abbildung 13: Darstellung der mitochondrialen Ca^{2+} -Retentionskapazität bei Komplex II-V-Energetisierung. Die Y-Achse zeigt die Anzahl applizierter CaCl_2 -Pulse bis zur Ca^{2+} -induzierten Öffnung der mPTP. Der linke Bildteil zeigt die CRC von Komplex II-V-energetisierten SSM ohne Zusatz, der rechte Bildteil mit Zusatz von $0,5 \mu\text{M}$ Cyclosporin A zur Blockade der mPTP. Die Ergebnisse des ungepaarten, zweiseitigen t-Tests sind als Mittelwert + Standardabweichung dargestellt. $n = 8$ pro Gruppe. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

3.8 Raman-Spektroskopie

3.8.1 Vorversuche zur Etablierung der Raman-Spektroskopie

Vorversuch Eins: Raman-Spektroskopie von Puffer M und SSM

Im Scores-Plot (s. Abb. 14) grenzten sich die Datenpunkte des Puffers M über die PC-2 von den Datenpunkten der SSM ab. Die Datenpunkte von Kontroll-(IR0/30)- und IR (IR40/30)-SSM präsentierten sich als homogene Gruppe. Die Mittelwertspektren der Datenpunkte von Puffer M und SSM verliefen unterschiedlich (s. Abb. 15). Passend zum Scores-Plot zeigten die SSM sehr ähnliche Mittelwert-Spektren.

Die nummerierten Wellenzahl (WZ)-Bereiche wurden auf ihre Relevanz überprüft (s. Abb. 16). Bis auf WZ-Bereich 2 und 3 zeigten sich sämtliche Abschnitte als relevant für die Auftrennung des Datensatzes. Die auf Relevanz untersuchten WZ-Bereiche wurden in Tab. 15 dargestellt.

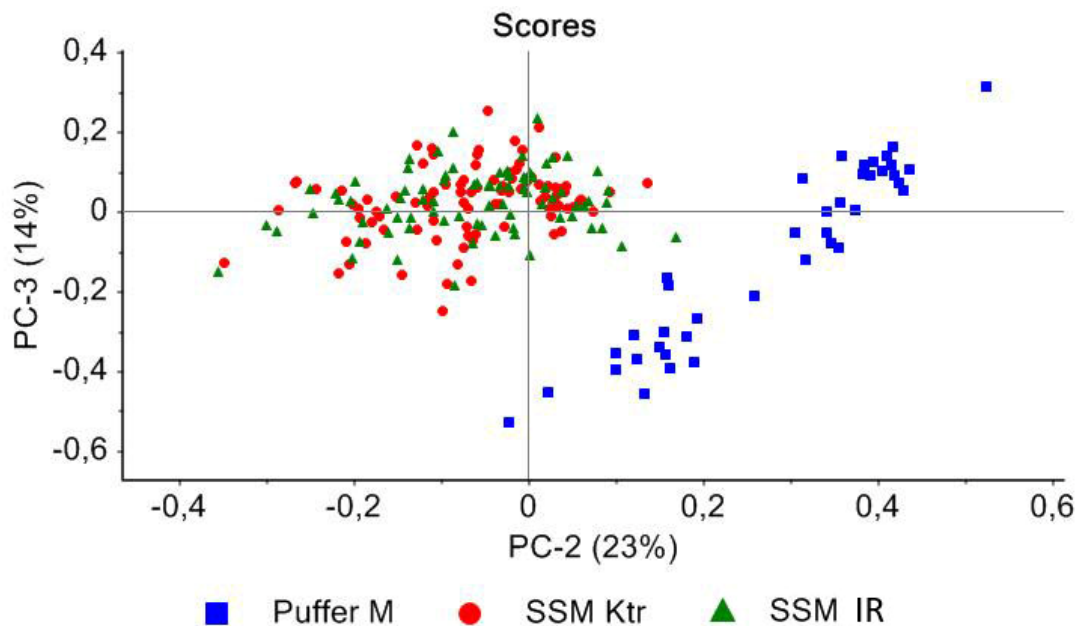


Abbildung 14: Scores-Plot der Hauptkomponenten-Analyse von Puffer M und SSM. „SSM Ktr“ = Kontroll-SSM (IR0/30); „SSM IR“ = Ischämie-Reperfusionen SSM (IR40/30). n „SSM Ktr“ und n „SSM IR“ = 4 mit jeweils 20 Messpunkten. n (Puffer M) = 1 mit 30 Messpunkten.

Ergebnisse

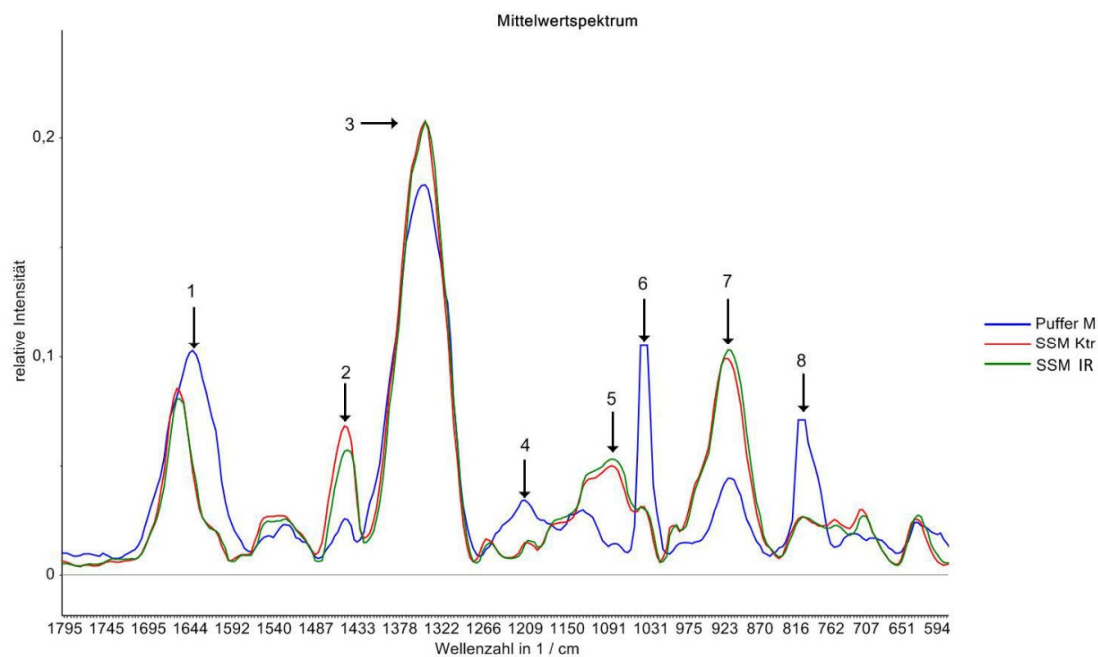


Abbildung 15: Mittelwertspektren von Puffer M und SSM. „SSM Ktr“ = Kontroll-SSM (IR0/30); „SSM IR“ = Ischämie-Reperfusion-SSM (IR40/30). n „SSM Ktr“ und n „SSM IR“ = 4 mit jeweils 20 Messpunkten. n (Puffer M) = 1 mit 30 Messpunkten.

Tabelle 15: Auflistung der in Abb. 15 identifizierten WZ-Bereiche.

<u>Nummer</u>	<u>WZ-Bereich [cm⁻¹]</u>	<u>Relevant für Auftrennung?</u>
1	1632 - 1624	Ja
2	1454 - 1445	Nein
3	1344 - 1335	Nein
4	1218 - 1209	Ja
5	1091 - 1078	Ja
6	1045 - 1036	Ja
7	932 - 923	Ja
8	811 - 797	Ja

Ergebnisse

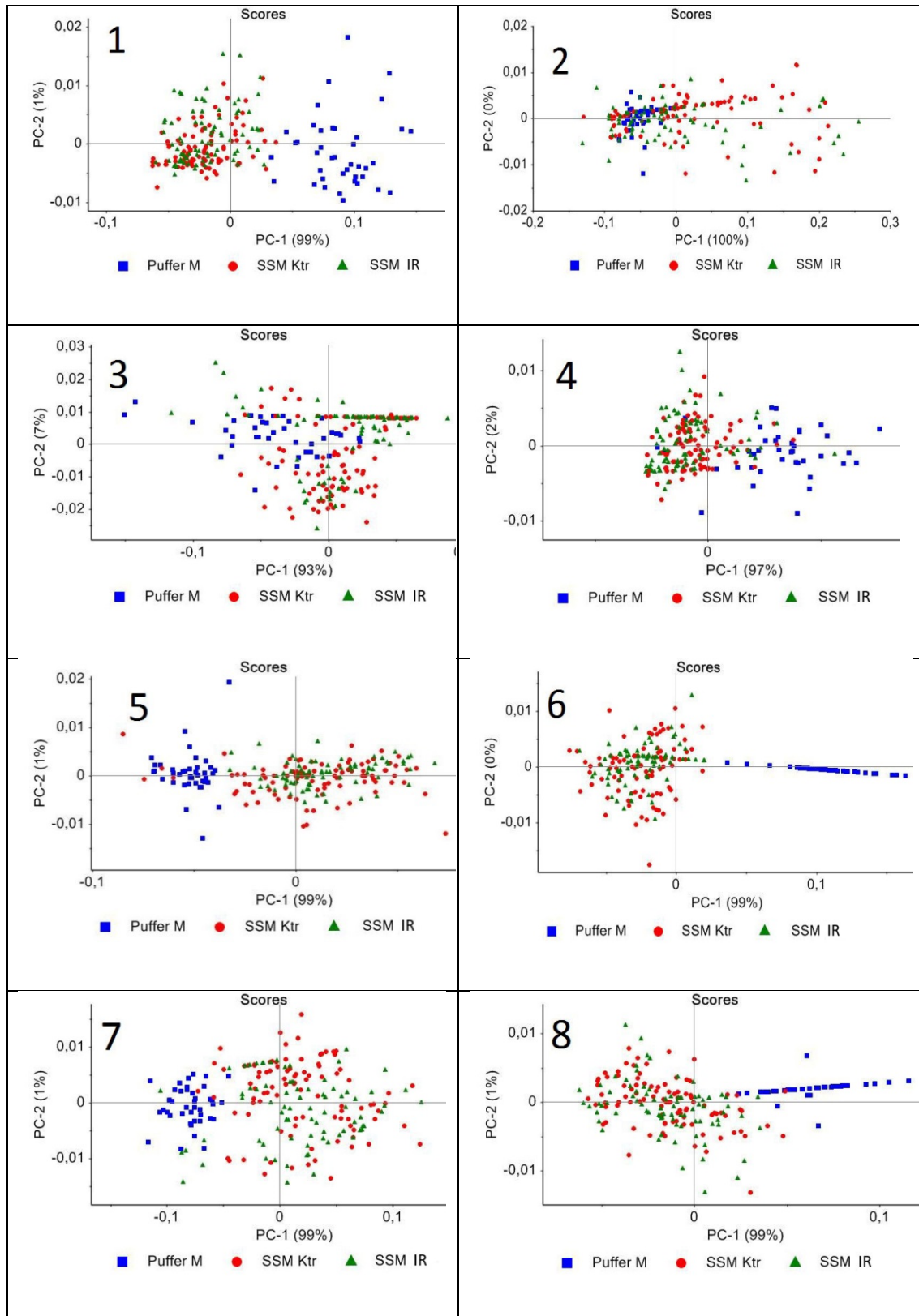


Abbildung 16: Scores-Plots der Hauptkomponenten-Analyse der in Abb. 15 markierten WZ-Bereiche. Zur Überprüfung ihrer Relevanz zur Auftrennung des Datensatzes sind die Scores-Plots der einzelnen WZ-Bereiche dargestellt. n „SSM Ktr“ und n „SSM IR“ = 4 mit jeweils 20 Messpunkten. n (Puffer M) = 1 mit 30 Messpunkten.

Vorversuch Zwei: Identifizierung SSM-typischer WZ-Bereiche

Der Scores-Plot der PCA der einzelnen Messtage (s. Abb. 17) zeigte ein homogenes Feld der Datenpunkte. Keiner der einzelnen Messtage grenzte sich von anderen Messtagen ab. Sechs charakteristische WZ-Bereiche des mitochondrialen Mittelwertspektrums wurden ausgewählt (s. Abb. 18). Diese sechs Abschnitte wurden in Tabelle 16 aufgelistet.

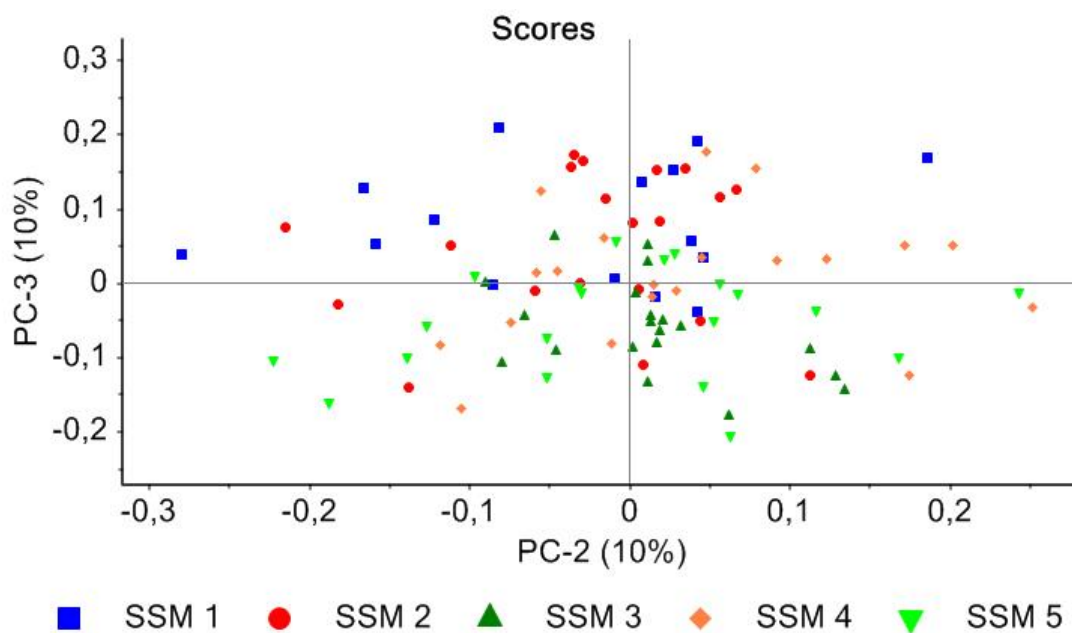


Abbildung 17: Scores-Plot der Hauptkomponenten-Analyse von Kontroll-SSM. Die fünf einzelnen Messtage sind farblich markiert und mit „SSM 1“ bis „SSM 5“ benannt. n (SSM 1) = 1 mit 15 Messpunkten. n (SSM 2 – SSM 5) = 1 mit jeweils 20 Messpunkten.

Ergebnisse

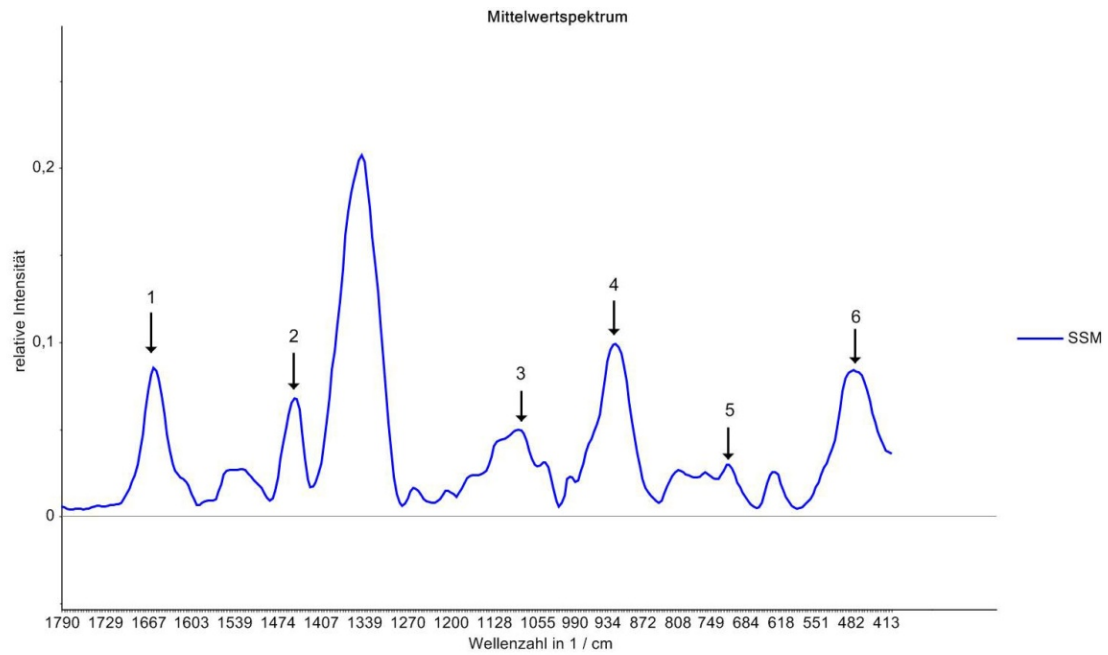


Abbildung 18: Mittelwertspektrum von Kontroll-SSM. $n(\text{SSM}) = 5$ mit 95 Messpunkten.

Tabelle 16: Auflistung der in Abb. 18 identifizierten WZ-Bereiche.

<u>Nummer</u>	<u>WZ-Bereich [cm⁻¹]</u>
1	1663 - 1655
2	1453 - 1445
3	1087 - 1078
4	929 - 920
5	724 - 714
6	487 - 477

Vorversuch Drei: Raman-Spektroskopie von gefrorenen und nicht-gefrorenen SSM

Im Scores-Plot (s. Abb. 19) trennte hauptsächlich PC-3 und in geringem Maß PC-2 die Gruppen „Frozen“ und „Not Frozen“ auf. Beide Gruppen zeigten sich weit gestreut. In Bildmitte bestand ein überlappender Bereich, in dem Datenpunkte sowohl gefrorener als auch nicht-gefrorener Mitochondrien positioniert waren.

Die einzelnen Messtage der Gruppe „Not Frozen“ wurden farbig markiert (s. Abb. 20). Im Scores-Plot fiel keiner der Messtage aus der homogenen Gruppe heraus. Die Mittelwertspektren der beiden Gruppen unterschieden sich und verliefen teils deutlich höhenverschoben (s. Abb. 21). Insgesamt wurden 6 markante WZ-Bereiche markiert und auf ihre Relevanz überprüft (s. Abb. 22). Dabei erwiesen sich WZ-Bereich Nummer 2, 4, 5 und 6 als relevant für die Auftrennung des Datensatzes (s. Tab. 17). Im Balkendiagramm zeigte sich die hohe Standardabweichung der WZ-Bereiche Nummer 1 und 3 (s. Abb. 23).

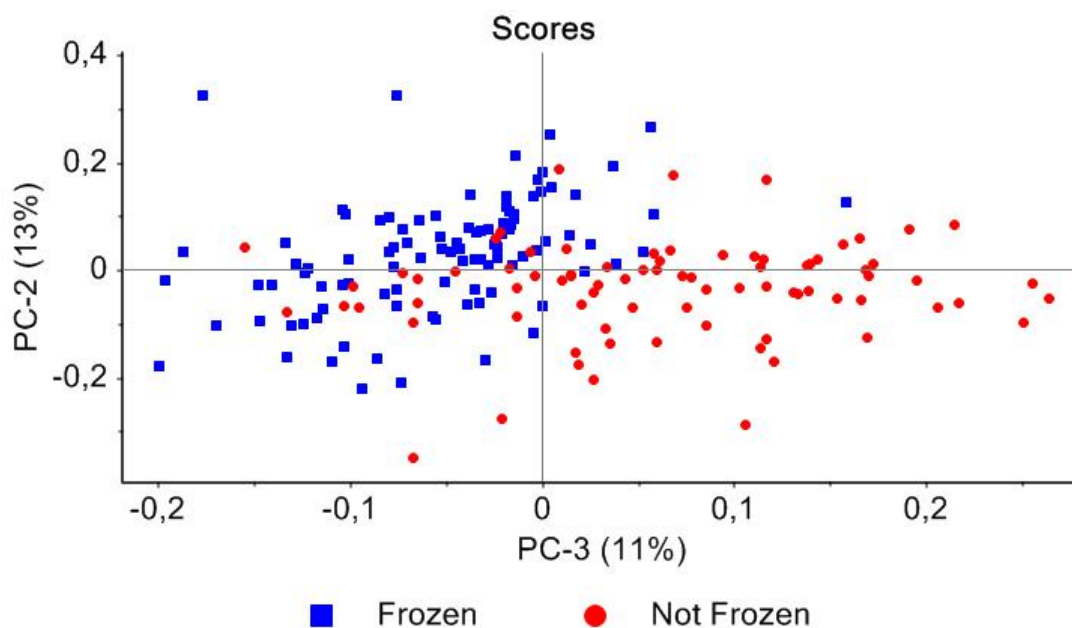


Abbildung 19: Scores-Plot der Hauptkomponenten-Analyse von gefrorenen („Frozen“) und frisch aufbereiteten („Not Frozen“) Mitochondrien. n (Frozen) = 1 mit 100 Messpunkten. n (Not Frozen) = 4 mit 80 Messpunkten.

