

**Neutrophil-induzierter Reperfusionsschaden in isoliert-
perfundierten Rattenherzen nach Langendorff –
Einfluss des endothelialen Stickstoffmonoxidsynthase-
Transkriptionsverstärkers S803**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von
Karen V. Menning
aus Dunkerque (Frankreich)

Frankfurt 2003
(DF1)

Vom Fachbereich Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften der
Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Harald Schwalbe
Gutachter: Prof. Dr. Andreas Busch
Prof. Dr. Dr. Ernst Mutschler

Datum der Disputation: 17.11.2003

Meinen Eltern

Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
AUC	Fläche unter der Kurve (area under the curve)
bpm	Schläge pro Minute (beats per minute)
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
CD18-AK	CD18-Antikörper (cluster of differentiation)
cGMP	Cyclisches Guanosinmonophosphat
CF	Koronarfluss (coronary flow)
CK	Creatinkinase
CRP	C-reaktives Protein
dP/dt_{max}	Maximale Druckerhöhungsgeschwindigkeit
dP/dt_{min}	Maximale Druckabfallsgeschwindigkeit
EDHF	Endothelialer hyperpolarisierender Faktor (endothelium-derived hyperpolarizing factor)
EDRF	Endothelialer relaxierender Faktor (endothelium derived relaxing factor)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked-immunosorbent-assay
eNOS	Endotheliale Stickstoffmonoxidsynthase
fMLP	N-Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin
Glucose-6P	Glucose-6-Phosphat
G-6P-DH	Glucose-6-Phosphatdehydrogenase
HEC	Hydroxyethylzellulose
HF	Herzfrequenz
HK	Hexokinase
HMG-CoA	Hydroxymethyl-Glutaryl-Coenzym A
HOCl	Hypochlorige Säure
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
ICAM-1	Inter-cellular-adhesion-molecule-1
IC ₅₀	Halbmaximale Wirkkonzentration (Inhibition) eines Stoffes
IL-1 β	Interleukin-1 β
iNOS	Induzierbare Stickstoffmonoxidsynthase

i.p.	Intraperitoneal
K _{ATP}	ATP-sensitiver Kaliumkanal
KG	Körpergewicht
KHK	Koronare Herzkrankheit
LDH	Lactatdehydrogenase
LDL	Low-density-Lipoprotein
L-NAME	N ^ω -Nitro-L-Arginin-Methylester
LVDP	Linksventrikuläre Druckentwicklung (left ventricular developed pressure)
LVP _{dia}	Linksventrikulärer diastolischer Druck
LVP _{sys}	Linksventrikulärer systolischer Druck
MAP-Kinase	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MIP-1	Monozyten-inflammatorisches Protein-1
MPO	Myeloperoxidase
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (messenger ribonucleic acid)
NADH	Nicotinamidadenindinucleotid
NADPH	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat
nNOS	Neuronale Stickstoffmonoxidsynthase
NO	Stickstoffmonoxid (nitric oxide)
$\cdot\text{O}_2^-$	Superoxidanion
OCI ⁻	Hypochlorit
OH [•]	Hydroxylradikal
ONOO ⁻	Peroxinitrit
PAF	Plättchen-aktivierender Faktor
PKC	Proteinkinase C
PMN	Polymorphkernige neutrophile Granulozyten
PRP	Pressure Rate Product
RH	Reaktive Hyperämie
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species)
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
S803	Endothelialer Stickstoffmonoxidsynthase-Transkriptionsverstärker
SEM	Standardfehler des Mittelwertes (standard error of the mean)
sGC	Lösliche Guanylatcyclase

Sim	Simvastatin
SOD	Superoxiddismutase
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor- α
TTC	Triphenyltetrazoliumchlorid
VCAM-1	Vascular-cell-adhesion-molecule-1