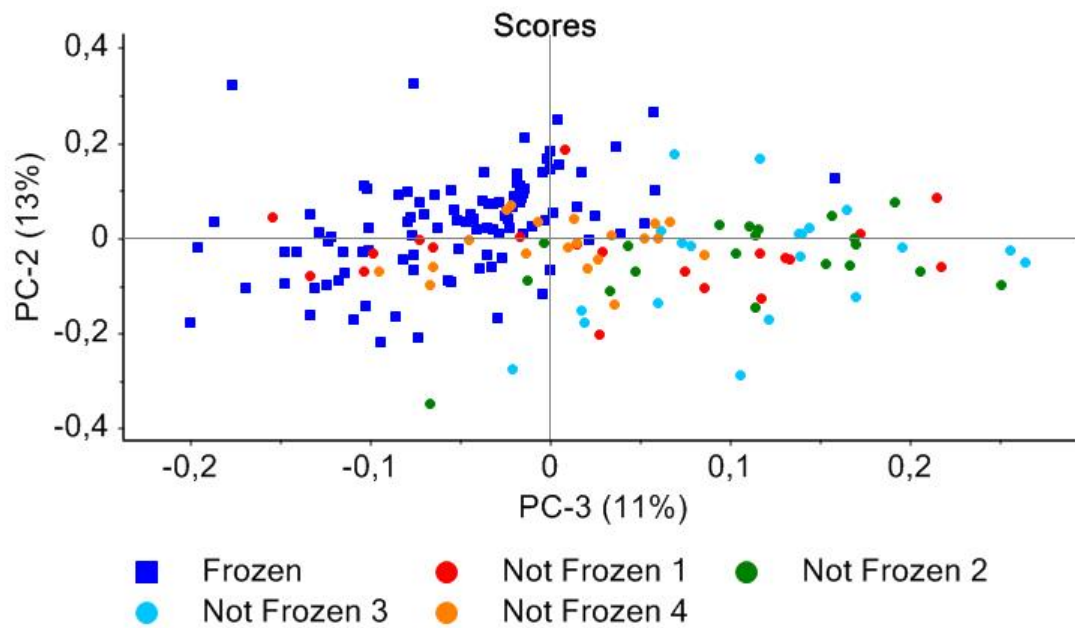


Abbildung 20: Scores-Plot der Hauptkomponenten-Analyse von gefrorenen („Frozen“) und frisch aufbereiteten („Not Frozen“) Mitochondrien. Die einzelnen Messstage der Gruppe „Not Frozen“ sind farblich markiert. n (Frozen) = 1 mit 100 Messpunkten. n (Not Frozen) = 1 mit 20 Messpunkten.

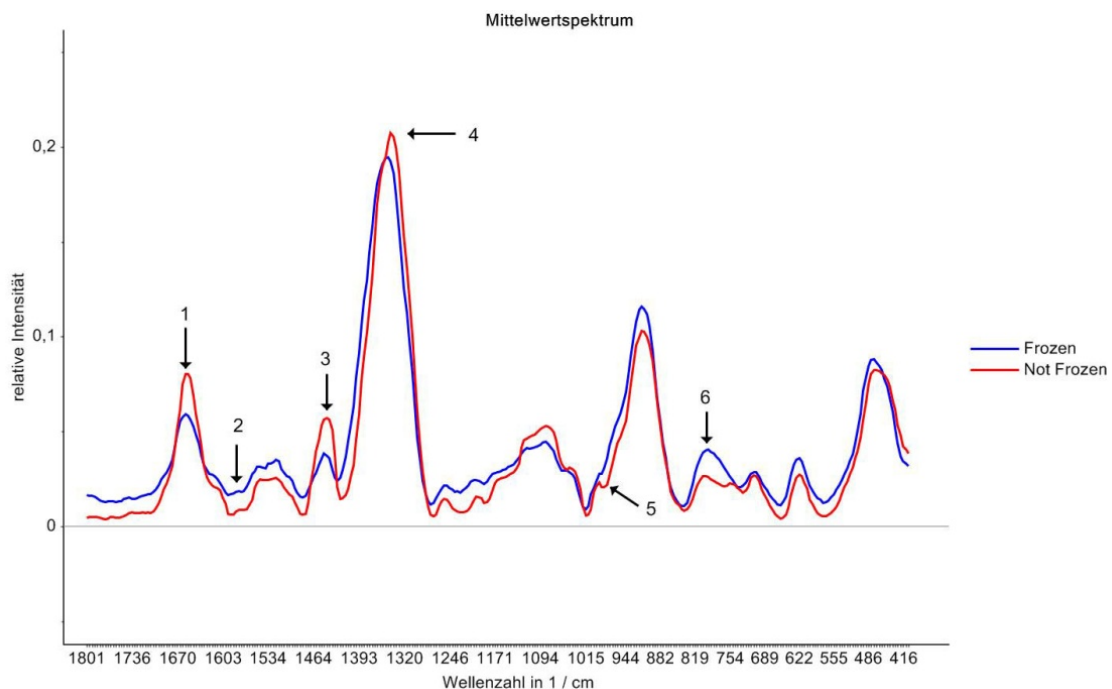


Abbildung 21: Mittelwertspektren von gefrorenen („Frozen“) und frisch aufbereiteten („Not Frozen“) Mitochondrien. n (Frozen) = 1 mit 100 Messpunkten. n (Not Frozen) = 4 mit 80 Messpunkten.

Ergebnisse

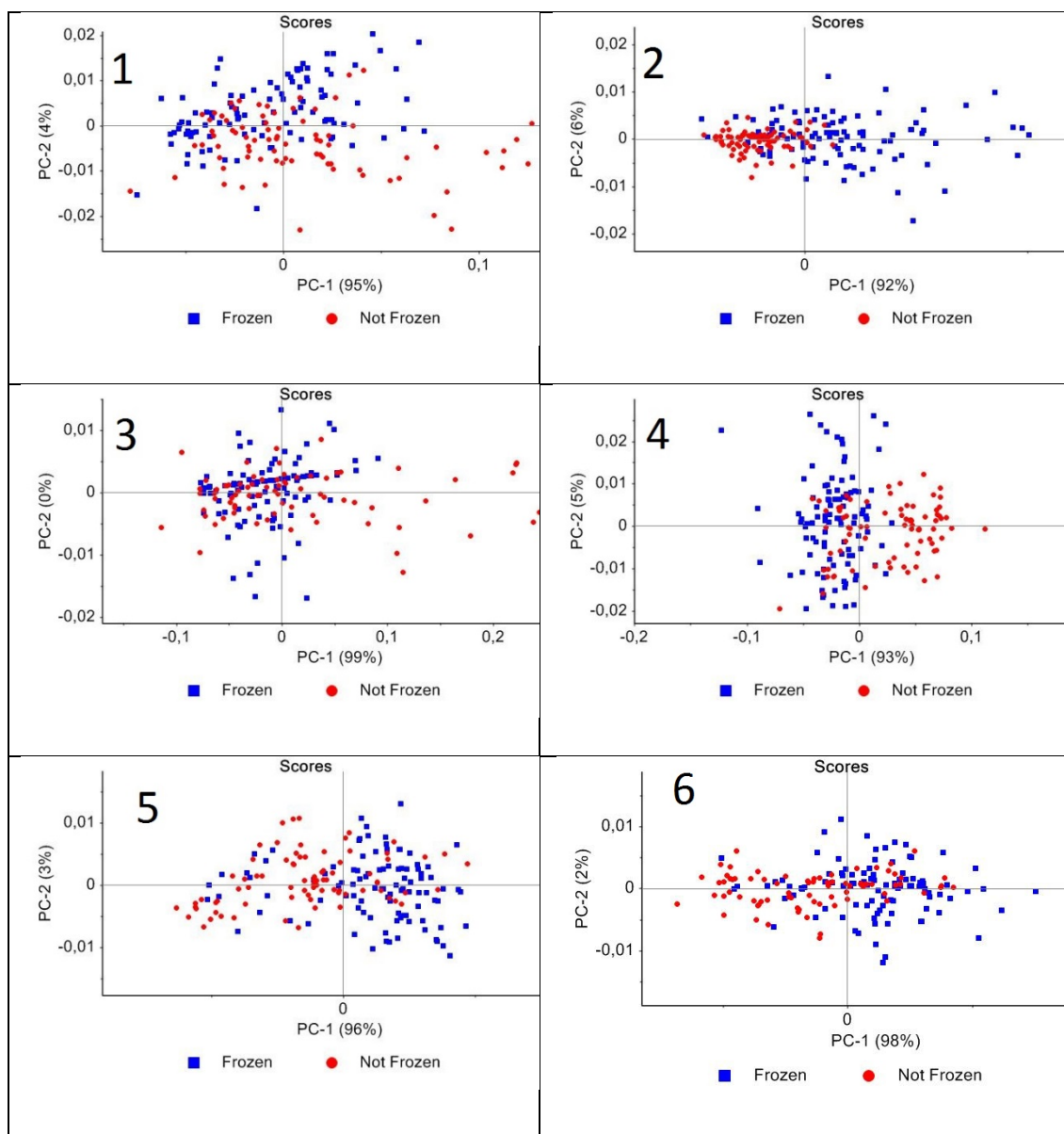


Abbildung 22: Scores-Plots der Hauptkomponenten-Analyse der in Abb. 21 markierten WZ-Bereiche. Zur Überprüfung ihrer Relevanz zur Auftrennung des Datensatzes sind die Scores-Plots der einzelnen WZ-Bereiche dargestellt. n (Frozen) = 1 mit 100 Messpunkten. n (Not Frozen) = 4 mit 80 Messpunkten.

Tabelle 17: Auflistung der in Abb. 21 identifizierten WZ-Bereiche.

Nummer	WZ-Bereich [cm⁻¹]	Relevant für Auftrennung?
1	1670 - 1662	Nein
2	1591 - 1583	Ja
3	1453 - 1442	Nein
4	1333 - 1325	Ja
5	977 - 968	Ja
6	799 - 789	Ja

Ergebnisse

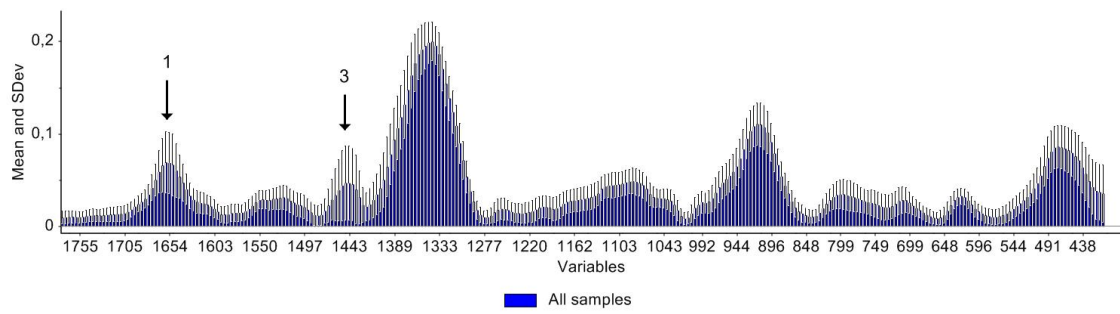


Abbildung 23: Mittelwert und Standardabweichung aller Datenpunkte im Balkendiagramm. Die für die Auftrennung des Datensatzes nicht relevanten WZ-Bereiche Nummer 1 und 3 sind gesondert markiert. $n = 5$ mit 180 Messpunkten.

3.8.2 Einfluss von IR40/30 auf die Atmung von SSM

Um Einflüsse von IR40/30 darzustellen, wurden Ischämie-Reperfusions-SSM („SSM IR“-IR40/30) mit Kontroll-SSM („SSM Ktr“ – IR0/30) verglichen. Dabei wurden analog zum Protokoll der Clark-Elektrode die unterschiedlichen Respirationsstadien durch Substratzugabe induziert und Unterschiede zwischen beiden Gruppen dargestellt.

IR40/30-Einfluss bei Grundbedarf-Messung

In der PCA bildeten die die Datenpunkte der beiden Gruppen „SSM Ktr“ und „SSM IR“ ein homogenes Feld (Daten nicht gezeigt). Die Mittelwertspektren verliefen annähernd identisch (s. Abb. 24). Es zeigten sich keine relevanten WZ-Bereiche, die auf Auswirkungen von IR40/30 zurückzuführen waren.

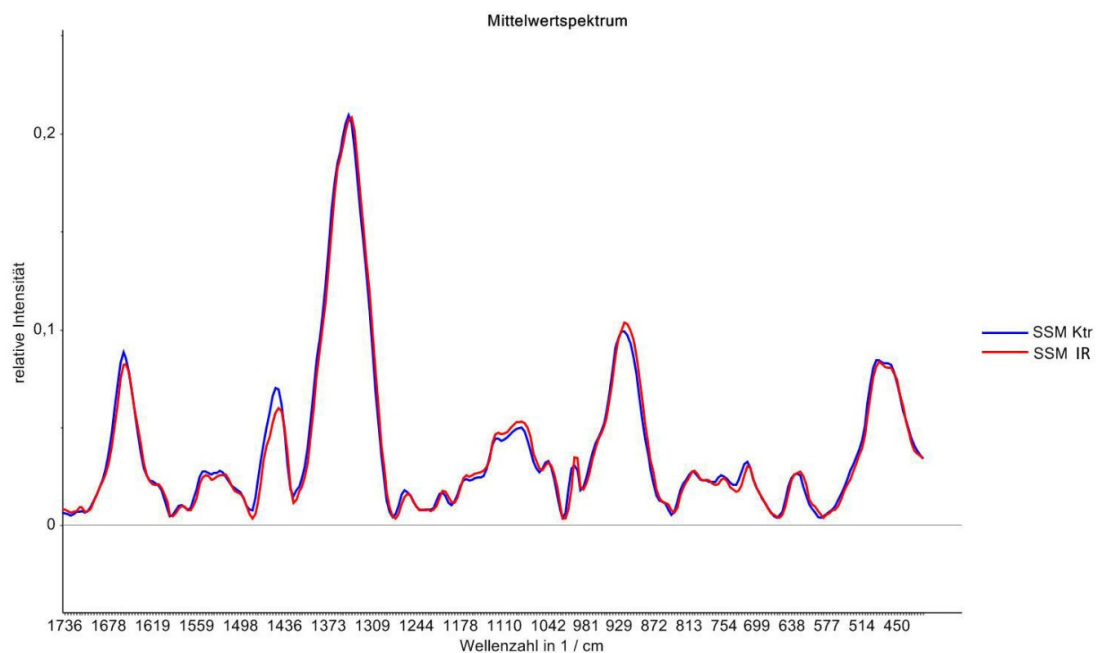


Abbildung 24: Mittelwertspektren von IR- und Kontroll-SSM bei Grundbedarf-Messung. „SSM Ktr“ = Kontroll-SSM (IR0/30); „SSM IR“ = Ischämie-Reperfusions-SSM (IR40/30). n (SSM Ktr) = 5 mit 95 Messpunkten. n (SSM IR) = 4 mit 80 Messpunkten.

IR40/30-Einfluss im Respirationsstadium 2

In Respirationsstadium 2 war im Scores-Plot der PCA keine Auftrennung zwischen den Gruppen „SSM Ktr“ und „SSM IR“ sichtbar (Daten nicht gezeigt). Die Mittelwertspektren zeigten einen annähernd identischen Verlauf (s. Abb. 25). Relevante WZ-Bereiche, die zur Auftrennung der beiden Gruppen beitrugen, fanden sich nicht.

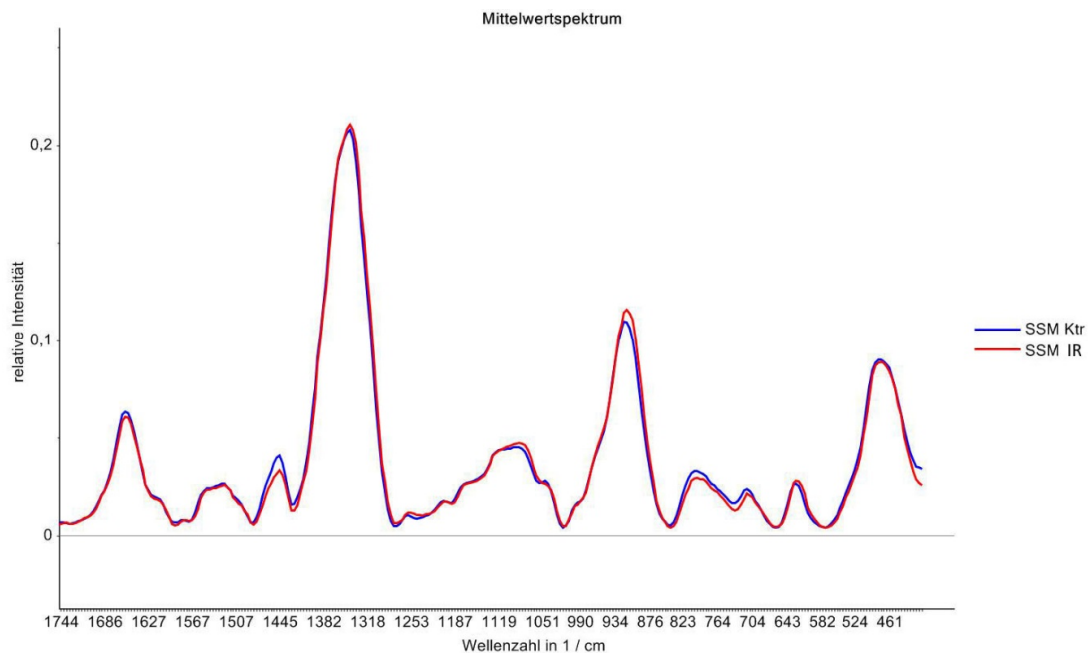


Abbildung 25: Mittelwertspektren von Kontroll- und IR-SSM im Respirationsstadium 2. „SSM Ktr“ = Kontroll-SSM (IR0/30); „SSM IR“ = Ischämie-Reperfusions-SSM (IR40/30). n (SSM Ktr) =5 mit 100 Messpunkten. n (SSM IR) = 4 mit 80 Messpunkten.

IR40/30-Einfluss im Respirationsstadium 3

Respirationsstadium 3 erwies sich als nicht auswertbar. Die Erklärung für die Schwierigkeiten bezüglich der Messung findet sich in der Diskussion.

IR40/30-Einfluss im Respirationsstadium 4

Im Scores-Plot grenzte sich ein Cluster der Kontroll-SSM vom Rest der Datenpunkte ab (s. Abb. 26, Bildteil A). Hauptsächlich der dritte Messtag der Kontroll-SSM war für die Clusterbildung verantwortlich (s. Abb. 26, Bildteil B). Der Großteil der Datenpunkte der SSM überlagerte einander homogen und ließ keine Auftrennung zu.

Die Mittelwertspektren (s. Abb. 27) der beiden Gruppen unterschieden sich in fünf WZ-Bereichen (s. Tab. 18). Dabei erwiesen sich die WZ-Bereiche Nummer 1, 2, 4 und 5 als tendenziell relevant für die Auftrennung des Datensatzes. Um zu überprüfen, ob allein die Clusterbildung des dritten Messtags für die Auftrennung verantwortlich war, wurde dieser jeweils in den mit „B“ bezeichneten Plots farbig markiert und erneut analysiert (s. Abb. 28).

In diesen Plots ordneten sich die Datenpunkte des dritten Messtags den Kontroll-SSM zu. Eine Auftrennung allein auf Grund der oben genannten Clusterbildung konnte ausgeschlossen werden. Damit erwiesen sich die WZ-Bereiche Nummer 1, 2, 4 und 5 als tendenziell relevante Korrelate des IR40/30-Einflusses.

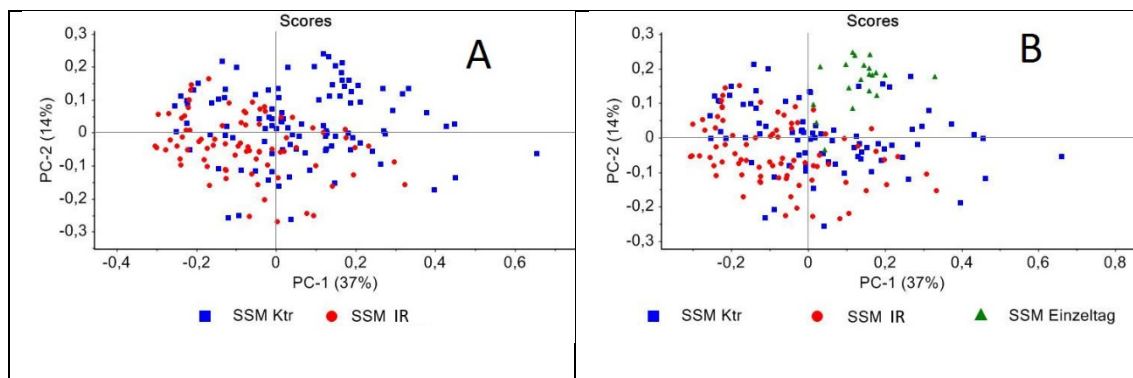


Abbildung 26: Scores-Plots der Hauptkomponenten-Analyse von IR- und Kontroll-SSM im Respirationsstadium 4. n (SSM Ktr) = 5 mit 100 Messpunkten. n (SSM IR) = 4 mit 80 Messpunkten. Im rechten Bildteil ist der dritte Messtag der Kontroll-SSM, der für die Clusterbildung im linken Bildteil verantwortlich ist, farbig abgegrenzt und mit „SSM Einzeltag“ benannt.

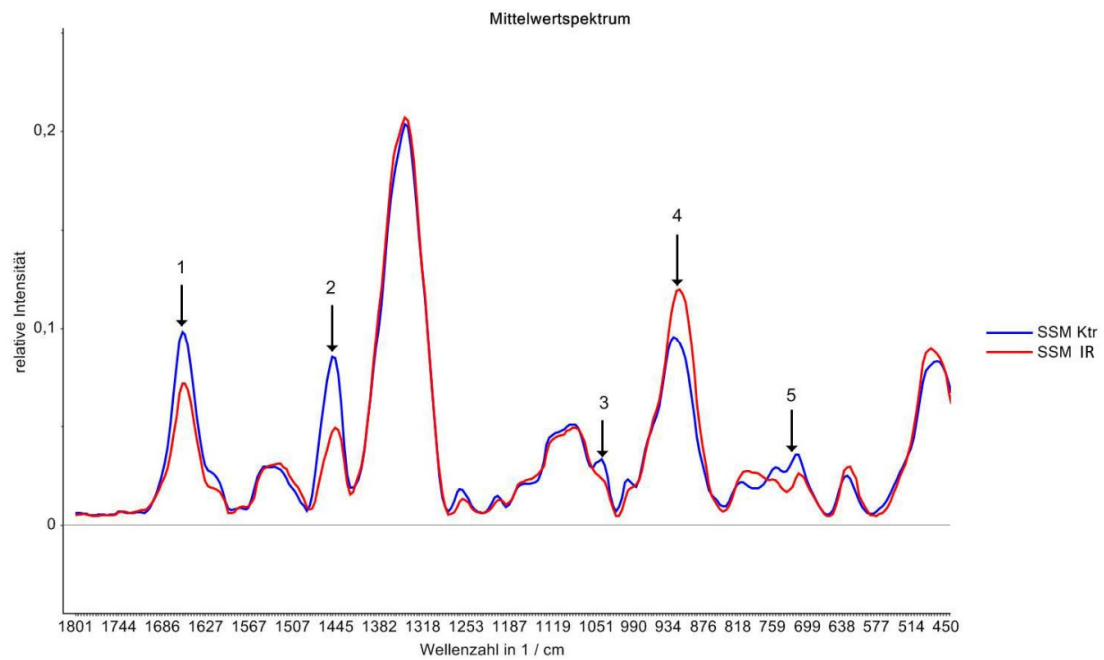
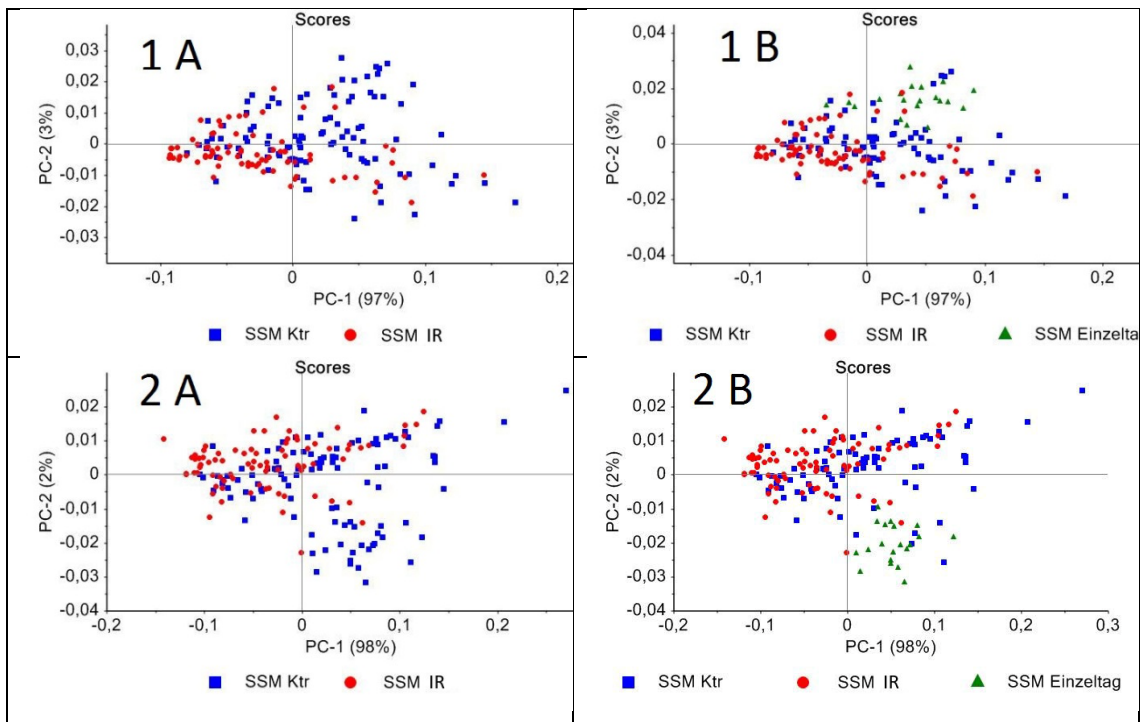


Abbildung 27: Mittelwertspektren von IR- und Kontroll-SSM im Respirationsstadium 4. „SSM Ktr“ = Kontroll-SSM (IR0/30); „SSM IR“ = Ischämie-Reperfusion-SSM (IR40/30). n (SSM Ktr) = 5 mit 100 Messpunkten. n (SSM IR) = 4 mit 80 Messpunkten.



Ergebnisse

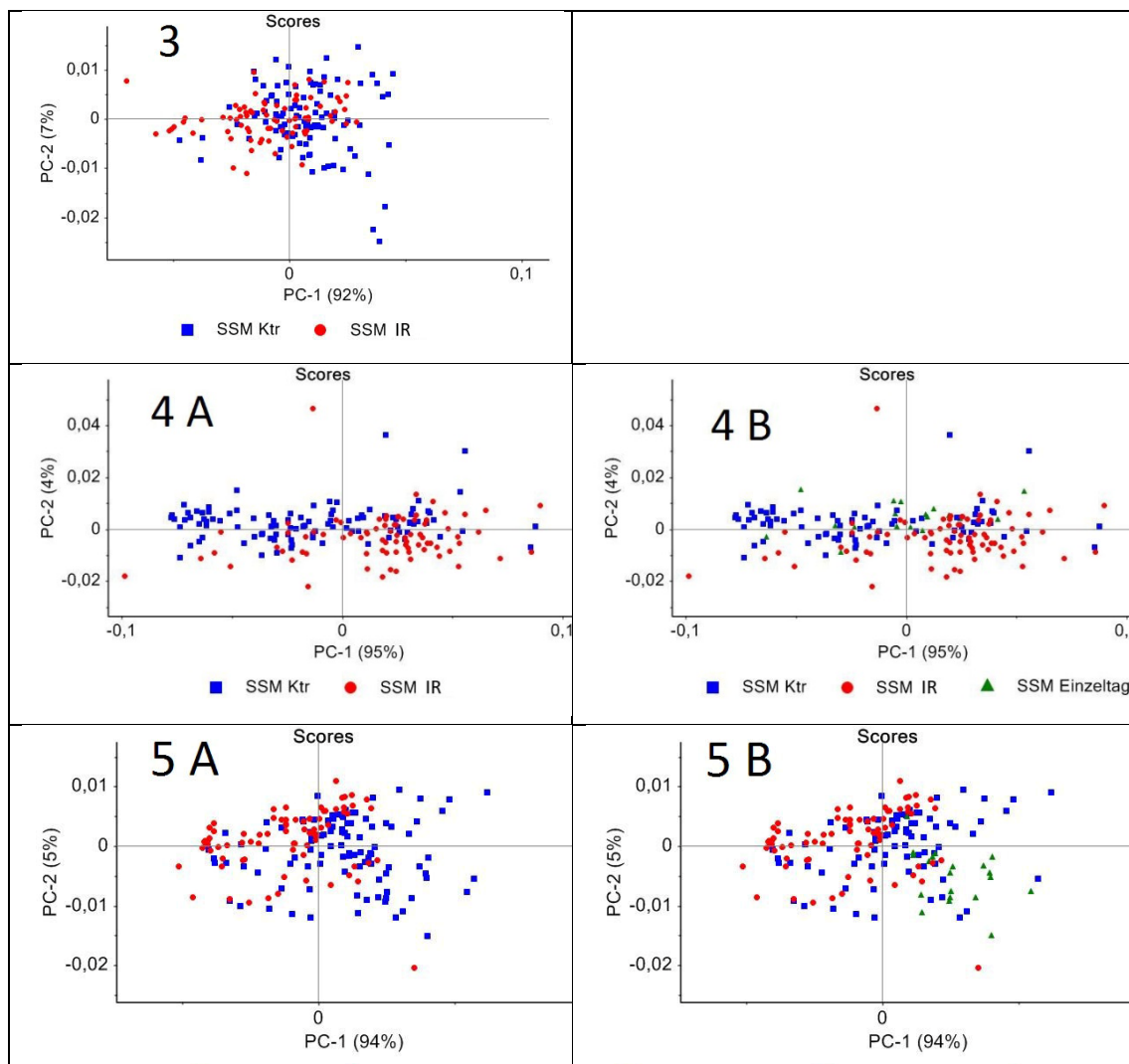


Abbildung 28: Scores-Plots der Hauptkomponenten-Analyse der in Abb. 27 markierten WZ-Bereiche. Zur Überprüfung ihrer Relevanz zur Auftrennung des Datensatzes sind die Scores-Plots der einzelnen WZ-Bereiche dargestellt. n (SSM Ktr) = 5 mit 100 Messpunkten. n (SSM IR) = 4 mit 80 Messpunkten.

Tabelle 18: Auflistung der in Abb. 27 identifizierten WZ-Bereiche.

<u>Nummer</u>	<u>WZ-Bereich [cm⁻¹]</u>	<u>Relevante Auftrennung durch IR 40/30?</u>
1 A und 1 B	1659 - 1651	Ja
2 A und 2 B	1453 - 1443	Ja
3	1046 - 1037	Nein
4 A und 4 B	929 - 920	Ja
5 A und 5 B	724 - 714	Ja

IR40/30-Einfluss bei Oligomycin-Zugabe

Im Scores-Plot der PCA zeigte sich eine tendenzielle Auftrennung des Datensatzes über die PC-1 (s. Abb. 29). In der rechten Bildhälfte positionierten sich hauptsächlich Datenpunkte der Kontroll-SSM. Links der Y-Koordinate überlagerten Datenpunkte der IR- und Kontroll-SSM einander. Es bildeten sich mehrere dichte Cluster von Datenpunkten.

Zur genaueren Analyse wurden die Messtage farblich voneinander abgegrenzt (s. Abb. 30). Die jeweils 20 Messpunkte eines Messtages zeigten sich eng gruppiert, beispielsweise „Ktr 5“ in der rechten Bildhälfte. In der linken Bildhälfte zeigten sich Messtage unabhängig von IR, so zum Beispiel „IR 4“ und „Ktr 3“. Im Mittelwertspektrum (s. Abb. 31) unterschieden sich beide Gruppen in vier WZ-Bereichen.

Diese vier Wellenzahlbereiche wurden in PCAs einzeln analysiert. Dabei zeigte IR keinen relevanten Einfluss auf die Auftrennung der Gruppen (s. Abb. 32, linke Seite). Einzelne farblich markierte Messtage wie „Ktr 5“ und „Ktr 2“ setzten sich auf der X-Achse klar ab (s. Abb. 32, rechte Seite).

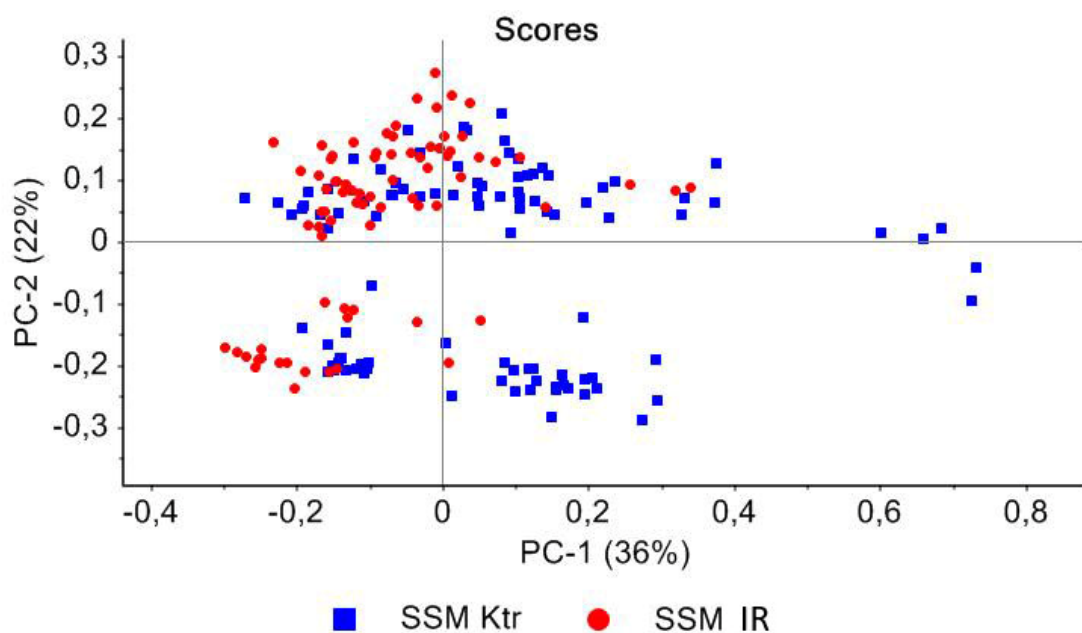


Abbildung 29: Scores-Plot der Hauptkomponenten-Analyse von IR- und Kontroll-SSM bei Oligomycin-Zugabe. „SSM Ktr“ = Kontroll-SSM (IR0/30); „SSM IR“ = Ischämie-Reperforations-SSM (IR40/30). n (SSM Ktr) = 5 mit 100 Messpunkten. n (SSM IR) = 4 mit 80 Messpunkten.

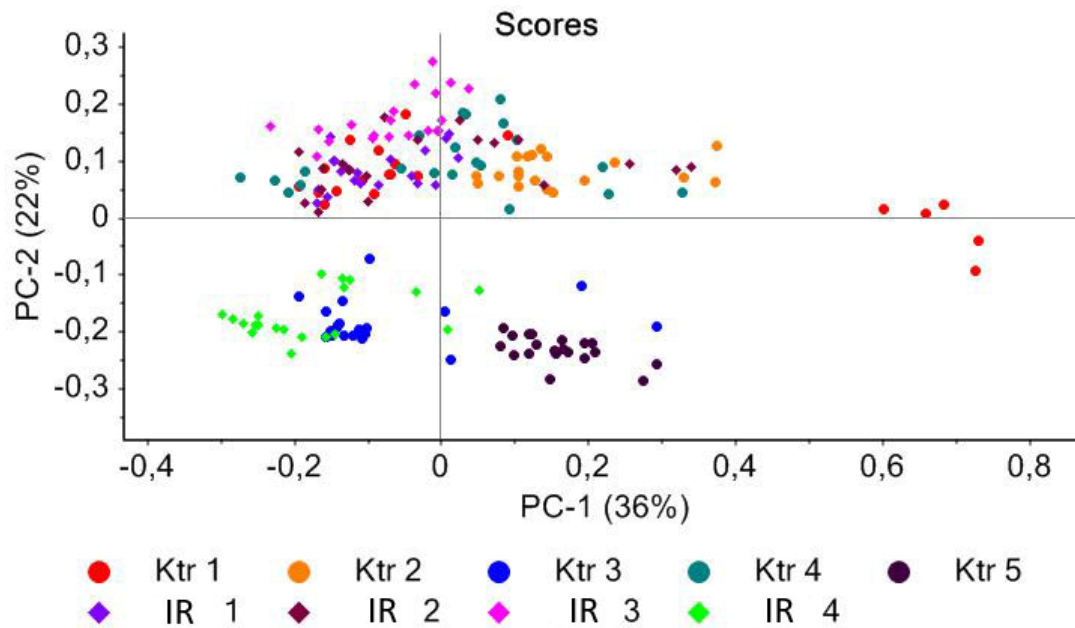


Abbildung 30: Scores-Plot der Hauptkomponenten-Analyse von IR- und Kontroll-SSM bei Oligomycin-Zugabe. Die jeweils 20 Messpunkte eines Messtages sind farblich markiert. „Ktr“ = Kontroll-SSM (IR0/30); „IR“ = Ischämie-Reperfusions-SSM (IR40/30). n (Ktr) = 5 mit 100 Messpunkten; n (IR) = 4 mit 80 Messpunkten.

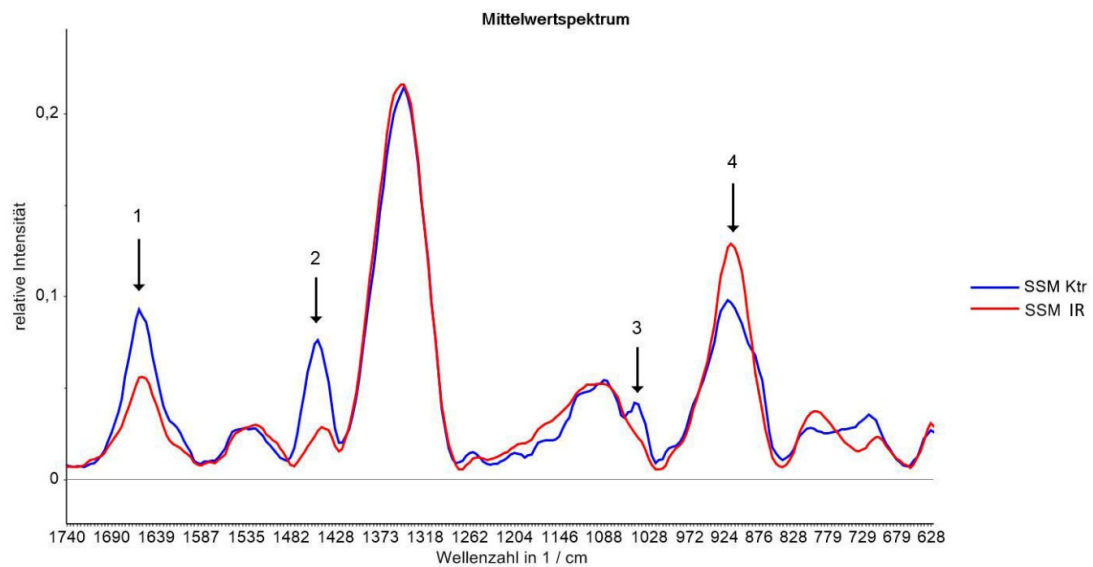


Abbildung 31: Mittelwertspektren von IR- und Kontroll-SSM bei Oligomycin-Zugabe. „SSM Ktr“ = Kontroll-SSM (IR0/30); „SSM IR“ = Ischämie-Reperfusions-SSM (IR40/30). n (SSM Ktr) = 5 mit 100 Messpunkten; n (SSM IR) = 4 mit 80 Messpunkten.