1	EINLEITUNG.....	1
1.1	PATHOGENESE KORONARER HERZKRANKHEITEN.....	1
1.2	ISCHÄMISCHE HERZMUSKELNEKROSE.....	3
1.3	REPERFUSIONSSCHADEN.....	4
1.3.1	Pathophysiologie des kardialen Reperfusionsschadens.....	5
1.3.1.1	Strukturschäden und Funktionsschäden.....	5
1.3.1.2	Bedeutung der Radikale.....	8
1.3.1.3	Bedeutung der Zytokine.....	10
1.3.1.4	Transmigration neutrophiler Granulozyten.....	12
1.3.1.5	Bedeutung der endothelialen Stickstoffmonoxidsynthase.....	13
1.3.1.6	Bedeutung der endothelialen Dysfunktion.....	15
1.4	THERAPIE-OPTION: HMG-CoA-REDUKTASE-HEMMER.....	17
1.4.1	HMG-CoA-Reduktase-Hemmer und ihre pleiotropen Wirkungen.....	17
1.4.2	Simvastatin und der Reperfusionsschaden.....	19
1.5	DAS ISOLIERT-PERFUNDIERTE RATTENHERZ NACH LANGENDORFF.....	20
1.6	ZIELSETZUNG.....	20
2	MATERIAL UND METHODEN.....	23
2.1	CHEMIKALIEN, ANTIKÖRPER, KITSYSTEME.....	23
2.2	PERFUSIONSLÖSUNGEN UND PUFFER.....	24
2.3	VERSUCHSTIERE.....	25
2.4	ISOLIERUNG NEUTROPHILER GRANULOZYTEN AUS HUMANBLUT.....	26
2.4.1	Blutgewinnung.....	26
2.4.2	PMN-Gewinnung.....	26
2.4.3	Vitalitätstest und Zellzählung.....	28
2.5	ORGANPRÄPARATION.....	29
2.5.1	Blutentnahme aus Ratten.....	29
2.5.2	Herzentnahme bei Ratten.....	29
2.6	VERSUCHSMODELL: ISOLIERT-PERFUNDIERTES RATTENHERZ NACH LANGENDORFF.....	30
2.6.1	Perfusionsmodalitäten für isolierte Herzen.....	30
2.6.2	Erfassung hämodynamischer Parameter.....	33
2.6.3	Versuchsprotokolle.....	34
2.6.3.1	Erfassung des PMN-induzierten Reperfusionsschadens.....	34
2.6.3.2	Erfassung der Endothelfunktion.....	35
2.7	WEITERE UNTERSUCHUNGSMETHODEN.....	37
2.7.1	Bestimmung der Infarktgröße.....	37
2.7.2	Bestimmung der Creatinkinase und der Lactatdehydrogenase.....	38

Inhaltsverzeichnis

2.7.2.1	Creatinkinase	38
2.7.2.2	Lactatdehydrogenase.....	39
2.7.3	Zytokinbestimmung (IL-1 β und TNF- α)	40
2.7.4	Bestimmung der eNOS-Proteinexpression.....	40
2.8	UNTERSUCHTE SUBSTANZEN	42
2.8.1	CD18-Antikörper	42
2.8.2	Simvastatin	43
2.8.3	eNOS-Transkriptionsverstärker S803.....	43
2.9	VERSUCHSPLAN	45
2.9.1	Etablierungsstudie: PMN-induzierter Reperfusionsschaden	45
2.9.2	Behandlungsstudie: eNOS-Transkriptionsverstärker S803	45
2.10	AUSWERTUNG UND STATISTIK	47
3	ERGEBNISSE	49
3.1	ETABLIERUNGSSTUDIE: PMN-INDUZIERTER REPERFUSIONSSCHADEN	49
3.1.1	Vorversuche.....	49
3.1.1.1	Versuchsdauer und Hämodynamik.....	49
3.1.1.2	PMNs, fMLP, Thrombin und Hämodynamik.....	50
3.1.1.3	PMN-Vitalitätsbestimmung.....	51
3.1.2	Ergebnisse der Hämodynamikmessung	52
3.1.2.1	Herzfrequenz.....	52
3.1.2.2	Linksventrikulärer Druck.....	53
3.1.2.3	Kontraktilität und Relaxation	55
3.1.2.4	Koronarfluss	58
3.1.3	Bestimmung der Zytokinfreisetzung	58
3.1.4	Bestimmung der Infarktgröße und der Zellschädigung.....	60
3.1.4.1	Infarktgröße	60
3.1.4.2	Creatinkinase und Lactatdehydrogenase	60
3.2	BEHANDLUNGSSTUDIE: ENOS-TRANSKRIPTIONSVERSTÄRKER.....	62
3.2.1	Erfassung der Endothelfunktion.....	62
3.2.1.1	Ergebnisse der reaktiven Hyperämie-Versuche	62
3.2.1.2	Nachweis der eNOS-Expression	67
3.2.2	Ergebnisse der Hämodynamikmessung	68
3.2.2.1	Herzfrequenz.....	68
3.2.2.2	Linksventrikulärer Druck.....	69
3.2.2.3	Kontraktilität und Relaxation	71
3.2.2.4	Koronarfluss	74
3.2.3	Bestimmung der Zytokinfreisetzung	74
3.2.4	Bestimmung der Infarktgröße und der Zellschädigung.....	75
3.2.4.1	Infarktgröße	76

3.2.4.2	Creatinkinase und Lactatdehydrogenase	76
4	DISKUSSION	79
4.1	MODELL DES PMN-INDUZIERTEN REPERFUSIONSSCHADENS ISOLIERT-PERFUNDIERTER HERZEN	79
4.1.1	Einfluss der PMNs auf die myokardiale Dysfunktion	79
4.1.2	Einfluss der PMNs auf die Infarktgröße	83
4.1.3	Einfluss der PMNs auf die Zytokinfreisetzung	86
4.2	BEHANDLUNG MIT DEM CD18-ANTIKÖRPER	87
4.2.1	Einfluss auf die myokardiale Dysfunktion	87
4.2.2	Einfluss auf die Zytokinfreisetzung	88
4.3	BEHANDLUNG MIT DEM ENOS-TRANSKRIPTIONSVERSTÄRKER	89
4.3.1	Einfluss auf die myokardiale Dysfunktion	89
4.3.2	Einfluss auf die Infarktgröße	94
4.3.3	Einfluss auf die Zytokinfreisetzung	96
4.4	ABSCHLIESSENDE BETRACHTUNG	97
5	ZUSAMMENFASSUNG	99
	LITERATURVERZEICHNIS	101
	VERÖFFENTLICHUNGEN	
	DANKSAGUNG	
	LEBENS LAUF	

1 EINLEITUNG

1.1 PATHOGENESE KORONARER HERZKRANKHEITEN

Kardiovaskuläre Erkrankungen zählen in den westlichen Industrieländern zu den häufigsten Erkrankungen und Todesursachen. In diesen Ländern geht jeder zweite Todesfall auf einen Herzinfarkt oder Schlaganfall zurück. Mehr als 50% aller Fälle von Herzinfarkt und spontanem Herztod treten bei vermeintlich völlig gesunden Menschen plötzlich und ohne Vorwarnung auf. Die Ursachen des Herzinfarkts sind arteriosklerotische Veränderungen in der Gefäßwand, die über viele Jahre hinweg entstehen – häufig unbemerkt und ohne Schmerzen zu verursachen.

Die Arteriosklerose ist eine chronisch entzündliche Erkrankung. Seit Mitte der 80er Jahre wird die von Ross und Glomset (1973) entwickelte „response-to-injury“-Hypothese favorisiert. Nach dieser Theorie soll am Anfang der Arteriogenese eine Verletzung des Gefäßendothels stehen, zum einen begünstigt durch kardiovaskuläre Risikofaktoren wie Hypercholesterolämie, Diabetes mellitus, arterielle Hypertonie oder Nikotinabusus und zum anderen durch eine genetische Prädisposition. Das Initialstadium arteriosklerotischer Gefäßveränderungen ist charakterisiert durch eine subendotheliale Lipideinlagerung. Hierbei wandern Monozyten in die Gefäßwand ein, reifen zu Makrophagen heran und phagozytieren dort abgelagertes oxidiertes Cholesterol. Es entstehen so genannte Schaumzellen, sichtbare blasse Wölbungen, die „fatty streaks“. Ob diese Gefäßwandalterationen, die schon im Kindes- und frühen Erwachsenenalter beobachtet werden (Stary, 1989) und sich häufig auch wieder zurückbilden, tatsächlich als pathologisch zu werten sind oder eher eine physiologische Anpassung an bestimmte Belastungsreize darstellen, ist noch nicht geklärt. Wirken jedoch die Noxen, insbesondere erhöhtes Cholesterol, über einen längeren Zeitraum von Monaten und Jahren ein, so akkumulieren die Makrophagen und Low-density-Lipoproteine (LDL) aufgrund einer gesteigerten Endotheldurchlässigkeit in der Gefäßwand. Die eingewanderten Makrophagen setzen proinflammatorische Mediatoren frei, die weitere Entzündungszellen „anlocken“ sowie die Oxidation von LDL fördern und zur Zerstörung der extrazellulären Matrix führen. Im Zuge dessen können glatte Gefäßmuskelzellen proliferieren und von der Media in die

Intima migrieren. Daraus entwickelt sich im weiteren Verlauf eine arteriosklerotische Plaque. Diese ragt in das Arterienlumen hinein. Die Folge ist eine fortschreitende Einengung des Gefäßlumens (Stenose). Wenn der Blutfluss in derart veränderten Herzkranzgefäßen unter eine kritische Grenze sinkt, kommt es zu einer Durchblutungsstörung, der so genannten Ischämie.