Ergebnisse

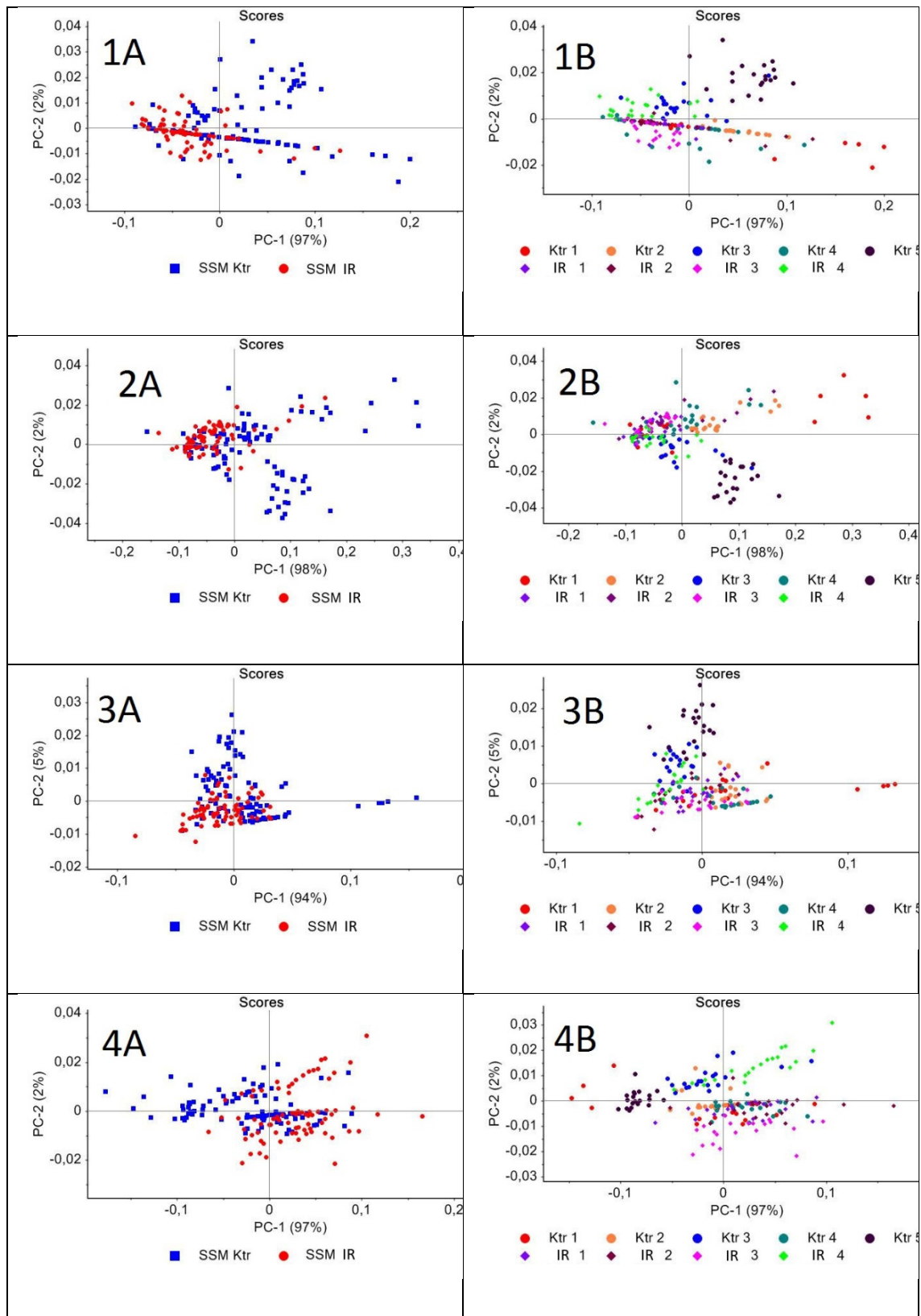


Abbildung 32: Scores-Plots der Hauptkomponenten-Analyse der in Abb. 31 markierten WZ-Bereiche. Zur Überprüfung ihrer Relevanz zur Auftrennung des Datensatzes sind die Scores-Plots der einzelnen WZ-Bereiche dargestellt. Im rechten Bildteil sind die einzelnen Messstage farblich abgegrenzt. n (SSM Ktr) = 5 mit 100 Messpunkten. n (SSM IR) = 4 mit 80 Messpunkten.

Tabelle 19: Auflistung der in Abb. 31 identifizierten WZ-Bereiche.

<u>Nummer</u>	<u>WZ-Bereich [cm⁻¹]</u>	<u>Relevante Auftrennung durch IR 40/30?</u>
1A und 1B	1659 - 1651	Nein
2A und 2B	1453 - 1443	Nein
3A und 3B	1042 - 1032	Nein
4A und 4B	920 - 910	Nein

IR40/30-Einfluss bei FCCP-Zugabe

Im Scores-Plot zeigten sich zwei weit gestreckte Gruppen, die über die PC-2 aufgetrennt wurden. IR hatte keinen Einfluss auf die Zuteilung der Datenpunkte zu diesen Gruppen. In beiden Feldern fanden sich sowohl IR-, als auch Kontroll-SSM. Es zeigten sich mehrere dichte Cluster von Datenpunkten (s. Abb. 33). Zur genaueren Analyse wurden die Messstage einzeln farblich markiert (s. Abb. 34). Die jeweils 20 Datenpunkte eines Messtages lagen gruppiert bei einander. IR- und Kontroll-Mitochondrien überlagerten einander im Scores-Plot, beispielweise „IR 4“ und „Ktr 2“.

In den Mittelwertspektren (s. Abb. 35) unterschieden sich die Gruppen „SSM Ktr“ und „SSM IR“ in drei WZ-Bereichen (s. Tab. 20). IR40/30 hatte keinen Einfluss auf die Auftrennung dieser WZ-Bereiche (s. Abb. 36, linke Seite). Bei Betrachtung der farblich abgegrenzten Messtage (s. Abb. 36, rechte Seite) zeigte sich die gruppierte Anordnung der jeweiligen Datenpunkte eines Messtages. Besonders die Messtage „Ktr 1“, „IR 2“ und „Ktr 4“ setzten sich vom Rest ab.

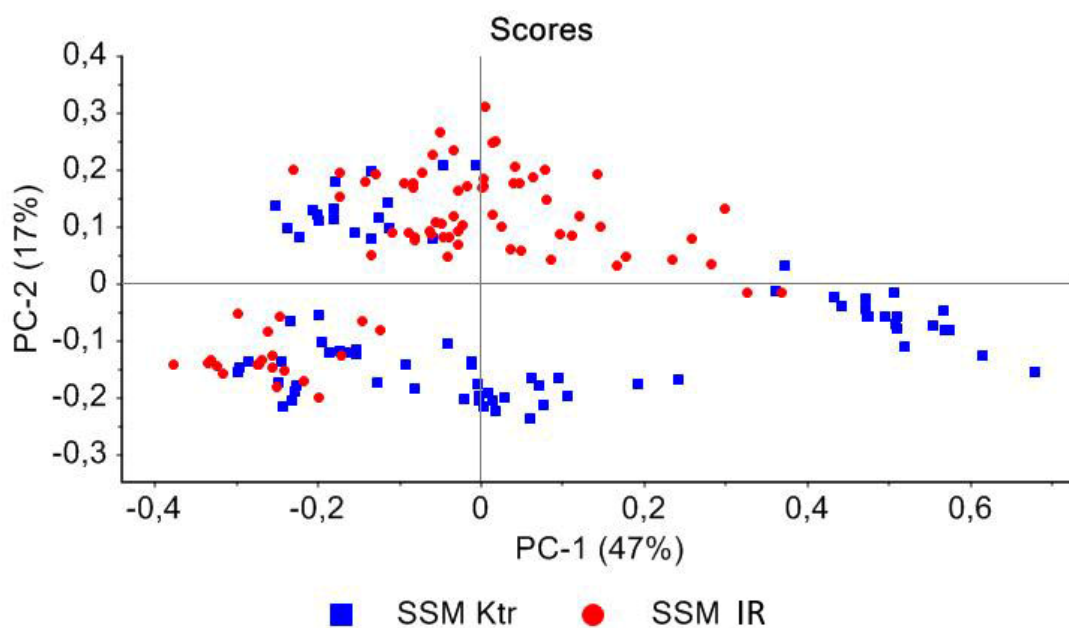


Abbildung 33: Scores-Plot der Hauptkomponenten-Analyse von IR- und Kontroll-SSM bei FCCP-Zugabe. „SSM Ktr“ = Kontroll-SSM (IR0/30); „SSM IR“ = Ischämie-Reperusions-SSM (IR40/30). n (SSM Ktr) = 4 mit 80 Messpunkten. n (SSM IR) = 4 mit 80 Messpunkten.

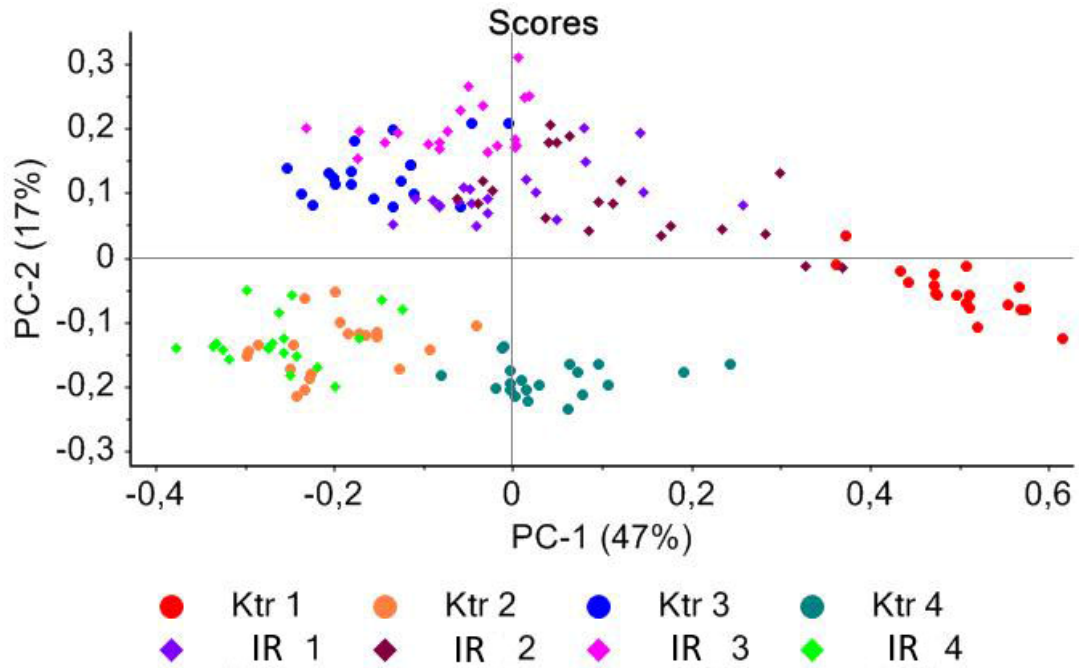


Abbildung 34: Scores-Plot der Hauptkomponenten-Analyse von IR- und Kontroll-SSM bei FCCP-Zugabe. Die jeweils 20 Messpunkte eines Messtages sind farblich markiert. „Ktr“ = Kontroll-SSM (IR0/30); „IR“ = Ischämie-Reperfusion-SSM (IR40/30). n (Ktr) = 4 mit 80 Messpunkten; n (IR) = 4 mit 80 Messpunkten.

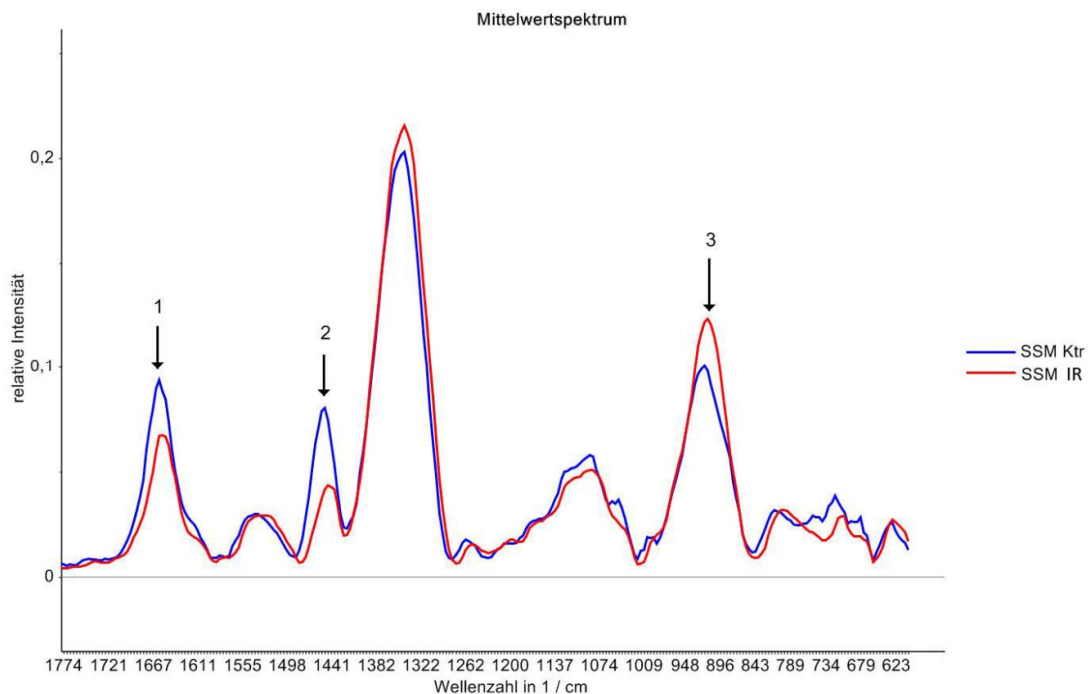


Abbildung 35: Mittelwertspektren von IR- und Kontroll-SSM bei FCCP-Zugabe. „SSM Ktr“ = Kontroll-SSM (IR0/30); „SSM IR“ = Ischämie-Reperfusion-SSM (IR40/30). n (SSM Ktr) = 4 mit 80 Messpunkten; n (SSM IR) = 4 mit 80 Messpunkten.

Ergebnisse

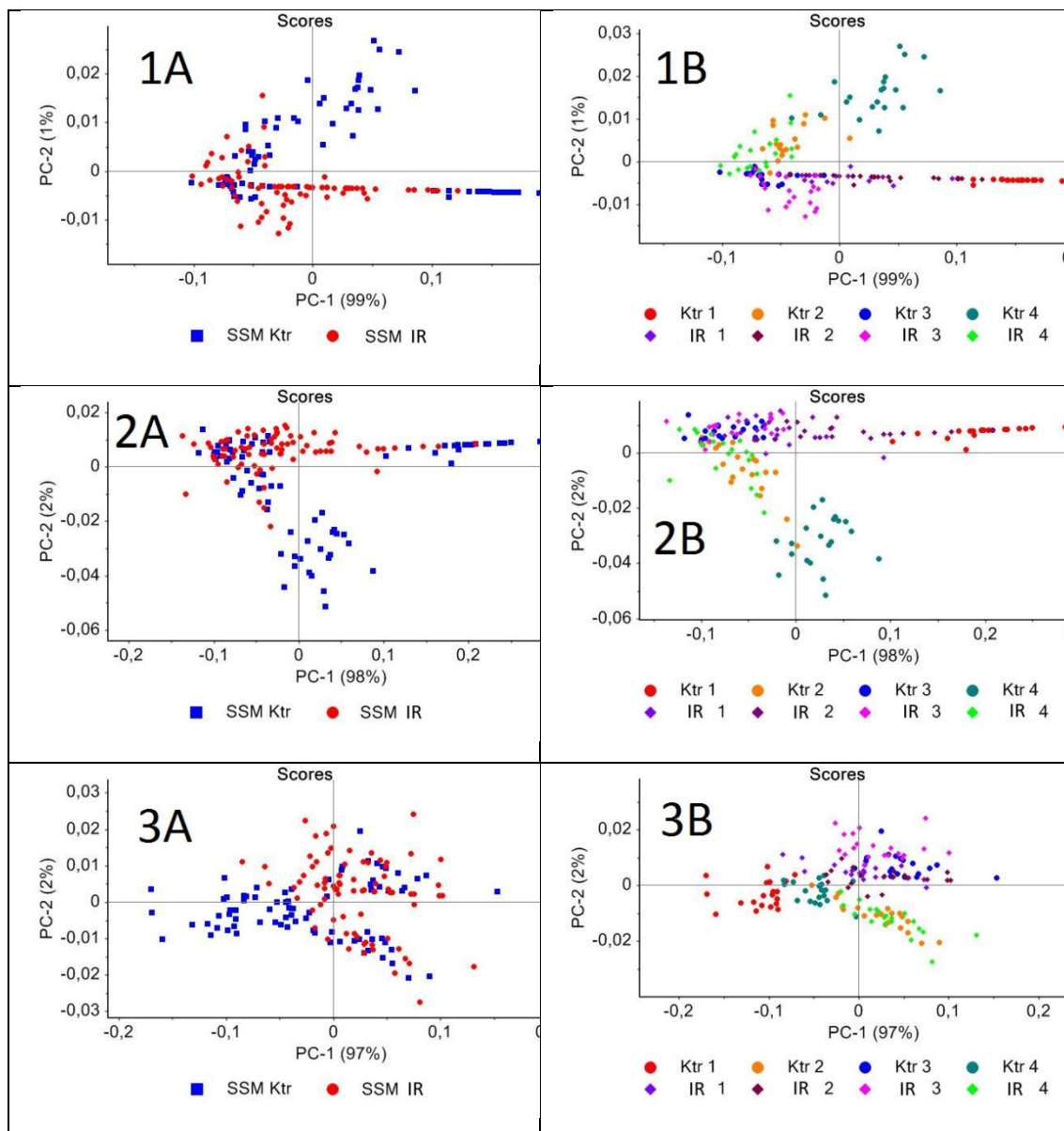


Abbildung 36: Scores-Plots der Hauptkomponenten-Analyse der in Abb. 35 markierten WZ-Bereiche. Zur Überprüfung ihrer Relevanz zur Auftrennung des Datensatzes sind die Scores-Plots der einzelnen WZ-Bereiche dargestellt. Im rechten Bildteil sind die einzelnen Messtage farblich abgegrenzt. n (SSM Ktr) = 4 mit 80 Messpunkten; n (SSM IR) = 4 mit 80 Messpunkten.

Tabelle 20: Auflistung der in Abb. 35 identifizierten WZ-Bereiche.

<u>Nummer</u>	<u>WZ-Bereich [cm⁻¹]</u>	<u>Relevante Auftrennung durch IR 40/30?</u>
1A und 1B	1659 - 1651	Nein
2A und 2B	1449 - 1441	Nein
3A und 3B	920 - 911	Nein

4. Diskussion

4.1 Analyse des IR mit etablierten Methoden

Die Daten der (Re-) Perfusion in der Langendorff-Apparatur demonstrieren die Auswirkungen von IR40/30 auf die linksventrikuläre Herzfunktion. Mit Beginn der Reperfusion etabliert sich der IR. Folge ist die Supprimierung des erhobenen Parameter. Geringe ATP-Spiegel im Rahmen einer weniger effektiven Atmungskettenfunktion können als Ursache der IR-vermittelten Schädigung gedeutet werden. Dazu passend beschreiben Yao und Chang ebenfalls einen Abfall dieser Parameter nach IR30/30 [108, 109].

Der Einfluss von IR40/30 auf die mitochondriale Atmungskettenfunktion zeigt sich in der polarographischen Untersuchung mittels Clark-Elektrode. Eine Supprimierung der Komplexe der Atmungskette besteht in Respirationsstadium 2 (Komplex II-V-Energetisierung), in Respirationsstadium 3 und bei Zusatz von FCCP. Keine signifikanten Auswirkungen von IR40/30 sind in der Grundbedarf-Messung, in Respirationsstadien 2 (Komplex I-V-Energetisierung) und Respirationsstadium 4, sowie bei Zugabe von Oligomycin festzustellen. Diese Ergebnisse decken sich mit den Beobachtungen von Tompkins et al. und Makazan et al. [110, 111].

Oligomycin bindet an die F_0 -Untereinheit der ATP-Synthase und inhibiert so die ATP-Synthese [112]. Ähnlich wie in Respirationsstadium 4, in dem kein ADP als Substrat für die ATP-Synthese vorhanden ist, resultiert dies einer Reduktion des e^- -Flusses über die Elektronentransportkette (Komplex I-IV). Weiter auftretender O_2 -Verbrauch wäre unter anderem auf die Aktivität freiliegender ATPasen durch die Ruptur mitochondrialer Membranen zurückzuführen [38]. Nach IR40/30 besteht kein Unterschied im O_2 -Verbrauch zwischen Ischämie- und Kontrollgruppe in RS 4 und bei Oligomycin-Gabe. Diese Beobachtung kann als Zeichen einer allgemeinen guten Membranintegrität und einer erfolgreichen Mitochondrien-Isolierung gewertet werden [111].

Sowohl bei Komplex I-V-, als auch bei Komplex II-V-Energetisierung supprimiert IR40/30 die Atmungskettenfunktion im Respirationsstadium drei. Die Ursache dieser Schädigung liegt entweder in der mitochondrialen Elektronentransportkette (Komplex I-IV) oder der

ATP-Synthase (Komplex V). Auch bei Zusatz des Entkopplers FCCP ist die Atmungskettenfunktion durch IR40/30 reduziert. Damit ist eine alleinige Schädigung von Komplex V durch IR unwahrscheinlich [22]. Unterstützt wird diese These durch den signifikanten Einfluss von IR40/30 im Respirationsstadium 2 bei Komplex II-V-Energetisierung. In diesem Stadium ist kein ADP als Substrat der F_1F_0 -ATPase vorhanden. Die Schädigung der Atmungskette im Rahmen des IR muss daher neben Komplex V mindestens einen der Komplexe II-IV umfassen [22].

Die Frage, welche Komplexe der Atmungskette durch den IR geschädigt werden, ist nicht abschließend geklärt [91, 113-115]. Das Ausmaß der Schädigung einzelner Komplexe der Atmungskette sicher zu erfassen, ist mit dem vorliegenden Versuchsaufbau nicht möglich. Zur Klärung dieser Frage ist eine selektive Energetisierung jedes einzelnen Komplexes mit Hilfe von Substraten und Inhibitoren nötig.

IR40/30 reduziert unabhängig von der Energetisierung den respiratorischen Kontrollindex (Maß der Kopplung) und steigert das Protonenleck. Eine wesentliche Ursache ist die Generierung von ROS. Vor allem an Komplex I und III kommt es im Zuge der Reperfusion zu einer exzessiven Entstehung freier Radikale [31, 50]. ROS schädigen die innere Mitochondrien-Membran durch die Oxidation von Lipiden und Proteinen [55]. Dabei spielt besonders die Oxidation von Cardiolipin eine tragende Rolle [27, 55, 116]. Folge sind, wie in der vorliegenden Arbeit, eine Einschränkung der Atmungskettenfunktion mit zunehmender Entkopplung sowie ein erhöhtes Protonenleck [56, 117].

In der vorliegenden Arbeit beeinflusst IR40/30 das Membranpotential ($\Delta\psi_m$) nicht signifikant. Zu erwarten wäre eine Hypopolarisation von $\Delta\psi_m$: im Zuge der physiologischen, oxidativen Phosphorylierung pumpen die Komplexe I, III und IV Protonen in den Intermembranraum und erzeugen so ein stabiles $\Delta\psi_m$ von ungefähr -100 bis -140 mV [118]. Die Schädigung dieser Komplexe durch IR40/30 sollte auf Grund eines supprimierten H^+ -Ausstroms in einer Hypopolarisation von $\Delta\psi_m$ resultieren. Sommer et al. erfassen $\Delta\psi_m$ mit Hilfe des Farbstoffes JC-1 in der FACS-Analyse und beschrieben eine signifikante Supprimierung durch des Membranpotentials durch IR40/30 [91]. Eine Wiederholung des Experiments mit der genannten Methode wäre damit aufschlussreich.

Gegen eine methodenbedingte Fehlmessung spricht der Abfall des $\Delta\psi_m$ sowohl in der IR- als auch der Kontrollgruppe bei ADP- und FCCP-Zugabe: Der Rückfluss von Protonen zur Generierung von ATP durch Komplex V resultiert in IR- und Kontrollgruppe in einer Reduktion des $\Delta\psi_m$. Ebenso führt die Entkopplung der AK mit FCCP zu einem Abfall von $\Delta\psi_m$ in beiden Gruppen. Die Supprimierung von $\Delta\psi_m$ entspricht der zu erwartenden Reaktion bei Zusatz der oben genannten Stoffe und spricht damit für die Qualität der durchgeführten Methode.

Eine mögliche Erklärung für den nicht signifikanten Einfluss von IR40/30 auf $\Delta\psi_m$ liefert Lesnefsky: Verglichen zur maximalen Rate der oxidativen Phosphorylierung sind die Enzym-Komplexe der Atmungskette in deutlichem Überschuss vorhanden [22]. Nach IR40/30 besteht so möglicherweise noch eine ausreichende Komplex-Aktivität, um ein stabiles $\Delta\psi_m$ zu erzeugen. Dazu passt, dass in der polarographischen Messung IR40/30-SSM weiterhin O_2 konsumieren, deren Aktivität nach IR40/30 also nicht komplett zum Erliegen kommt.

IR reduziert den basalen ATP-Gehalt Komplex II-V-energetisierter SSM, die ATP-Produktionsfähigkeit nach IR40/30 ist tendenziell reduziert. Bei Komplex I-V-Energetisierung besteht dagegen kein Einfluss von IR40/30 auf ATP-Gehalt- und Produktionsfähigkeit. Diese Beobachtung deckt sich mit der polarographischen Messung des O_2 -Verbrauchs, in der sich die Auswirkung von IR40/30 auf die Atmungskettenfunktion verstärkt bei Komplex II-V-Energetisierung zeigt. Des Weiteren dient Pyruvat nicht nur als Energieträger, sondern supprimiert auch den IR durch Inhibition der mPTP-Öffnung [63]. Erhöhte ATP-Produktionsfähigkeit und erhöhter ATP-Gehalt lassen sich somit durch die Pyruvat-vermittelte Kardioprotektion erklären.

Zwischen Atmungskettenfunktion, $\Delta\psi_m$ und ATP-Synthese besteht eine enge Beziehung [118]. Dabei dient das durch die Atmungskette aufgebaute $\Delta\psi_m$ als Triebkraft für die ATP-Synthese [34]. Dass IR40/30 im vorliegenden Experiment ATP-Gehalt und -Produktion nicht generell supprimiert, lässt sich möglicherweise damit erklären, dass IR40/30 auch das $\Delta\psi_m$ nicht signifikant reduziert. Dadurch bleibt die Triebkraft für die ATP-Synthese erhalten.

IR40/30 steigert die Leitfähigkeit der inneren Mitochondrien-Membran für K^+ . Das Öffnen mitochondrialer, ATP-abhängiger K^+ -Kanäle führt wie im vorliegenden Experiment zu einer Volumenzunahme, die essentiell ist für die Aufrechterhaltung der oxidativen Phosphorylierung [119]. Weitere Schutzfunktionen dieser Kanäle im IR sind eine reduzierte ROS-Freisetzung sowie eine Limitierung der Ca^{2+} -Akkumulation durch eine milde Entkopplung von $\Delta\psi_m$ [120, 121]. Einen wichtigen Trigger für das Öffnen mitochondrialer K^+ -Kanäle scheinen erhöhte Ca^{2+} -Konzentrationen darzustellen. Xu et al. beschrieben 2002 erstmals den protektiven Effekt Ca^{2+} -abhängiger K^+ -Kanäle [122].

Eine Zuordnung des Beitrags einzelner K^+ -Kanal-Unterarten zum gesamten K^+ -Flux ist in diesem Experiment nicht erfolgt. Weitere Versuche mit Agonisten und Inhibitoren können hier Klarheit erbringen.

Halestrap et al. postulieren, dass es im Rahmen der mPTP -Öffnung zur Freisetzung des akkumulierten Calciums kommt [123]. Insofern eignet sich die Bestimmung der mitochondrialen CRC als Maß für die Anfälligkeit der mPTP -Öffnung im IR. Vorliegende Daten zeigen deutlich erniedrigte CRC nach IR40/30. Mehrere Faktoren stimulieren die Öffnung der mPTP: unter anderem erhöhte Ca^{2+} - und P_i -Konzentrationen, reduzierte ATP-Konzentration, ein erhöhter pH-Wert sowie oxidativer Stress [22, 31, 59]. Auf Grund der geringeren Zahl applizierter Ca^{2+} -Pulse nach IR40/30 könnte eine besondere Rolle der Ca^{2+} -Überladung als Trigger der mPTP -Öffnung vermutet werden. Tatsächlich scheinen aber ROS durch Sensibilisierung der Pore für das mitochondriale Calcium die entscheidende Rolle im Öffnungsvorgang zu spielen [124]. Erhöhte ROS-Konzentrationen zeigen sich in der vorliegenden Arbeit in einem erhöhtem H^+ -Leck und einer Entkopplung der Atmungskette.

Die wichtige Rolle der mPTP im IR wird bei Zugabe des Poren-Inhibitors Cyclosporin A deutlich. Durch Bindung an Cyclophilin-D [63], eine Untereinheit der mPTP, erhöht Cyclosporin A (CsA) im vorliegenden Experiment die mitochondriale CRC signifikant. Die Beobachtung zeigt, dass CsA die Öffnung der mPTP herausgezögert oder unterbindet.

Passend zu den oben genannten Beobachtungen präsentieren sich die Ergebnisse des Schwellungsversuchs. Nach IR40/30 und Öffnen der mPTP durch Zusatz von 50 mM Ca^{2+}

besteht ein stärkeres Ausmaß und eine erhöhte Kinetik der mitochondrialen Schwellung. Bernardi et al. beschreiben, dass die mPTP isolierter Mitochondrien entweder maximal geöffnet oder geschlossen ist und keine Intermediärstadien existieren [123, 125]. In diesem Kontext kann die erhöhte Schwellung so gedeutet werden, dass die absolute Zahl geschädigter Mitochondrien nach IR40/30 deutlich größer ist als in der Kontrollgruppe.

Ein Kritikpunkt an den vorliegenden Daten ist, dass es nicht möglich war, alle Experimente mit exakt der gleichen Versuchszahl durchzuführen. Grund dafür ist die individuelle Schwankung der Menge isolierter Mitochondrien während der Aufbereitung [91]. Zwar bieten isolierte Mitochondrien eine optimale Möglichkeit, direkte Auswirkungen von Ischämie-Reperfusion, Ca^{2+} -Akkumulation und Medikamentenwirkung darzustellen. Gleichwohl unterlaufen sie im Rahmen der Isolierung Änderungen der Konformation [126] und repräsentieren nicht die Situation in vivo. Die Übertragbarkeit der Daten auf ein intaktes Organsystem wie das Herz muss daher immer wieder kritisch hinterfragt werden.

Trotzdem zeigen vorliegende Daten, dass mittels der IR40/30-Langendorff-Reperfusion ein IR im Rattenmodell erfolgreich induziert werden kann. Wesentliche Schritte der eingangs erwähnten Pathophysiologie ließen sich durch die mitochondriale Funktionsanalyse darstellen. Eine Ausnahme bildet das dabei Membranpotential, dessen Ergebnis anders zu erwarten war.

4.2 Diskussion Raman-Spektroskopie

4.2.1 Vorversuche zur Etablierung der Raman-Spektroskopie

Vorversuch Eins: Raman-Spektroskopie von Puffer M und SSM

Der erste Vorversuch überprüft die Unterscheidungsfähigkeit zwischen Puffer M und SSM. Es zeigt sich eine klare Auftrennung zwischen Messungspuffer und Mitochondrien im Scores-Plot. Damit ist dieser Versuch beweisend für das Vorliegen Mitochondrien-spezifischer WZ-Bereiche. Ähnlich dem Prinzip einer optischen Pinzette [127] wird im BioRam®-System ein Mitochondrium in den Laserfokus gezogen und während der gesamten Messzeit „festgehalten“. Die mögliche Motilität der Mitochondrien im Messungspuffer stellt somit kein Hindernis für die Messung dar.

Im Scores-Plot findet sich ein überlappender Bereich zwischen den Datenpunkten der SSM und den Datenpunkten des Messungspuffers auf der PC-2. In diesem Bereich wurden wahrscheinlich keine Mitochondrien in den Laserfokus gezogen, sondern allein der Puffer gemessen.

Auffällig ist das homogene Feld aus Datenpunkten der IR- und Kontroll-SSM im Scores-Plot. Eine mögliche Deutung besteht darin, dass die PCA die größten Unterschiede des gesamten Datensatzes in Form von Hauptkomponenten darstellt. Damit lässt sich die Überlappung der Datenpunkte der strukturgleichen Mitochondrien im Gegensatz zum Messungspuffer erklären.

Passend zum Scores-Plot unterscheidet sich das Mittelwertspektrum des Messungspuffers deutlich von den annähernd identisch verlaufenden Spektren der Mitochondrien. Da der Wellenzahlbereich von $1344 - 1335 \text{ cm}^{-1}$ auch dem Glasboden der Messkammer zugeordnet werden kann und sich dieser Bereich als nicht relevant für die Messung zeigte, wurde er in den folgenden Experimenten nicht weiter berücksichtigt.

Vorversuch Zwei: Identifizierung SSM-typischer WZ-Bereiche

Tabelle 21: Zuordnung der relevanten WZ-Bereiche im zweiten Vorversuch.

<u>WZ-Bereich in cm^{-1}</u>	<u>Proteine</u>	<u>(Phospho)- Lipide</u>	<u>Kohlen- hydrate</u>	<u>DNA</u>	<u>Quelle</u>
1663 - 1655	Amid I (α - Bindung)	C=C Bindung			[127], [128], [81]
1453 - 1445	CH ₂ Gruppe CH ₂ CH ₃ -De- formation	CH ₂ Gruppe CH ₂ CH ₃ -Defor- mation			[128] [88]
1087 - 1078	C-C Bindung C-N Bindung	C-C Bindung C-N Bindung		PO ₂ ⁻ DNA- Rückgrat sym- metrische Streckung	[128], [88] [85]
929 - 920	C-C Bindung	C-C-N ⁺ Bindung			[128], [129]
724 - 714		C-C-N ⁺ in Phos- phatidylcholin C-N ⁺ -(CH ₂) ₂ Bin- dung			[128], [81]
487 - 477			Polysac- charide Amylose	DNA	[128]

Im zweiten Vorversuch wurden für das mitochondriale Mittelwertspektrum charakteristische WZ-Bereiche identifiziert. Im Scores-Plot der PCA bilden die Datenpunkte aller Mitochondrien ein homogenes Feld. Da sich kein Cluster von Datenpunkten eines Messtages absetzt, kann davon ausgegangen werden, dass alle Messtage zum Mittelwertspektrum beitragen und dieses aussagekräftig ist.

Zum Mittelwertspektrum der SSM tragen Phospholipide, Proteine, DNA und Kohlenhydrate bei. Tabelle 21 zeigt die mitochondrialen Bestandteile, die den entsprechenden WZ-Bereichen zugeordnet werden.

Fünf WZ-Bereiche (1663 - 1655 cm^{-1} , 1453 - 1445 cm^{-1} , 1087 - 1078 cm^{-1} , 929 - 920 cm^{-1} , 724 - 714 cm^{-1}) werden Phospholipiden zugeordnet. Diese sind essentieller Bestandteil

von Membranen. In Abhängigkeit vom abgegrenzten Kompartiment variiert die Zusammensetzung der Membran aus Phospholipiden deutlich [130]. Die innere Mitochondrien-Membran ist reich an Phospholipiden und charakterisiert durch den hohen Anteil an Cardiolipin [131]. Cardiolipin, das ausschließlich in der inneren Mitochondrien-Membran in hoher Konzentration von ca. 18 % vorliegt [130], ist besonders reich an ungesättigten Fettsäuren [132]. Dass dem WZ-Bereich von $1663 - 1655 \text{ cm}^{-1}$ die C=C-Doppelbindung von Phospholipiden zugeordnet wird, spricht dafür, dass Cardiolipin tatsächlich zum mitochondrialen Mittelwertspektrum beitragen kann.

Vier WZ-Bereiche ($1663 - 1655 \text{ cm}^{-1}$, $1453 - 1445 \text{ cm}^{-1}$, $1087 - 1078 \text{ cm}^{-1}$, $929 - 920 \text{ cm}^{-1}$) werden Proteinen zugeordnet. 80 % des Gewichts der inneren Membran entfallen auf Proteine, allein 20 % aller Proteine eines Mitochondriums befinden sich in der inneren Mitochondrien-Membran [133]. Verantwortlich dafür sind die Proteine der Atmungskette und unzählige Transport-Systeme.

Die hohe Anzahl zugeordneter Protein- und Phospholipid-Bereiche gibt einen Hinweis, dass die innere Mitochondrien-Membran entscheidend zum mitochondrialen Mittelwertspektrum beitragen kann. Die Ergebnisse decken sich zum Teil mit den Beobachtungen von Tang et al. [127], die auch einen Laser mit 785 nm Wellenlänge verwendeten und ebenfalls relevante WZ-Bereiche bei 1655 cm^{-1} , 1446 cm^{-1} und 721 cm^{-1} identifizierten.

Der WZ-Bereich von $1087 - 1078 \text{ cm}^{-1}$ wird dem PO_2^- -Rückgrat von DNA zugeordnet, der Bereich von $487 - 477 \text{ cm}^{-1}$ Nukleinsäuren. Mitochondriale DNA liegt in der Matrix in zirkulärer Form vor [134]. Der Nachweis von Polysacchariden ($487 - 477 \text{ cm}^{-1}$) spricht ebenfalls für die Erfassung der Matrix.

Zusammenfassend ist es mit der verwendeten Methode nicht möglich, eine einzelne Struktur des Mitochondriums messen. In der vorliegenden Untersuchung tragen mehrere unterschiedliche Strukturen zum Mittelwertspektrum des gesamten Mitochondriums bei und bilden dabei einen charakteristischen Fingerabdruck.

Beispielsweise gelingt es nicht, selektiv die innere Mitochondrien-Membran zu erfassen. Eine Möglichkeit, solch präzise Untersuchungen durchzuführen, bietet die Freilegung

der Mitoplasten mit Hilfe von Digitonin [22]. Im Anschluss besteht die Möglichkeit, selektiv die intakte, innere Mitochondrien-Membran zu analysieren.

Verschiedene Autoren haben mit Hilfe der Raman-Spektroskopie von Mitochondrien WZ-Bereiche identifiziert, die sich Cytochromen zuordnen lassen [135-137]. Zur Untersuchung von Hämverbindungen, besonders in Cytochromen, ist die Raman-Spektroskopie seit vielen Jahren etabliert. Typische WZ-Bereiche von Cytochrom b und -c finden sich in Wellenzahlen um 750 cm^{-1} , 1130 cm^{-1} und 1587 cm^{-1} [138-140].