Noch vor sechs Jahren galt die Aufmerksamkeit in erster Linie dem Nachweis und der Behandlung von Stenosen der Herzkranzgefäße, die sich durch Brustschmerzen bei Belastung (stabile Angina pectoris) äußern. Wissenschaftliche Untersuchungen haben jedoch gezeigt, dass Herzinfarkte in 90% aller Fälle von Herzkranzgefäßen ausgehen, die keine hochgradigen Stenosen aufweisen (Fishbein und Siegel, 1996). Dementsprechend wird die klinische Prognose der koronaren Herzkrankheit nicht allein durch den angiographisch nachweisbaren Stenosegrad, sondern vielmehr durch die Zahl und Struktur der Plaques bestimmt. So wird eine stabile von einer instabilen bzw. vulnerablen Plaque unterschieden (Falk und Fuster, 1995).

Arteriosklerotische Plaques bestehen aus zwei wesentlichen Komponenten: einem lipidreichen Kern und einer zum Gefäßlumen hin abgrenzenden fibrösen Kappe (Stary, 1989). Die instabile Plaque ist durch einen großen lipidreichen Kern und eine dünne fibröse Kappe gekennzeichnet. Reißt die Kappe ein, kommt es zur Freisetzung thrombogener Plaquebestandteile, die zu einer akuten Ausbildung intrakoronarer Thromben führen können. Diese können entweder durch endogene Lysefaktoren aufgelöst werden oder in eine instabile Angina-pectoris-Symptomatik münden. Der Myokardinfarkt ist schließlich das Resultat eines kompletten Gefäßverschlusses (Fuster, 1994).

Die Ätiologie koronarer Herzkrankheiten (KHK) hat in jüngster Zeit einen Paradigmenwechsel erfahren. Hierbei wird den Entzündungsvorgängen eine Schlüsselrolle zugeschrieben; sie können die Deckplatte einer stabilen Plaque abbauen und in eine instabile Plaque umwandeln. Dadurch besteht die Gefahr einer plötzlichen Ruptur mit konsekutivem Verschluss. Aus dem gewandelten Konzept ergeben sich neue Ideen für eine Früherkennung und Therapie der Krankheiten.

1.2 ISCHÄMISCHE HERZMUSKELNEKROSE

Durch arteriosklerotische Veränderungen der Herzkranzgefäße können die Durchblutung und somit die Sauerstoffversorgung eines begrenzten Gewebebezirks des Herzmuskels für kurze Zeit reduziert sein. Die so genannte Ischämie kann je nach Ausmaß zu einer Myokardzellnekrose führen. Da der myokardiale Stoffwechsel überwiegend oxidativ verläuft, hat eine Sauerstoffmangelversorgung relativ rasch eine Nekrose des Gewebes zur Folge.

Die Entwicklung einer Zellschädigung im ischämischen Areal beginnt mit dem Verlust des zellulären Energiegleichgewichts. Ist der Energiebedarf der Zelle nicht vollkommen gedeckt, kommt es zur Störung ATP-abhängiger Zellsysteme, wie beispielsweise membranärer Ionentransporte. Die Folge ist eine Störung des osmotischen Gleichgewichts, die zu einer Schwellung der Zellen führt. Der Verlust der Kalziumhomöostase ist Zeichen eines fortgeschrittenen, aber nicht notwendigerweise irreversiblen Zellschadens, der sich in Störungen der Kontraktion und der Relaxation der Myofibrillen äußert. Bei fortschreitender Einschränkung des Zellstoffwechsels kann es jedoch über die Funktionsstörung hinaus zu irreversiblen Schäden der Zellstruktur kommen. Dabei wird der oxidative Zellstoffwechsel durch den anaeroben Glukoseabbau ersetzt. Es kommt über eine zelluläre Lactatanreicherung zu einer Gewebeazidose und einer Störung der Membranintegrität (Jennings und Reimer, 1991). Der Übergang von reversibel zu irreversibel geschädigten Zellen erfolgt maßgeblich durch Zerstörung der Zellmembran. Hierbei führt eine gestörte Membranintegrität zu einem massiven Ionen- und Flüssigkeitseinstrom in die Zelle, durch den die Zelle so stark anschwillt, dass es schließlich zur Ruptur der Membran kommt. Die Membranruptur führt anschließend zur Desintegration der Zelle. Hierbei freigesetzte lysosomale Enzyme leiten eine Entzündungsreaktion ein, die wiederum zur Zellschädigung beiträgt (Jennings und Yellon, 1992).