In dem vorliegenden Mittelwertspektrum sind diese Cytochrom-typischen WZ-Bereiche nicht zu beobachten. Der Grund dafür liegt in der Wellenlänge des eingesetzten Lasers. Arbeitsgruppen, die die Raman-Spektroskopie zur Erforschung von Cytochromen nutzen, verwenden zur Anregung einen Laser mit einer Wellenlänge von 400 - 600 nm [140-142]. Dieser erzeugt ein bis zu fünfmal stärkeres Signal als der 785 nm-Laser und bietet so eine bessere Auflösung. Darüber hinaus liegt die maximale Absorption von Cytochromen im Bereich des Soret-Bandes von 400 - 600 nm Wellenlänge [137]. Dadurch wird bei Verwendung eines 785 nm-Lasers durch die Cytochrome nur ein schwaches Raman-Signal induziert, das im gesamten Mittelwertspektrum untergeht.

Vorversuch Drei: Raman-Spektroskopie von gefrorenen und nicht-gefrorenen SSM

Tabelle 22: Zuordnung der relevanten WZ-Bereiche im dritten Vorversuch.

<u>WZ-Bereich in cm⁻¹</u>	<u>Proteine</u>	<u>(Phospho)- Lipide</u>	<u>DNA</u>	<u>Quelle</u>
1591 - 1583	Schwingungsmodus Porphyrin-Ring in Cy- tochrom b und -c			[138], [142]
1333 - 1324		Phospholipid-Re- gion	Nukleinsäu- ren	[128]
977 - 968	C-C Bindung			[128]
799 - 789			Nukleinsäu- ren PO ₂ ⁻ -DNA Rückgrat	[85], [143]

Das rasche Einfrieren von Mitochondrien ohne Zusatz eines geeigneten Membranschutzes führt zur Zerstörung der mitochondrialen Membranen. Nach elektronenmikroskopischer Untersuchung beschrieben Sjöstrand et al. die innere Membran rasch eingefrorener Mitochondrien als bruchstückhaft und unregelmäßig [144]. Sie erklärten die Beobachtung mit der Bildung von Eiskristallen, die die Denaturierung von Membranproteinen und anschließend die Ruptur der Membran bedingen.

IR führt über eine exzessive Ca²⁺-Überladung zur Öffnung der mPTP. Die nachfolgende Volumenzunahme des Mitochondriums kann die Ruptur der Membranen bedingen [71]. Eine Aussage über die Integrität der Mitochondrien ist daher für das Modell des IR von hohem Interesse.

Im vorliegenden Versuch können die beiden Gruppen „Frozen“ und „Not Frozen“ im Scores-Plot (s. Abb. 19) klar unterschieden werden. Der überlappende Bereich in der Bildmitte wird so gedeutet, dass sich hier frisch aufbereitete Mitochondrien, die im Zuge der Aufbereitung zerstört wurden, positionieren. Zusammen mit aufgetauten Mitochondrien, die den Prozess des Einfrierens intakt überstanden haben, bilden sie das überlappende Feld.

Im Scores-Plot der einzeln abgegrenzten Messtage (s. Abb. 20) bilden die Datenpunkte aller Messtage ein homogenes Feld. Eine Auftrennung allein auf Grund eines bestimmten Messtages kann damit ausgeschlossen werden.

In den Mittelwertspektren fallen der parallele Verlauf und die Höhenverschiebung in mehreren WZ-Abschnitten auf. Allerdings ist die relative Intensität der Gruppe „Frozen“ nicht durchgehend größer, beispielsweise in den mit „3“, „4“ und „5“ bezeichneten WZ-Bereichen. Eine rein technische Ursache, zum Beispiel ausgelöst durch die Neukalibrierung des Gerätes während der Messung, kann somit ausgeschlossen werden. Wahrscheinlicher ist ein struktureller Unterschied zwischen den beiden Gruppen.

Die WZ-Bereiche von $1670 - 1662 \text{ cm}^{-1}$ und $1453 - 1452 \text{ cm}^{-1}$ erwiesen sich in den Scores-Plot als nicht relevant. Bei Betrachtung des Balkendiagramms (s. Abb. 23) fällt die hohe Standardabweichung der beiden Abschnitte auf, was deren geringe Relevanz erklärt. Da dieser Versuch unter exakt gleichen Bedingungen wiederholt wurde, wird die hohe Standardabweichung mit der typischerweise hohen Varianz biologischer Proben erklärt.

Zwei relevante WZ-Bereiche ($1333 - 1324 \text{ cm}^{-1}$ und $799 - 789 \text{ cm}^{-1}$) können DNA-Strukturen zugeordnet werden (s. Tab. 22). Dabei erscheint vor allem der WZ-Bereich von $799 - 789 \text{ cm}^{-1}$, der dem PO_2^- -Rückgrat von DNA zugeordnet wird, von Interesse. Nach Induktion von Apoptose an HeLa-Zellen beobachteten Uzunbajakava et al. wie in der vorliegenden Arbeit einen relevanten Anstieg des Raman-Signals im WZ-Bereich um 788 cm^{-1} [145].

Die Induktion von Apoptose resultiert in einer verstärkten Kondensation des Chromatins [146, 147]. Der Anstieg der Raman-Intensität im WZ-Bereich von $799 - 789 \text{ cm}^{-1}$ kann so als möglicher Hinweis auf eine zunehmende Kondensierung des Chromatins im Rahmen einer Zellschädigung gewertet werden.

Auffällig ist das Auftreten des relevanten WZ-Bereiches von $1591 - 1583 \text{ cm}^{-1}$, der Cytochrom b und -c zugeordnet wird [138-140]. Im vorhergehenden Versuch konnten bei frisch aufbereiteten Mitochondrien im Mittelwertspektrum keine Cytochrom-typischen WZ-Bereiche nachgewiesen werden, da diese wahrscheinlich von anderen Signalen überlagert werden (s.o.).

Eine mögliche Erklärung für das Auftreten Cytochrom-typischer WZ-Bereiche liefern mitochondriale Vorgänge im Rahmen der Apoptose. Die Freisetzung von Cytochrom C aus Mitochondrien in das Cytosol ist ein entscheidender Schritt in der Aktivierung proteolytischer Caspasen [69, 148]. Dass nach dem Einfrieren von Mitochondrien Cytochrom-typische WZ-Bereiche identifiziert werden, kann für eine zunehmende Freisetzung von Cytochrom C durch Apoptose-ähnliche Vorgänge sprechen. Eine andere mögliche Deutung besteht darin, dass durch die Ruptur der Mitochondrien-Membran die Cytochrome frei vorliegen. So könnten diese ohne Überlagerung direkt vom Laserfokus erfasst werden und ein stärkeres Raman-Signal induzieren. Der Abgleich mit weiteren Methoden wie der Elektronenmikroskopie oder dem Citratsynthase-Assay kann hier weitere Erkenntnisse liefern.

Die Veränderung des Wellenzahl-Bereiches von $1333 - 1324 \text{ cm}^{-1}$ kann als Zeichen für die Freisetzung von Phospholipiden aus der Membran gedeutet werden.

Zusammenfassend lassen sich insgesamt vier charakteristische WZ-Bereiche identifizieren, mit deren Hilfe möglicherweise eine Aussage über die Integrität der Mitochondrien getroffen werden kann.

4.2.2 Einfluss von IR in den Respirationsstadien

IR Grundlinien-Messung

Sowohl in der PCA, als auch in den Mittelwertspektren lassen sich keine relevanten Unterschiede zwischen IR- (IR40/30) und Kontrollgruppe (IR0/30) feststellen

Passend zu diesem Ergebnis liegt in der polarographischen O_2 -Bestimmung im Grundbedarf-Stadium (s. Kap. 3.2) kein signifikanter Einfluss von IR auf die Atmungsketten-Funktion vor. In der Grundbedarf -Messung sind weder Substrate zur Energetisierung der Atmungskette noch zur ATP-Synthese vorhanden. Mitochondrien betreiben daher nur einen minimalen Stoffwechsel. Eine relevante Auswirkung von IR ist für stoffwechselaktivere Respirationsstadien zu erwarten.

Durch Ca^{2+} -Akkumulation und nachfolgende Öffnung der mPTP kann IR zur Ruptur der mitochondrialen Membranen führen [71]. In der vorliegenden Arbeit schwellen Mitochondrien nach IR (IR40/30) durch Ca^{2+} -Zugabe signifikant schneller und stärker als die Kontrollgruppe (s. Kap. 3.6). Relevante WZ-Bereiche, die im dritten Vorversuch als mögliche Indikatoren einer mitochondrialen Schädigung auftreten (s. Kap. 4.2.1), finden sich hier nicht. Ähnlich wie in den Ergebnissen der polarographischen Messung im Respirationsstadium 4 und bei Oligomycin-Zugabe ist ein möglicher Hinweis, dass die SSM nach IR40/30 strukturell intakt sind.

IR im Respirationsstadium 2

Die Ergebnisse aus Respirationsstadium 2 gleichen den Ergebnissen der Grundbedarf-Messung. Ein relevanter Einfluss von IR40/30 gegenüber der Kontrollgruppe ist weder in der PCA noch in den Mittelwertspektren zu beobachten. Auch in der polarographischen O_2 -Bestimmung mittels Clark-Elektrode (s. Kap. 3.2) zeigt sich bei K I-V-Energetisierung keine signifikante Auswirkung von IR.

IR im Respirationsstadium 3

Respirationsstadium 3 erwies sich als nicht auswertbar. In parallel laufenden Messungen mittels Clark-Elektrode verstoffwechselten Mitochondrien die äquimolare Menge ADP in weniger als 30 Sekunden. Da die Aufnahme eines einzelnen Messpunktes im BioRam-System 40 Sekunden benötigt, ist es nicht möglich, eine ausreichende Menge von mindestens 15 Messpunkten pro Messtag zu erstellen. Zusätzlich ist es im BioRam-System nicht möglich, den O_2 -Verbrauch zu messen. Deshalb besteht keine Sicherheit darüber, ob sich die SSM noch in Respirationsstadium 3 befinden oder bereits in Respirationsstadium 4 übergegangen sind.

In den polarographischen Messungen mittels Clark-Elektrode reduziert IR40/30 den O_2 -Verbrauch gegenüber der Kontrollgruppe im Respirationsstadium 3 signifikant (s. Kap. 3.2). Die mangelnde Erhebbarkeit von Daten mit der verwendeten Methode ist daher bedauerlich. Ogawa et al. nutzen Hochgeschwindigkeits-Raman-Spektroskopie, um Herzgewebe zu untersuchen [138]. Die Anwendung dieser Technik oder eine andere

Möglichkeit zur Verkürzung der Messzeit könnten daher einen wichtigen Einblick in den Ischämie-Reperfusionsschaden im Respiationsstadium 3 ermöglichen.

IR im Respiationsstadium 4

Tabelle 23: Zuordnung der tendenziell relevanten WZ-Bereiche im Respiationsstadium 4.

<u>WZ-Bereich</u> <u>in cm⁻¹</u>	<u>Proteine</u>	<u>(Phospho)-Lipide</u>	<u>Quelle</u>
1659 - 1651	Amid I (α -Bindung)	C=C Bindung	[127], [128], [81]
1453 - 1445	CH ₂ Gruppe CH ₂ CH ₃ -Deformation	CH ₂ Gruppe CH ₂ CH ₃ -Deformation	[88], [128]
929 - 920	C-C Bindung	C-C-N ⁺ Bindung	[128], [129]
724 - 714		C-C-N ⁺ in Phosphatidylcholin C-N ⁺ -(CH ₂) ₂ Bindung	[128], [81]

Im Scores-Plot der PCA fällt die Abgrenzung eines Clusters von Datenpunkten auf (s. Abb. 26). Dieser Cluster kann einem einzelnen Messtag zugeordnet werden. Die dichte und abgegrenzte Gruppierung eines einzelnen Messtags zeigt sich noch stärker in den beiden folgenden Kapiteln und wird daher dort diskutiert.

Der Einfluss von IR auf die mitochondrialen Mittelwertspektren zeigt sich in WZ-Bereichen, die Phospholipiden und Proteinen zugeschrieben werden. Vier WZ-Bereiche (1659 - 1651 cm⁻¹, 1453 - 1445 cm⁻¹, 929 - 920 cm⁻¹, 724 - 714 cm⁻¹) werden Phospholipiden zugeordnet, drei WZ-Bereiche Proteinen (1659 - 1651 cm⁻¹, 1453 - 1445 cm⁻¹ und 929 - 920 cm⁻¹). Schon der zweite Vorversuch hat darauf hingedeutet, dass die innere Mitochondrien-Membran und speziell ihre Phospholipide, vor allem Cardiolipin, entscheidend zum Mittelwertspektrum beitragen können.

IR induziert die Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), vor allem an Komplex I und III der Atmungskette [31]. In der vorliegenden Arbeit erhöht IR signifikant das Protonenleck (s. Kap. 3.2), was als Auswirkung von entstandenen ROS interpretiert wird. ROS bewirken die Oxidation und damit die Schädigung von Phospholipiden [55].

Auf Grund seiner vielen C=C-Doppelbindungen ist Cardiolipin für diese Oxidation besonders anfällig [27]. Paradies et al. beschreiben nach IR einen Abfall der Cardiolipin-Konzentration um bis zu 50 % [132]. Diese Beobachtung kann den tendenziellen Einfluss von IR auf die WZ-Bereiche von $1659 - 1651 \text{ cm}^{-1}$, $1453 - 1445 \text{ cm}^{-1}$ und $724 - 714 \text{ cm}^{-1}$ erklären.

Die Anwesenheit von intaktem Cardiolipin ist für die Funktion der Atmungskette essentiell [55]. Die gestörte Funktion von Komplex I, III und IV der Atmungskette nach IR werden unter anderem der Oxidation und dem Verlust von Cardiolipin zugeschrieben [27]. Die Dysfunktion der Proteine der Atmungsketten zeigt sich in dem signifikant reduzierten Sauerstoffverbrauch in Respirationsstadium 3, Respirationsstadium 3' und bei FCCP-Zugabe bei polarographischer Messung. (s. Kap. 3.2). Die relevante Auftrennung in den Protein-zugeordneten Bereichen ($1659 - 1651 \text{ cm}^{-1}$ und $1453 - 1445 \text{ cm}^{-1}$) kann damit durch IR-Einfluss erklärt werden.

Dass sich der relevante Einfluss von IR mit Entstehung von ROS und Lipidoxidation in Respirationsstadium 4 zeigt, mag auf den ersten Blick überraschen. Paradies et al. beschreiben in ihren Experimenten das selbe Phänomen nach IR40/15 [132]. Nach dem stoffwechselreichen Respirationsstadium 3 erhöht sich die Konzentration des verfügbaren Sauerstoffs bei gleichzeitig geringer Konzentration von ADP im Respirationsstadium 4. Da begleitend noch eine hohe Anzahl reduzierter e^- -Donatoren vorhanden ist, ist die Entstehung von ROS an Komplex I und III der Atmungskette begünstigt [49, 132].

IR bei Oligomycin- und FCCP-Zugabe

Die Ergebnisse der Raman-spektroskopischen Untersuchung von SSM bei Oligomycin- und FCCP-Zugabe gleichen sich und werden daher im Folgenden gemeinsam diskutiert. Im Scores-Plot der PCA sowie in der Analyse von Mittelwertspektren und einzelner WZ-Bereiche sorgt nicht IR40/30 für eine Auftrennung des Datensatzes. Stattdessen zeigt die Clusterbildung der Datenpunkte den hohen Einfluss einzelner Messtage. Für die Abgrenzbarkeit einzelner Messtage kommen verschiedene Gründe in Betracht:

Auf Grund der Anzahl von jeweils acht Versuchstagen unterscheiden sich das Alter und das Gewicht der Versuchstiere. Daraus folgen eine unterschiedliche Größe und ein unterschiedliches Gewicht der präparierten Herzen. Obwohl die Herzen nach Entnahme makroskopisch untersucht werden, kann nicht ausgeschlossen werden, dass einzelne Versuchstiere an Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems litten.

Des Weiteren mussten im Verlauf der Experimente verwendete Puffer, Substrate und Chemikalien neu angesetzt werden, da eine Verwendung über den gesamten Experiment-Zeitraum nicht möglich ist. Darüber hinaus schwankt die Herzfunktion in der Langendorff-Perfusion individuell, erkennbar an der Neigung zu Kammerflimmern und der Notwendigkeit einer Schrittmacher-Stimulation.

Außerdem ergibt sich auf Grund der Versuchsdesigns ein zeitlicher Unterschied zwischen den beiden Gruppen „IR“ und „Kontrolle“: an IR-Herzen wird eine 40-minütige Ischämie induziert und anschließend die 30-minütige Reperfusion durchgeführt. Dagegen werden „Kontroll“-Herzen direkt reperfundiert, was zu einem unterschiedlichen Alter der Herzen zum Zeitpunkt der Raman-Spektroskopie führt. Auf Grund des hohen zeitlichen und personellen Aufwands war es außerdem nicht möglich, jeweils parallel die SSM eines Kontroll- und eines Ischämie-Tieres an einem Messtag aufzubereiten und Raman-spektroskopisch zu untersuchen.

Da die Präparation der Mitochondrien unterschiedlich viel Zeit in Anspruch nahm und in einem anderen Institut erfolgte, schwankte der zeitliche Abstand bis zur Messung mittels Raman-Spektroskop. Außerdem benötigte die Kalibrierung des Raman-Spektroskops auf Grund technischer Probleme häufig unterschiedlich viel Zeit, so dass sich die

zeitlichen Unterschiede vergrößerten. Des Weiteren musste die Höhe des Laserfokus während des Messvorgangs nachjustiert werden und unterschied sich dadurch.

Diese hohe Anzahl an Einflussfaktoren liefert eine mögliche Erklärung für den überwiegenden Einfluss einzelner Messtage in der PCA. In der polarographischen Messung reduziert IR bei FCCP-Zugabe die Funktion der Atmungskette signifikant (s. Kap. 3.2). Daher sollten zukünftige Experimente darauf abzielen, den Einfluss der genannten Faktoren zu verringern, um die Auswirkung von IR auf SSM auch Raman-spektroskopisch darzustellen.

4.2.3 Bewertung und Ausblick

Mit Hilfe der erfolgreichen Vorversuche zur Etablierung der Methode konnte gezeigt werden, dass die Raman-spektroskopische Untersuchung von Mitochondrien mittels des BioRam®-Systems möglich ist. Es bestehen Hinweise, dass die Raman-Spektroskopie eine Aussage über Struktur und Integrität der SSM erlaubt. Daraus ergibt sich in zukünftigen Experimenten beispielsweise die mögliche Verwendung zur Messung von Ca^{2+} -induzierter Schwellung oder Nekrose in Echtzeit.

Schwierig gestaltet sich die Darstellung des Ischämie-Reperfusionsschadens in den verschiedenen Respirationsstadien. Für zukünftige Messungen sollte der Einfluss äußerer Faktoren, die in Kap. 4.2.2 aufgezeigt sind, reduziert werden. Mit Hilfe einer verkürzten Aufnahmezeit könnten wichtige Einblicke im Respirationsstadium 3 gewonnen werden, in dem in vergleichenden Experimenten IR40/30 einen signifikanten Einfluss hat.

Optimistisch stimmt der tendenzielle Einfluss von IR im Respirationsstadium 4. Weitere Experimente zur Anwendung der Raman-Spektroskopie im Modell des Ischämie-Reperfusionsschadens können mehr Klarheit über die Aussagekraft zu Schädigung der Atmungskettenfunktion oder der inneren Membran erbringen.

5. Zusammenfassung

Der myokardiale Ischämie-Reperfusionsschaden hat eine hohe Relevanz in der Kardiologie und Herzchirurgie. Trotz intensiver Forschung ist es bislang nicht gelungen, eine effektive Therapie der letalen Reperfusion in den klinischen Alltag zu implementieren. Mitochondrien spielen im IR eine wichtige Rolle. Die Raman-Spektroskopie mit Laserquellen von 785 nm Wellenlänge erlaubt die nicht-invasive Analyse pathophysiologischer Prozesse in vitro in Echtzeit. Daher eignet sich die Raman-spektroskopische Analyse von Mitochondrien möglicherweise dazu, notwendige neue Einblicke in die Pathophysiologie des IR zu gewinnen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Analyse des IR an subsarkolemmalen Mitochondrien aus Rattenherzen mit etablierten Methoden. Anschließend sollte die Anwendbarkeit der Raman-Spektroskopie zur mitochondrialen Funktionsanalyse allgemein und speziell im IR evaluiert werden. Mittels 40-minütiger Ischämie und anschließender 30-minütiger Reperfusion wurde in einer Langendorff-Anlage ein globaler Ischämie-Reperfusionsschaden induziert. Während der Reperfusion supprimierte IR im Vergleich zur Kontrollgruppe LVP_{max} , $LVP dp/dt_{max}$, Herzfrequenz und mittleren Koronarfluss zu verschiedenen Zeitpunkten.

IR kompromitierte die Atmungskettenfunktion im Respirationsstadium 3 und bei FCCP-Zugabe unabhängig von K I-V- oder K II-V-Energetisierung. Dies spricht für eine IR-vermittelte Schädigung von einem der Atmungsketten-Komplexe II-IV, eventuell zusätzlich auch von Komplex V. In Folge einer gesteigerten ROS-Produktion bestanden ein erhöhtes Protonenleck und eine Entkopplung der Atmungskette. Das Membranpotential wurde von IR nicht signifikant beeinflusst. Die kompromitierte Atmungskettenfunktion resultierte in einem reduzierten ATP-Gehalt bei K II-V-Energetisierung.

IR induzierte eine vermehrte Leitfähigkeit kardioprotektiver K^+ -Kanäle. Die Bestimmung der mitochondrialen CRC erbrachte eine gesteigerte Öffnungswahrscheinlichkeit der mPTP im IR. Der Zusatz von Cyclosporin A als Inhibitor der mPTP reduzierte diese Wahrscheinlichkeit. IR steigerte die Kinetik und das Ausmaß der mPTP-vermittelten Ca^{2+} -Aufnahme.

Zusammenfassung

Die Vorversuche zur Etablierung der mitochondrialen Raman-Spektroskopie verliefen erfolgreich. SSM ließen sich in Scores-Plot und Mittelwertspektren deutlich von Messungspuffer unterscheiden. Dank einer „optischen Falle“ stellt die mögliche Motilität der Mitochondrien im Messungspuffer kein Hindernis dar. Zum Mittelwertspektrum tragen u.a. (Phospho-) Lipide, Proteine und DNA bei und ergeben den charakteristischen „Fingerabdruck“ eines Mitochondriums. Cytochrom-C-typische Wellenzahl-Bereiche, die von anderen Arbeitsgruppen bei Benutzung von Laserquellen mit 400-600 nm Wellenlänge beschrieben wurden, waren bei Einsatz des 785nm-Lasers nicht zu identifizieren. Der Raman-spektroskopische Vergleich von gefrorenen mit intakten Mitochondrien erbrachte vier Wellenzahl-Bereiche mit deren Hilfe sich möglicherweise eine Aussage über die Integrität von Mitochondrien treffen lässt.

Die Darstellung des IR in der mitochondrialen Analyse am Raman-Spektroskop gestaltete sich schwierig. Die in der bewährten polarographischen Messung erzielten Ergebnisse ließen sich Raman-spektroskopisch nicht reproduzieren. Respirationsstadium 3 erwies sich auf Grund technischer Probleme als nicht auswertbar. Im Respirationsstadium 4 bestand ein tendenzieller Einfluss von IR40/30 auf Wellenzahlbereiche, die Proteinen und vor allem Phospholipiden (möglicherweise Cardiolipin) zugeordnet werden. Da die Peroxidation von Cardiolipin große Auswirkung auf die Physiologie von Mitochondrien hat, können hier weitere Studien möglicherweise Klarheit und neue Einblicke in die Pathophysiologie des IR erbringen.

6. Literaturverzeichnis

1. Ibanez, B., et al., *2017 ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation: The Task Force for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation of the European Society of Cardiology (ESC)*. Eur Heart J, 2018. **39**(2): p. 119-177.
2. Thygesen, K., et al., *Third universal definition of myocardial infarction*. Eur Heart J, 2012. **33**(20): p. 2551-67.
3. Gimbrone, M.A., Jr. and G. Garcia-Cardena, *Vascular endothelium, hemodynamics, and the pathobiology of atherosclerosis*. Cardiovasc Pathol, 2013. **22**(1): p. 9-15.
4. Libby, P., *Mechanisms of acute coronary syndromes and their implications for therapy*. N Engl J Med, 2013. **368**(21): p. 2004-13.
5. Hausenloy, D.J. and D.M. Yellon, *Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target*. J Clin Invest, 2013. **123**(1): p. 92-100.
6. White, H.D. and D.P. Chew, *Acute myocardial infarction*. The Lancet, 2008. **372**(9638): p. 570-584.
7. Reed, G.W., J.E. Rossi, and C.P. Cannon, *Acute myocardial infarction*. The Lancet, 2017. **389**(10065): p. 197-210.
8. Buja, L.M., *The pathobiology of acute coronary syndromes: clinical implications and central role of the mitochondria*. Tex Heart Inst J, 2013. **40**(3): p. 221-8.
9. Jennings, R.B., et al., *Myocardial necrosis induced by temporary occlusion of a coronary artery in the dog*. Arch Pathol, 1960. **70**: p. 68-78.
10. Heusch, G. and B.J. Gersh, *The pathophysiology of acute myocardial infarction and strategies of protection beyond reperfusion: a continual challenge*. Eur Heart J, 2017. **38**(11): p. 774-784.
11. Ibanez, B., et al., *Evolving therapies for myocardial ischemia/reperfusion injury*. J Am Coll Cardiol, 2015. **65**(14): p. 1454-71.
12. Lejay, A., et al., *Ischemia reperfusion injury, ischemic conditioning and diabetes mellitus*. Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 2016. **91**: p. 11-22.
13. Yellon, D.M. and D.J. Hausenloy, *Myocardial reperfusion injury*. N Engl J Med, 2007. **357**(11): p. 1121-35.
14. Bernink, F.J.P., et al., *Progression in attenuating myocardial reperfusion injury: An overview*. International Journal of Cardiology, 2014. **170**(3): p. 261-269.

15. Chambers, D.J. and H.B. Fallouh, *Cardioplegia and cardiac surgery: Pharmacological arrest and cardioprotection during global ischemia and reperfusion*. Pharmacology & Therapeutics, 2010. **127**(1): p. 41-52.
16. Wong, D.T.L., et al., *Myocardial 'no-reflow' — Diagnosis, pathophysiology and treatment*. International Journal of Cardiology, 2013. **167**(5): p. 1798-1806.
17. Moens, A.L., et al., *Myocardial ischemia/reperfusion-injury, a clinical view on a complex pathophysiological process*. Int J Cardiol, 2005. **100**(2): p. 179-90.
18. Manning, A.S. and D.J. Hearse, *Reperfusion-induced arrhythmias: Mechanisms and prevention*. Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 1984. **16**(6): p. 497-518.
19. Dedkova, E.N. and L.A. Blatter, *Calcium signaling in cardiac mitochondria*. Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 2013. **58**: p. 125-133.
20. Kuhlbrandt, W., *Structure and function of mitochondrial membrane protein complexes*. BMC Biol, 2015. **13**: p. 89.
21. Neubauer, S., *The Failing Heart — An Engine Out of Fuel*. New England Journal of Medicine, 2007. **356**(11): p. 1140-1151.
22. Lesnefsky, E.J., et al., *Mitochondrial dysfunction in cardiac disease: ischemia--reperfusion, aging, and heart failure*. J Mol Cell Cardiol, 2001. **33**(6): p. 1065-89.
23. Berg, J.M., J.L. Tymoczko, and L. Stryer, *Die oxidative Phosphorylierung*, in *Stryer Biochemie*, J.M. Berg, J.L. Tymoczko, and L. Stryer, Editors. 2013, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 528-568.
24. Ong, S.-B., et al., *Mitochondrial fusion and fission proteins as novel therapeutic targets for treating cardiovascular disease*. European Journal of Pharmacology, 2015. **763**: p. 104-114.
25. Roy, M., et al., *Mitochondrial division and fusion in metabolism*. Curr Opin Cell Biol, 2015. **33**: p. 111-8.
26. Dedkova, E.N. and L.A. Blatter, *Measuring mitochondrial function in intact cardiac myocytes*. Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 2012. **52**(1): p. 48-61.
27. Paradies, G., et al., *Functional role of cardiolipin in mitochondrial bioenergetics*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics, 2014. **1837**(4): p. 408-417.
28. Saks, V., et al., *Molecular system bioenergetics: regulation of substrate supply in response to heart energy demands*. J Physiol, 2006. **577**(Pt 3): p. 769-77.
29. Stanley, W.C., F.A. Recchia, and G.D. Lopaschuk, *Myocardial Substrate Metabolism in the Normal and Failing Heart*. Physiological Reviews, 2005. **85**(3): p. 1093-1129.

30. Akram, M., *Citric Acid Cycle and Role of its Intermediates in Metabolism*. Cell Biochemistry and Biophysics, 2014. **68**(3): p. 475-478.
31. Schwarz, K., et al., *The breathing heart — Mitochondrial respiratory chain dysfunction in cardiac disease*. International Journal of Cardiology, 2014. **171**(2): p. 134-143.
32. Gu, J., et al., *The architecture of the mammalian respirasome*. Nature, 2016. **537**(7622): p. 639-43.
33. Kadenbach, B., et al., *The role of mitochondrial membrane potential in ischemic heart failure*. Mitochondrion, 2011. **11**(5): p. 700-706.
34. Hüttemann, M., et al., *Regulation of mitochondrial respiration and apoptosis through cell signaling: Cytochrome c oxidase and cytochrome c in ischemia/reperfusion injury and inflammation*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics, 2012. **1817**(4): p. 598-609.
35. Saraste, M., *Oxidative Phosphorylation at the fin de siècle*. Science, 1999. **283**(5407): p. 1488-1493.
36. Williams, G.S., L. Boyman, and W.J. Lederer, *Mitochondrial calcium and the regulation of metabolism in the heart*. J Mol Cell Cardiol, 2015. **78**: p. 35-45.
37. Kadenbach, B., et al., *New extension of the Mitchell Theory for oxidative phosphorylation in mitochondria of living organisms*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects, 2010. **1800**(3): p. 205-212.
38. Brand M , D. and G. Nicholls D *Assessing mitochondrial dysfunction in cells*. Biochem J, 2011. **435**(Pt 2): p. 297-312.
39. Chance, B. and G.R. Williams, *The respiratory chain and oxidative phosphorylation*. Adv Enzymol Relat Subj Biochem, 1956. **17**: p. 65-134.
40. Brandt, U., *Mitochondrien – Organellen der ATP-Gewinnung*, in Löffler/Petrides *Biochemie und Pathobiochemie*, P.C. Heinrich, M. Müller, and L. Graeve, Editors. 2014, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 235-251.
41. Chance, B. and G.R. Williams, *A simple and rapid assay of oxidative phosphorylation*. Nature, 1955. **175**(4469): p. 1120-1.
42. Finkel, T., et al., *The ins and outs of mitochondrial calcium*. Circ Res, 2015. **116**(11): p. 1810-9.
43. Hurst, S., J. Hoek, and S.S. Sheu, *Mitochondrial Ca(2+) and regulation of the permeability transition pore*. J Bioenerg Biomembr, 2017. **49**(1): p. 27-47.
44. Boyman, L., et al., *Calcium movement in cardiac mitochondria*. Biophys J, 2014. **107**(6): p. 1289-301.

45. Liu, T. and B. O'Rourke, *Regulation of mitochondrial Ca²⁺ and its effects on energetics and redox balance in normal and failing heart*. J Bioenerg Biomembr, 2009. **41**(2): p. 127-32.
46. Williams, G.S., et al., *Mitochondrial calcium uptake*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(26): p. 10479-86.
47. Griffiths, E.J., *Mitochondrial calcium transport in the heart: physiological and pathological roles*. J Mol Cell Cardiol, 2009. **46**(6): p. 789-803.
48. Boyman, L., et al., *NCLX: The mitochondrial sodium calcium exchanger*. Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 2013. **59**: p. 205-213.
49. Cadenas, S., *ROS and redox signaling in myocardial ischemia-reperfusion injury and cardioprotection*. Free Radical Biology and Medicine, 2018. **117**: p. 76-89.
50. Granger, D.N. and P.R. Kvietys, *Reperfusion injury and reactive oxygen species: The evolution of a concept*. Redox Biology, 2015. **6**: p. 524-551.
51. Circu, M.L. and T.Y. Aw, *Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis*. Free Radic Biol Med, 2010. **48**(6): p. 749-62.
52. Zorov, D.B., M. Juhaszova, and S.J. Sollott, *Mitochondrial ROS-induced ROS release: An update and review*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics, 2006. **1757**(5): p. 509-517.
53. Shadel, G.S. and T.L. Horvath, *Mitochondrial ROS signaling in organismal homeostasis*. Cell, 2015. **163**(3): p. 560-9.
54. Yun, J. and T. Finkel, *Mitohormesis*. Cell Metab, 2014. **19**(5): p. 757-66.
55. Brown, D.A., H.N. Sabbah, and S.R. Shaikh, *Mitochondrial inner membrane lipids and proteins as targets for decreasing cardiac ischemia/reperfusion injury*. Pharmacology & Therapeutics, 2013. **140**(3): p. 258-266.
56. Walters, A.M., G.A. Porter, Jr., and P.S. Brookes, *Mitochondria as a drug target in ischemic heart disease and cardiomyopathy*. Circ Res, 2012. **111**(9): p. 1222-36.
57. Berg, J.M., et al., *Die oxidative Phosphorylierung*, in *Stryer Biochemie*. 2018, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 613-660.
58. Berg, J.M., et al., *Glykolyse und Gluconeogenese*, in *Stryer Biochemie*. 2018, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 529-579.
59. Monassier, J.P., *Reperfusion injury in acute myocardial infarction. From bench to cath lab. Part I: Basic considerations*. Arch Cardiovasc Dis, 2008. **101**(7-8): p. 491-500.

60. Neuhof, C. and H. Neuhof, *Calpain system and its involvement in myocardial ischemia and reperfusion injury*. World J Cardiol, 2014. **6**(7): p. 638-52.
61. Bernardi, P. and F. Di Lisa, *The mitochondrial permeability transition pore: Molecular nature and role as a target in cardioprotection*. Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 2015. **78**: p. 100-106.
62. Ong, S.-B., et al., *The mitochondrial permeability transition pore and its role in myocardial ischemia reperfusion injury*. Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 2015. **78**: p. 23-34.
63. Halestrap, A.P. and A.P. Richardson, *The mitochondrial permeability transition: a current perspective on its identity and role in ischaemia/reperfusion injury*. J Mol Cell Cardiol, 2015. **78**: p. 129-41.
64. Korge, P., et al., *Protective role of transient pore openings in calcium handling by cardiac mitochondria*. J Biol Chem, 2011. **286**(40): p. 34851-7.
65. Morciano, G., et al., *Molecular identity of the mitochondrial permeability transition pore and its role in ischemia-reperfusion injury*. Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 2015. **78**: p. 142-153.
66. Kalogeris, T., et al., *Cell biology of ischemia/reperfusion injury*. Int Rev Cell Mol Biol, 2012. **298**: p. 229-317.
67. Frangogiannis, N.G., *Cell biological mechanisms in regulation of the post-infarction inflammatory response*. Current Opinion in Physiology, 2018. **1**: p. 7-13.
68. Ong, S.-B., et al., *Inflammation following acute myocardial infarction: Multiple players, dynamic roles, and novel therapeutic opportunities*. Pharmacology & Therapeutics, 2018.
69. Galluzzi, L., et al., *Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018*. Cell Death Differ, 2018.
70. Takemura, G., et al., *Cardiomyocyte apoptosis in the failing heart--a critical review from definition and classification of cell death*. Int J Cardiol, 2013. **167**(6): p. 2373-86.
71. Orrenius, S., V. Gogvadze, and B. Zhivotovsky, *Calcium and mitochondria in the regulation of cell death*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2015. **460**(1): p. 72-81.
72. Maroko, P.R., et al., *Coronary artery reperfusion. I. Early effects on local myocardial function and the extent of myocardial necrosis*. J Clin Invest, 1972. **51**(10): p. 2710-6.

73. Ginks, W.R., et al., *Coronary artery reperfusion. II. Reduction of myocardial infarct size at 1 week after the coronary occlusion*. J Clin Invest, 1972. **51**(10): p. 2717-23.
74. Rentrop, K.P., et al., *Acute myocardial infarction: intracoronary application of nitroglycerin and streptokinase*. Clin Cardiol, 1979. **2**(5): p. 354-63.
75. Hausenloy, D.J., M.R. Duchon, and D.M. Yellon, *Inhibiting mitochondrial permeability transition pore opening at reperfusion protects against ischaemia–reperfusion injury*. Cardiovascular Research, 2003. **60**(3): p. 617-625.
76. Chi, H.J., et al., *Progress in Therapies for Myocardial Ischemia Reperfusion Injury*. Curr Drug Targets, 2017. **18**(15): p. 1712-1721.
77. Przyklenk, K., *Lethal Myocardial "Reperfusion Injury": The Opinions of Good Men*. J Thromb Thrombolysis, 1997. **4**(1): p. 5-6.
78. Zhao, Z.Q., et al., *Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2003. **285**(2): p. H579-88.
79. Hausenloy, D.J., et al., *Novel targets and future strategies for acute cardioprotection: Position Paper of the European Society of Cardiology Working Group on Cellular Biology of the Heart*. Cardiovasc Res, 2017. **113**(6): p. 564-585.
80. Brauchle, E. and K. Schenke-Layland, *Raman spectroscopy in biomedicine - non-invasive in vitro analysis of cells and extracellular matrix components in tissues*. Biotechnol J, 2013. **8**(3): p. 288-97.
81. Notingher, I. and L.L. Hench, *Raman microspectroscopy: a noninvasive tool for studies of individual living cells in vitro*. Expert Rev Med Devices, 2006. **3**(2): p. 215-34.
82. Votteler, M., et al., *Non-contact, label-free monitoring of cells and extracellular matrix using Raman spectroscopy*. J Vis Exp, 2012(63).
83. Butler, H.J., et al., *Using Raman spectroscopy to characterize biological materials*. Nat. Protocols, 2016. **11**(4): p. 664-687.
84. Huser, T. and J. Chan, *Raman spectroscopy for physiological investigations of tissues and cells*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2015. **89**: p. 57-70.
85. Notingher, I. and L.L. Hench, *Raman microspectroscopy: a noninvasive tool for studies of individual living cells in vitro*. Expert Review of Medical Devices, 2006. **3**(2): p. 215-234.
86. Downes, A. and A. Elfick, *Raman spectroscopy and related techniques in biomedicine*. Sensors (Basel), 2010. **10**(3): p. 1871-89.

87. Puppels, G.J., et al., *Laser irradiation and Raman spectroscopy of single living cells and chromosomes: sample degradation occurs with 514.5 nm but not with 660 nm laser light*. *Exp Cell Res*, 1991. **195**(2): p. 361-7.
88. Notingher, I., et al., *In situ characterisation of living cells by Raman spectroscopy*. *Spectroscopy*, 2002. **16**(2).
89. Notingher, I., *Raman Spectroscopy Cell-based Biosensors*. 2007: Sensors (Basel). 2007 Aug;7(8):1343-58.
90. Pudlas, M., et al., *Raman spectroscopy: a noninvasive analysis tool for the discrimination of human skin cells*. *Tissue Eng Part C Methods*, 2011. **17**(10): p. 1027-40.
91. Sommer, S., et al., *Impact of levosimendan and ischaemia-reperfusion injury on myocardial subsarcolemmal mitochondrial respiratory chain, mitochondrial membrane potential, Ca²⁺ cycling and ATP synthesis*. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2016. **49**(2): p. e54-62; discussion e62.
92. Council, N.R., *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals: Eighth Edition*. 2011, Washington, DC: The National Academies Press. 246.
93. Bell, R.M., M.M. Mocanu, and D.M. Yellon, *Retrograde heart perfusion: the Langendorff technique of isolated heart perfusion*. *J Mol Cell Cardiol*, 2011. **50**(6): p. 940-50.
94. Bugger, H., J.M. Chemnitz, and T. Doenst, *Differential changes in respiratory capacity and ischemia tolerance of isolated mitochondria from atrophied and hypertrophied hearts*. *Metabolism*, 2006. **55**(8): p. 1097-106.
95. Smith, P.K., et al., *Measurement of protein using bicinchoninic acid*. *Anal Biochem*, 1985. **150**(1): p. 76-85.
96. Walker, D., *The Principle of Oxygen Measurement*, in *The Use of the Oxygen Electrode & Fluorescence Probes in Simple Measurements of Photosynthesis*. 1987, Oxygraphics Limited. p. 1-2.
97. Lanza, I.R. and K.S. Nair, *Functional assessment of isolated mitochondria in vitro*. *Methods Enzymol*, 2009. **457**: p. 349-72.
98. Rustin, P., et al., *Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies*. *Clin Chim Acta*, 1994. **228**(1): p. 35-51.
99. Ho, P.W., et al., *Uncoupling protein-4 (UCP4) increases ATP supply by interacting with mitochondrial Complex II in neuroblastoma cells*. *PLoS One*, 2012. **7**(2): p. e32810.