Im ischämischen Herzmuskelgewebe werden demnach reversibel und irreversibel geschädigte Myozyten unterschieden. Im Optimalfall erholen sich erstere durch rechtzeitig einsetzende Wiederdurchblutung (Reperfusion) des ischämischen Areals, so dass sich der Nekrosebezirk auf die irreversibel geschädigten Herzmuskelzellen

beschränkt. Die Folgen der Ischämie hängen für die betroffenen Zellen im Allgemeinen von der Dauer der Ischämie, der jeweiligen Toleranz des Gewebes gegenüber dem Sauerstoffmangel und der lokalen Gefäßarchitektur ab. Ist die Ischämie von kurzer Dauer (weniger als drei Minuten), führt dies in der Regel zu keinen bleibenden Schäden. Eine länger andauernde Minderperfusion wird von den Geweben je nach Toleranz gegenüber den ischämischen Bedingungen unterschiedlich vertragen. Dabei spielt die momentane funktionelle Aktivität des Gewebes eine Schlüsselrolle. So lässt sich z. B. die Toleranz gegenüber einer Ischämie durch Abkühlen erheblich erhöhen (Vinten-Johansen und Thourani, 2000). Ferner schützen vorgeschaltete, kurzzeitige Ischämieepisodes durch eine so genannte Präkonditionierung des Gewebes gegen die Folgen einer sich anschließenden länger anhaltenden Ischämieperiode (Murry *et al.*, 1986).

1.3 REPERFUSIONSSCHADEN

Eine frühzeitige Reperfusion ist unabdingbar für das post-ischämische Überleben von Geweben. Der Vorgang der Reperfusion beinhaltet jedoch nicht nur die Wiederaufnahme der gewebeversorgenden Transportfunktionen wie Nährstoff- und Sauerstofftransport, Schadstoffabtransport und endokrine Signalweitergabe, sondern geht paradoxerweise auch mit gewebeschädigenden Effekten einher. Bereits vor über 65 Jahren wurden unter Reperfusion zusätzliche Funktionseinbußen beobachtet, die über die ischämiebedingte Schädigung hinausgingen (Tennant und Wiggers, 1935). Seitdem ist dieses Phänomen für viele Organe beschrieben worden, beispielsweise für das Gehirn (Nelson *et al.*, 1992), die Lunge (Takahashi *et al.*, 1993), die Leber (Southard *et al.*, 1990) und die Niere (Schneeberger *et al.*, 1989). Vor allem aber liegen Beobachtungen am Herzen vor (Bolli *et al.*, 1989; Schaper, 1992). Für derartige Schädigungen wurde die Bezeichnung „Reperfusionsschaden“ geprägt.

Ischämie und Reperfusion sind konsekutive Ereignisse, die in der Transplantationsmedizin, der Herz- und Gefäßchirurgie, bei Katheterangioplastie und Thrombolyse-therapie Bedeutung haben. Sie können auch spontan auftreten, vor allem bei Koronarspasmen und in Form transitorischer Gefäßverschlüsse (Sabia *et al.*, 1992).

Um die im Rahmen von Revaskularisierungs-Maßnahmen beim Menschen in kurativer Absicht herbeigeführte Reperfusion zu rechtfertigen, muss das Risiko einer zusätzlichen Schädigung in einem vertretbaren Verhältnis zum therapeutischen Nutzen der Maßnahme stehen. Bei einem lebenswichtigen Organ wie dem Herzen sollte eine Revaskularisierung daher primär bei symptomatischen Patienten mit Ischämienachweis erfolgen oder bei Personen, deren Koronarmorphologie darauf hinweist, dass ein Koronarverschluss deletäre Folgen hätte.

Es ist sowohl experimentell als auch klinisch problematisch, eine Schädigung durch Reperfusion von ischämiebedingten Schäden zu unterscheiden, da per se Reperfusion ohne vorangegangene Ischämie nicht auftritt. Fraglich bleibt, ob es sich beim Reperfusionsschaden um ein eigenes Schädigungsprinzip handelt oder ob die während der Ischämie initiierten gewebezerstörenden Prozesse fortgesetzt, verstärkt und beschleunigt werden (Maxwell und Lip, 1997).

1.3.1 Pathophysiologie des kardialen Reperfusionsschadens

1.3.1.1 Strukturschäden und Funktionsschäden

Der kardiale Reperfusionsschaden manifestiert sich in morphologischen und funktionellen Veränderungen. Bei Strukturschäden wie Zellschwellungen, Nekrosen und Membranläsionen lässt sich das ischämiebedingte Ausmaß der Schädigung nekrotisch exakt von dem Zustand nach Reperfusion differenzieren (Braunwald und Kloner, 1985; Jennings und Yellon, 1992; Hoshida *et al.*, 1993). Experimentell ist der funktionelle Reperfusionsschaden schwieriger zu erfassen, da die Wiederherstellung des Blutflusses zum Wiedererlangen der Herzfunktion notwendige Voraussetzung ist.