100. Baracca, A., et al., *Rhodamine 123 as a probe of mitochondrial membrane potential: evaluation of proton flux through F₀ during ATP synthesis*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 2003. **1606**(1): p. 137-146.
101. Branchini, B.R., et al., *An enhanced chimeric firefly luciferase-inspired enzyme for ATP detection and bioluminescence reporter and imaging applications*. *Analytical Biochemistry*, 2015. **484**: p. 148-153.
102. Simon, N., et al., *Tacrolimus and sirolimus decrease oxidative phosphorylation of isolated rat kidney mitochondria*. *Br J Pharmacol*, 2003. **138**(2): p. 369-76.
103. Fernandes, M.A., et al., *Tetraandrine concentrations not affecting oxidative phosphorylation protect rat liver mitochondria from oxidative stress*. *Mitochondrion*, 2006. **6**(4): p. 176-85.
104. Matas, J., et al., *Increased expression and intramitochondrial translocation of cyclophilin-D associates with increased vulnerability of the permeability transition pore to stress-induced opening during compensated ventricular hypertrophy*. *J Mol Cell Cardiol*, 2009. **46**(3): p. 420-30.
105. Downes, A., R. Mouras, and A. Elfick, *Optical spectroscopy for noninvasive monitoring of stem cell differentiation*. *J Biomed Biotechnol*, 2010. **2010**: p. 101864.
106. Steinke, M., et al., *An engineered 3D human airway mucosa model based on an SIS scaffold*. *Biomaterials*, 2014. **35**(26): p. 7355-62.
107. Peng, J., et al., *Asymmetric least squares for multiple spectra baseline correction*. *Anal Chim Acta*, 2010. **683**(1): p. 63-8.
108. Yao, Y.T., et al., *Sevoflurane postconditioning protects isolated rat hearts against ischemia-reperfusion injury: the role of radical oxygen species, extracellular signal-related kinases 1/2 and mitochondrial permeability transition pore*. *Mol Biol Rep*, 2010. **37**(5): p. 2439-46.
109. Chang, X., et al., *Cardioprotective effects of salidroside on myocardial ischemia-reperfusion injury in coronary artery occlusion-induced rats and Langendorff-perfused rat hearts*. *International Journal of Cardiology*, 2016. **215**: p. 532-544.
110. Tompkins, A.J., et al., *Mitochondrial dysfunction in cardiac ischemia-reperfusion injury: ROS from complex I, without inhibition*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 2006. **1762**(2): p. 223-231.
111. Makazan, Z., H.K. Saini, and N.S. Dhalla, *Role of oxidative stress in alterations of mitochondrial function in ischemic-reperfused hearts*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2007. **292**(4): p. H1986-94.

112. Kagawa, Y. and E. Racker, *Partial resolution of the enzymes catalyzing oxidative phosphorylation. 8. Properties of a factor conferring oligomycin sensitivity on mitochondrial adenosine triphosphatase*. J Biol Chem, 1966. **241**(10): p. 2461-6.
113. Rouslin, W., *Mitochondrial complexes I, II, III, IV, and V in myocardial ischemia and autolysis*. Am J Physiol, 1983. **244**(6): p. H743-8.
114. Borutaite, V., et al., *Control and kinetic analysis of ischemia-damaged heart mitochondria: which parts of the oxidative phosphorylation system are affected by ischemia?* Biochim Biophys Acta, 1995. **1272**(3): p. 154-8.
115. Dolinsky, V.W., et al., *Cardiac mitochondrial energy metabolism in heart failure: Role of cardiolipin and sirtuins*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids, 2016. **1861**(10): p. 1544-1554.
116. Paradies, G., et al., *Protective role of melatonin in mitochondrial dysfunction and related disorders*. Arch Toxicol, 2015. **89**(6): p. 923-39.
117. Kang, P.T., et al., *Impairment of pH gradient and membrane potential mediates redox dysfunction in the mitochondria of the post-ischemic heart*. Basic Res Cardiol, 2017. **112**(4): p. 36.
118. Huttemann, M., et al., *Regulation of oxidative phosphorylation, the mitochondrial membrane potential, and their role in human disease*. J Bioenerg Biomembr, 2008. **40**(5): p. 445-56.
119. Halestrap, A.P., *The regulation of the matrix volume of mammalian mitochondria in vivo and in vitro and its role in the control of mitochondrial metabolism*. Biochim Biophys Acta, 1989. **973**(3): p. 355-82.
120. Testai, L., et al., *Mitochondrial potassium channels as pharmacological target for cardioprotective drugs*. Med Res Rev, 2015. **35**(3): p. 520-53.
121. O'Rourke, B., *Evidence for Mitochondrial K(+) Channels and Their Role in Cardio-protection*. Circulation research, 2004. **94**(4): p. 420-432.
122. Xu, W., et al., *Cytoprotective role of Ca²⁺- activated K⁺ channels in the cardiac inner mitochondrial membrane*. Science, 2002. **298**(5595): p. 1029-33.
123. Halestrap, A.P., *What is the mitochondrial permeability transition pore?* Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 2009. **46**(6): p. 821-831.
124. Kim, J.S., Y. Jin, and J.J. Lemasters, *Reactive oxygen species, but not Ca²⁺ overloading, trigger pH- and mitochondrial permeability transition-dependent death of adult rat myocytes after ischemia-reperfusion*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2006. **290**(5): p. H2024-34.

125. Bernardi, P., *Mitochondrial transport of cations: channels, exchangers, and permeability transition*. *Physiol Rev*, 1999. **79**(4): p. 1127-55.
126. Carreira, R.S., H.T. Facundo, and A.J. Kowaltowski, *Mitochondrial K⁺ transport and cardiac protection during ischemia/reperfusion*. *Braz J Med Biol Res*, 2005. **38**(3): p. 345-52.
127. Tang, H., et al., *NIR Raman spectroscopic investigation of single mitochondria trapped by optical tweezers*. *Opt Express*, 2007. **15**(20): p. 12708-16.
128. Movasaghi, Z., S. Rehman, and I.U. Rehman, *Raman Spectroscopy of Biological Tissues*. *Applied Spectroscopy Reviews*, 2007. **42**(5): p. 493-541.
129. Koch, S., et al. *Novel cell identification – markerfree and suitable for living cells*. in *Clinical and Biomedical Spectroscopy and Imaging III*. 2013. Munich: Optical Society of America.
130. Daum, G., *Lipids of mitochondria*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes*, 1985. **822**(1): p. 1-42.
131. Houtkooper, R.H. and F.M. Vaz, *Cardiolipin, the heart of mitochondrial metabolism*. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2008. **65**(16): p. 2493-2506.
132. Paradies, G., et al., *Lipid peroxidation and alterations to oxidative metabolism in mitochondria isolated from rat heart subjected to ischemia and reperfusion*. *Free Radical Biology and Medicine*, 1999. **27**(1–2): p. 42-50.
133. Almailda-Pagán, P.F., A. Lucas-Sánchez, and D.R. Tocher, *Changes in mitochondrial membrane composition and oxidative status during rapid growth, maturation and aging in zebrafish, *Danio rerio**. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 2014. **1841**(7): p. 1003-1011.
134. Bliksøen, M., et al., *Mitochondrial DNA damage and repair during ischemia–reperfusion injury of the heart*. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 2015. **78**: p. 9-22.
135. Okada, M., et al., *Label-free Raman observation of cytochrome c dynamics during apoptosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012. **109**(1): p. 28-32.
136. Walter, A., et al., *Analysis of the cytochrome distribution via linear and nonlinear Raman spectroscopy*. *Analyst*, 2010. **135**(5): p. 908-917.
137. Berezhna, S., H. Wohlrab, and P.M. Champion, *Resonance Raman investigations of cytochrome c conformational change upon interaction with the membranes of intact and Ca²⁺-exposed mitochondria*. *Biochemistry*, 2003. **42**(20): p. 6149-58.

138. Ogawa, M., et al., *Label-free biochemical imaging of heart tissue with high-speed spontaneous Raman microscopy*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2009. **382**(2): p. 370-374.
139. Chertkova, R.V., et al., *New insight into the mechanism of mitochondrial cytochrome c function*. PLoS One, 2017. **12**(5): p. e0178280.
140. Brazhe, N.A., et al., *Probing cytochrome c in living mitochondria with surface-enhanced Raman spectroscopy*. Scientific Reports, 2015. **5**: p. 13793.
141. Spiro, T.G. and T.C. Strekas, *Resonance Raman spectra of hemoglobin and cytochrome c: inverse polarization and vibronic scattering*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1972. **69**(9): p. 2622-6.
142. Okotrub, K.A. and N.V. Surovtsev, *Photobleaching of the resonance Raman lines of cytochromes in living yeast cells*. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 2014. **141**: p. 269-274.
143. Koch, S., et al., *Novel cell identification – markerfree and suitable for living cells*. Vol. 8798. 2013.
144. Sjöstrand, F.S. and W. Bernhard, *The structure of mitochondrial membranes in frozen sections*. Journal of Ultrastructure Research, 1976. **56**(2): p. 233-246.
145. Uzunbajakava, N., et al., *Nonresonant Confocal Raman Imaging of DNA and Protein Distribution in Apoptotic Cells*. Biophysical Journal, 2003. **84**(6): p. 3968-3981.
146. Nikolettou, V., et al., *Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research, 2013. **1833**(12): p. 3448-3459.
147. Krysko, D.V., et al., *Apoptosis and necrosis: Detection, discrimination and phagocytosis*. Methods, 2008. **44**(3): p. 205-221.
148. Brown, G.C. and V. Borutaite, *Regulation of apoptosis by the redox state of cytochrome c*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics, 2008. **1777**(7): p. 877-881.

7. Anhang

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Struktur eines Mitochondriums.....	4
Abbildung 2: Überblick zur Physiologie der Atmungskette.....	6
Abbildung 3: Rayleigh-, Stokes- und Anti-Stokes-Streuung.....	17
Abbildung 4: Aufbau eines Raman-Spektroskops.....	18
Abbildung 5: Aufbau des Langendorff-Apparates.....	29
Abbildung 6: Mitochondrien in der digitalen Hellfeldmikroskopie.....	38
Abbildung 7: Clark-Elektrode: Komplex-I-V-Funktion.....	43
Abbildung 8: Clark-Elektrode: Komplex-II-V-Funktion.....	44
Abbildung 9: Mitochondriales Membranpotential.....	46
Abbildung 10: Kalium-Permeabilität.....	48
Abbildung 11: Mitochondriale Schwellung.....	49
Abbildung 12: Mitochondriale CRC: Komplex I-V-Funktion.....	50
Abbildung 13: Mitochondriale CRC: Komplex II-V-Funktion.....	51
Abbildung 14: Vorversuch Eins: PCA SSM und Puffer M.....	52
Abbildung 15: Vorversuch Eins: Mittelwertspektren.....	53
Abbildung 16: Vorversuch Eins: PCA einzelner WZ-Bereiche.....	54
Abbildung 17: Vorversuch Zwei: PCA Kontroll-SSM.....	55
Abbildung 18: Vorversuch Zwei: Mittelwertspektrum Kontroll SSM.....	56
Abbildung 19: Vorversuch Drei: PCA gefrorener und nicht-gefrorener SSM.....	57
Abbildung 20: Vorversuch Drei: PCA einzelner Messtage.....	58
Abbildung 21: Vorversuch Drei: Mittelwertspektren.....	58
Abbildung 22: Vorversuch Drei: PCA einzelner WZ-Bereiche.....	59
Abbildung 23: Vorversuch Drei Mittelwert und Standardabweichung.....	60
Abbildung 24: Grundbedarf-Messung: Mittelwertspektren von IR-und Kontroll-SSM.....	61
Abbildung 25: Respirationsstadium 2: Mittelwertspektren von IR-und Kontroll-SSM.....	62
Abbildung 26: Respirationsstadium 4: PCA von IR-und Kontroll-SSM.....	63
Abbildung 27: Respirationsstadium 4: Mittelwertspektren von IR-und Kontroll-SSM... ..	64
Abbildung 28: Respirationsstadium 4: PCA einzelner WZ-Bereiche.....	65
Abbildung 29: Oligomycin-Zugabe: PCA von IR-und Kontroll-SSM I.....	66
Abbildung 30: Oligomycin-Zugabe: PCA von IR-und Kontroll-SSM II.....	67
Abbildung 31: Oligomycin-Zugabe: Mittelwertspektren.....	67
Abbildung 32: Oligomycin-Zugabe: PCA einzelner WZ-Bereiche.....	68
Abbildung 33: FCCP-Zugabe: PCA von IR-und Kontroll-SSM I.....	70
Abbildung 34: FCCP-Zugabe: PCA von IR-und Kontroll-SSM II.....	71
Abbildung 35: FCCP-Zugabe: Mittelwertspektren.....	71
Abbildung 36: FCCP-Zugabe: PCA einzelner WZ-Bereiche.....	72

Abkürzungsverzeichnis

A ₅₂₀	Abnahme der Lichtabsorption bei 520 nm Wellenlänge
AK	Atmungskette
äMM	Äußere Mitochondrien-Membran
BCA	Bicinchoninsäure-Ansatz
CCCP	Carbonyl-Cyanid-3-Chlorophenylhydrazon
CRC	Calcium-Retentions-Kapazität
DNA	Desoxyribonuklein-Säure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EKG	Elektrokardiogramm
ETK	Elektronentransportkette
FADH	Flavin-Adenin-Dinukleotid
GLP-1	Glucagon-like Peptide 1
H ₂ O ₂	Wasserstoff-Peroxid
IFM	Interfibrilläre Mitochondrien
IMR	Intermembranraum
IR0/30	Versuchsgruppe, in der kein Ischämie (0 Minuten)-Reperfusion (30 Minuten)-Schaden induziert wird
K I bis K V	Komplex I bis Komplex V der Atmungskette

ADP	Adenosin-Diphosphat
AMI	Akuter Myokardinfarkt
ATP	Adenosin-Triphosphat
BSA	Bovines Serum-Albumin
CCD	Ladungsgekoppeltes Gerät
CsA	Cyclosporin A
e ⁻	Elektron
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-Tetraessigsäure
ETK	Elektronentransportkette
FACS	Durchflusszytometrie
FCCP	Carbonyl-Cyanid-4-(trifluoromethoxy)-Phenylhydrazon
H ⁺	Proton
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-Ethansulfon-Säure
iMM	Innere Mitochondrien-Membran
IR	Ischämie-Reperfusion-Schaden
IR40/30	Versuchsgruppe, in der ein Ischämie (40 Minuten)-Reperfusion (30 Minuten)-Schaden induziert wird
LVP dp/dt _{max}	Kontraktilität

Abbildungs-, Abkürzungs- und Tabellenverzeichnis

LVP _{max}	maximaler, linksventrikulärer Druck
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
O ₂ ⁻	Superoxid-Anion
PC	Hauptkomponente
PCI	Perkutane Koronar-Intervention
RCI	respiratorischer Kontroll-Index
RFU	Rhodamin123-vermittelte Fluoreszenz
RS	Respirationsstadium
TRIS	Tris (hydroxymethyl)-Aminomethan
VDAC	Voltage-dependant anion carrier
WZ	Wellenzahl
$\Delta\psi_m$	Mitochondriales Membranpotential

MCU	Mitochondrialer Ca ²⁺ -Uniporter
mPTP	mitochondriale Permeabilitäts-Transitions-Pore
NCLX	Mitochondrialer Ca ²⁺ -Transporter NCLX
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCA	Hautkomponenten-Analyse
PTFE	Polytetrafluorethylen
RET	reverser Elektronen-Transport
ROS	Reaktive Sauerstoff-Spezies
SSM	Subsarkolemmale Mitochondrien
UCP	Uncoupling protein
V _{Max}	Maximalgeschwindigkeit
Δp_m	protonenmotorische Triebkraft

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Respirationsstadium nach B. Chance.....	8
Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Testkits.....	22
Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Chemikalien.	22
Tabelle 4: Zusammensetzung der verwendeten Puffer.	23
Tabelle 5: Auflistung der verwendeten Medikamente.	24
Tabelle 6: Auflistung der verwendeten Geräte.	24
Tabelle 7: Auflistung des verwendeten Verbrauchsmaterials.	25
Tabelle 8: Auflistung der verwendeten Software.	26
Tabelle 9: Vorversuche am Raman-Spektroskop: Anzahl Messungen.....	38
Tabelle 10: IR-Analyse am Raman-Spektroskop: Anzahl Messungen.	39
Tabelle 11: Herzfunktion in der Langendorff-Anlage.....	42
Tabelle 12: Parameter der Mitochondrienfunktion.....	45
Tabelle 13: Basaler ATP-Gehalt energetisierter SSM.	47
Tabelle 14: ATP-Produktion energetisierter SSM.	47
Tabelle 15: Auflistung der in Abb. 15 identifizierten WZ-Bereiche.....	53
Tabelle 16: Auflistung der in Abb. 17 identifizierten WZ-Bereiche.....	56
Tabelle 17: Auflistung der in Abb. 21 identifizierten WZ-Bereiche.	59
Tabelle 18: Auflistung der in Abb. 27 identifizierten WZ-Bereiche.....	65
Tabelle 19: Auflistung der in Abb. 31 identifizierten WZ-Bereiche.....	69
Tabelle 20: Auflistung der in Abb. 35 identifizierten WZ-Bereiche.....	72
Tabelle 21: Vorversuch Zwei: Zuordnung der relevanten WZ-Bereiche.	79
Tabelle 22: Vorversuch Drei: Zuordnung der relevanten WZ-Bereiche.....	82
Tabelle 23: Respirationsstadium 4: Zuordnung der tendenziell rel. WZ-Bereiche.	86

Danksagung

Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Frau Dr. Stefanie Sommer und Herrn Dr. Sebastian Sommer für die kompetente und engmaschige Betreuung bei der Entstehung dieser Arbeit. Herzlich möchte ich auch Frau Dr. Maria Steinke vom Institut für Tissue Engineering für die intensive Betreuung und Unterstützung danken.

Des Weiteren danke ich Frau Heidi Linß und Frau Renate Wahn für die Einarbeitung in die Methoden zur Analyse der mitochondrialen Funktion.

Herr Dr. Peer Kanofsky überließ mir die Grafik zum Aufbau des Langendorff-Apparates, dafür einen herzlichen Dank.

Zu guter Letzt ein großer Dank an meine Familie und an Frau Marlene Wendland, die mich während des Studium und der Promotion immer unterstützt haben.

Lebenslauf Simon Ruppert

Persönliche Daten

Name Simon Max Ruppert
E-Mail Simon-ruppert@gmx.de
Geburtsdatum 15.01.1990
Geburtsort Würzburg

Schulische Ausbildung

1996 – 2000 Friedrich-Hegel-Grundschule Nürnberg
2000 – 2009 Hans-Sachs-Gymnasium Nürnberg, Abschluss: Abitur mit Note 1,5.
Leistungskurse Chemie und Französisch

Studium

10/2010 Beginn des Medizinstudiums an der Universität Würzburg
08/2012 Abschluss des Ersten Abschnitts der Ärztlichen Prüfung
– Abschlussnote „gut“
10/2016 Abschluss des Zweiten Abschnitts der Ärztlichen Prüfung
– Abschlussnote „gut“
11/2017 Abschluss des Dritten Abschnitts der Ärztlichen Prüfung
– Abschlussnote „sehr gut“.
Bestehen der Ärztlichen Prüfung mit der Gesamtnote „gut“ (1,66)

Ärztliche Tätigkeit

Seit 04/18 Assistenzarzt in der Medizinischen Klinik 1 des Universitätsklini-
kums Würzburg - Abteilung Nephrologie (Prof. Dr. C. Wanner)

Würzburg, den 11.04.2019

Simon Ruppert