Es lassen sich drei funktionelle Auswirkungen unterscheiden (Heyndrickx *et al.*, 1975; Vaage und Valen, 1993):

1. Verstärktes Auftreten von Arrhythmien.
2. Myokardiales „stunning“ (nach Braunwald und Kloner 1985, definiert als voll reversible post-ischämische Dysfunktion des Herzens bei wiederhergestellter Durchblutung).

3. „No-reflow“- und „low-reflow“-Phänomen oder mikrovaskuläres „stunning“ (definiert als mikrovaskuläre Funktionsstörung, die sich in einem fehlenden Fluss nach Beseitigung der Ischämie-induzierten Ursache äußert).

Kurze Ischämiephasen können nach Reperfusion längerfristig die kontraktile Funktion einschränken, ohne dass dabei irreversible Zellschäden entstehen. Dieser funktionelle Schaden (myokardiales „stunning“) kann innerhalb von 24 bis 72 Stunden vollständig reversibel sein (Park und Lucchesi, 1999). Die Geschwindigkeit, mit der sich die kontraktile Funktion in der Reperfusion erholt, ist dabei vom Schweregrad und der Dauer der Minderperfusion während der vorangegangenen Ischämie abhängig (Bolli, 1990). Zur Zeit werden zwei Hypothesen zur Entstehung des myokardialen „stunnings“ diskutiert: die Bildung freier Radikale und die Überladung der Kardiomyozyten mit Kalziumionen, wobei beide Pathomechanismen sich nicht ausschließen, sondern möglicherweise nur zwei verschiedene Aspekte desselben Geschehens sind (Bolli und Marban, 1999).

Klinisch spielen Funktionsstörungen im Zusammenhang mit Ischämie und Reperfusion besonders bei Hochrisikopatienten eine bedeutende Rolle, da es sich im Gegensatz zur Myokardnekrose um interventionell effektiv beeinflussbare Phänomene handelt. Ischämische Ereignisse können das gesamte Herz oder einzelne, einem verschlossenen Gefäß nachgeschaltete Areale des Gewebes betreffen. Nicht immer korrelieren Größe des betroffenen Gewebeanteils und quantitative Auswirkung auf die Pumpfunktion miteinander. Schon kleinflächige Schäden am Erregungsleitungssystem können globale Kontraktionsprobleme auslösen, während einem Ausfall größerer Myokardareale nicht unbedingt Störungen der Wandbewegung folgen müssen.

Die Mehrzahl der bisherigen experimentellen Untersuchungen zur Reperfusion weist bei Wiederdurchblutung der Gefäße trotz Beseitigung des Flusshindernisses keine adäquate Wiederherstellung der Perfusion im post-ischämischen Gewebe auf (Kloner und Przyklenk, 1993; Vaage und Valen, 1993). Die Koronarperfusion ist nach einer initialen Phase der reaktiven Hyperämie verringert. Für dieses Phänomen des „no-reflow“ bzw. „low-reflow“ trotz freier Gefäßlumina gibt es zwei Theorien. Die Flussminderung wird auf Permeabilitätsdefekte sowie auf regulatorische

Dysfunktionen des Endothels mit Auswirkung auf den Gefäßtonus (Bolli *et al.*, 1990) oder auf die Kapillarobstruktion durch Leukozyten (Schmid-Schoenbein, 1987) zurückgeführt.

Mit Reperfusionbeginn werden Blutzellen ins ischämische Gewebe transportiert. Dabei nimmt das Vorkommen kurzlebiger, hochreaktiver Radikale extrem zu (Kukreja und Hess, 1992; Gross *et al.*, 1999). Diese Radikale triggern proinflammatorische Prozesse, welche maßgeblich durch zelluläre Blutbestandteile vermittelt werden (McCord, 1987). Unter diesen Bedingungen wird die Anhaftung von Leukozyten an das Endothel mittels spezifischer Oberflächenmoleküle – so genannten Adhäsionsmolekülen – häufiger beobachtet. Es folgt ein erleichtertes Verlassen der Blutbahn und die Migration der Zellen ins perivaskuläre Gewebe (Shatos *et al.*, 1991; Palluy *et al.*, 1992; Jordan *et al.*, 1999). Diese aktivierten und aus der Blutbahn migrierenden Zellen sind selber in hohem Maße befähigt, reaktive Sauerstoffspezies (ROS) zu bilden und in das umliegende Gewebe freizusetzen (Becker, 1993). Damit sind die Leukozyten in der Lage, den inflammatorischen Prozess autonom zu unterhalten und zu verstärken. Der Aktivierung und Adhäsion von PMNs wird in diesem Zusammenhang eine Schlüsselrolle bei der Ausweitung der Gewebeschädigung zugeschrieben. Dies führt auch zur Einbeziehung sowohl weiterer Blutzellen, wie Monozyten und Thrombozyten, als auch weiterer Systeme im Sinne der Komplementaktivierung, Zytokinausschüttung, Leukotrienbildung und prothrombotischen Veränderungen des Gerinnungsstatus (Hill, 1998; Park und Lucchesi, 1999; Becker *et al.*, 2000). Die Bedeutung einige dieser einzelnen Systeme in der Entstehung eines Reperfusionsschadens soll im Folgenden näher betrachtet werden.

1.3.1.2 Bedeutung der Radikale

Die Ursachen der post-ischämischen Reperfusionsschäden sind nicht geklärt. Dennoch ist es sehr wahrscheinlich, dass hierbei reaktive Sauerstoffverbindungen eine wichtige Rolle spielen (Granger, 1988; Ambrosio und Tritto, 1999). Bedingt durch ihre Elektronenkonfiguration weisen Radikale im Allgemeinen eine hohe chemische Reaktivität auf. Unter physiologischen Bedingungen gebildet, werden sie von endogenen Schutzmechanismen (Superoxiddismutase, Katalase, Glutathionperoxidase), aber auch von Antioxidantien (α -Tocopherol, β -Carotin, Ascorbinsäure) abgefangen.

Ist das Gleichgewicht zwischen Radikalbildung und -abbau gestört, kommt es *in vitro* und *in vivo* durch oxidativen Stress zu Radikal-bedingten Schäden (Blasig *et al.*, 1996). Beispielsweise können Radikale durch Interaktion mit Desoxyribonukleinsäure DNS-Strangbrüche oder durch Lipidperoxidation Zellmembranschädigungen hervorrufen und somit zum Zelluntergang beitragen (Kellog, 1975). Dabei führen Veränderungen von Enzymproteinen zu Störungen der vaskulären Permeabilität, der zellulären Kalziumhomöostase oder zu elektrophysiologischen Störungen.

Des Weiteren oxidieren Radikale im Blut zirkulierendes LDL zu einem proarteriogenen Produkt und inaktivieren das vom Endothel gebildete Stickstoffmonoxid (NO), wodurch die Endothel-vermittelte Koronardilatation und Hemmung der Plättchenaggregation abgeschwächt wird (Gryglewski *et al.*, 1986; Carr *et al.*, 2000). Ferner induzieren Radikale die Freisetzung verschiedener Entzündungsmediatoren aus dem Endothel sowie die Expression von spezifischen endothelialen Adhäsionsmolekülen und verstärken somit einen Entzündungsprozess in einem ischämischen Gebiet (Petrone *et al.*, 1980; Galino *et al.*, 1996).

Im reperfundierten Gewebe kommen ursächlich sowohl eine verstärkte Radikalproduktion als auch ein Mangel bzw. Defekt der Schutzfaktoren in Betracht (Kirschenbaum und Signal, 1992; Lu *et al.*, 1993; Zweier *et al.*, 1994).

Eine Verknüpfung zwischen reaktiven Sauerstoffspezies und dem Auftreten von Reperfusionsschäden ergibt sich aus mehreren Gründen:

1. Im Herzen können unmittelbar mit dem Beginn einer Reperfusion freie Radikale direkt nachgewiesen werden (Zweier *et al.*, 1987; Gross *et al.*, 1999).
2. Das Erscheinen von Lipid-Peroxidationsprodukten weist indirekt auf eine Radikalentstehung hin.
3. Durch exogene Zufuhr radikalbildender Systeme gelingt es, gleichartige Schäden am Herzen hervorzurufen.
4. Antioxidative Maßnahmen haben sich sowohl experimentell als auch klinisch vielfach als benefiziell erwiesen (Kukreja und Hess, 1992; Miwa *et al.*, 1999; Dhalla *et al.*, 2000).
5. Katalase- und Superoxiddismutase-überexprimierende transgene Mäuse wiesen eine verbesserte post-ischämische Kontraktionskraft auf und bestätigten somit den kardioprotektiven Effekt durch Antioxidantien (Chen *et al.*, 1998; Woo *et al.*, 1998).

Die schnelle Freisetzung kurzlebiger, oxidativer Radikale in der initialen Phase einer Reperfusion wird „oxidative burst“ genannt und findet unter Sauerstoff-Antransport nahezu ubiquitär statt (Jeroudi *et al.*, 1994). Bei der Wiederezufuhr von Sauerstoff während der Reperfusion kommt es zu einem erhöhten Substratangebot durch angestaute Katecholamine, Arachidonsäureprodukte und Purine, so dass in den ersten Minuten der Reperfusion physiologische enzymatische Prozesse verstärkt ablaufen. Hierzu gehören die mitochondriale Atmungskette und Monoaminoxidase-, Cyclooxygenase- und Xanthinoxidase-katalysierte Umsetzungen.

Eine besonders wichtige Quelle der Radikalbildung stellen zusätzlich am Koronarendothel adhärierende oder bereits ins Gewebe emigrierte Granulozyten dar. Bei der oxidativen „burst“-Reaktion durch aktivierte Granulozyten kann innerhalb kürzester Zeit eine massive Bildung reaktiver Sauerstoffspezies erfolgen. Dabei wird durch das Enzym NADPH-Oxidase zunächst das Superoxidanion ($\cdot\text{O}_2^-$) gebildet. Durch sekundäre Prozesse entstehen weitere Sauerstoffradikalprodukte, die zum Teil noch reaktionsfähiger sind (Steinbeck *et al.*, 1992): Zum Beispiel erfolgt unter

Beteiligung leukozytärer und myokardialer Superoxiddismutasen (SOD) die Umwandlung in Wasserstoffperoxid (H_2O_2). Die Myeloperoxidase (MPO) katalysiert dagegen die Bildung von Hydroxylradikalen (OH^\cdot) und hypochloriger Säure bzw. Hypochlorit ($HOCl/OCl^-$). Neben den Sauerstoffradikalen ($^{\cdot}O_2^-$, OH^\cdot) sind also grundsätzlich auch oxidierende Derivate (H_2O_2 , $HOCl$, OCl^-) bei der Entstehung post-ischämischer Reperfusionsschäden zu berücksichtigen (Granger, 1988).

1.3.1.3 Bedeutung der Zytokine

Zytokine induzieren oder supprimieren die zelluläre Chemotaxis und Proliferation sowie die Freisetzung weiterer Transmitter. Zu den proinflammatorisch wirksamen Zytokinen gehören der Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α) und verschiedene Interleukine (IL) wie beispielsweise IL-1 β , IL-6 und IL-8. Sie sind zentrale Mediatoren der natürlichen Immunabwehr. Ihre Freisetzung erfolgt aus Immunzellen oder Endothelzellen. Auslöser sind gewebeschädigende Noxen wie Hypoxie, Traumata oder Bakterientoxine (Barnes und Karin, 1997).

In den letzten Jahren haben Zytokine im Zusammenhang mit koronaren Herzkrankheiten zunehmend an Aufmerksamkeit gewonnen. Neben einer Rolle als prognostische Marker sieht man sie auch als Mitverursacher dieser Erkrankungen an. In einer Reihe kardiovaskulärer Erkrankungen werden Zytokine erhöht im Blut nachgewiesen: beim akuten Koronarsyndrom mit Herzinfarkt (Ridker *et al.*, 2000) und instabiler Angina pectoris (Biasucci *et al.*, 1996), bei der akuten Myokarditis (Matsumori, 1996), der stabilen Angina pectoris (Ikonomidis *et al.*, 1999) und in der Herzinsuffizienz (Torre-Amione *et al.*, 1993).

Bereits vor über 30 Jahren ist eine kontraktilitätshemmende Wirkung von Entzündungsmediatoren auf das Herz festgestellt (Solis und Downing, 1966) und in späteren Untersuchungen bestätigt worden (Guntheroth *et al.*, 1982). Mittlerweile gilt als gesichert, dass TNF- α und IL-1 β kardiodepressive Wirkungen entfalten. Sowohl *in-vitro*- als auch *in-vivo*-Untersuchungen konnten pathophysiologische Phänomene verschiedener kardiovaskulärer Erkrankungen durch Zytokin-Gabe induzieren. Die kontraktilitätshemmende Wirkung konnte für TNF- α beispielsweise an isolierten Rattenmyozyten (Stein *et al.*, 1996) und am Hamsterkapillarmuskel (Finkel *et al.*,

1992) gezeigt werden. Ebenso wurde in isoliert-perfundierten Katzenherzen wie auch bei Hunden *in vivo* eine negativ inotrope Wirkung von TNF- α festgestellt (Yokoyama *et al.*, 1993; Pagani *et al.*, 1992).

TNF- α scheint jedoch nicht nur als Immunzellmediator mit endokriner Wirkung zu agieren, sondern auch über para- oder autokrine Mechanismen kardiodepressiv zu wirken. So stimuliert TNF- α die Freisetzung weiterer proinflammatorischer Zytokine wie zum Beispiel IL-6 aus Kardiomyozyten, welches mit TNF- α synergistisch wirkt (Dinarello, 2000). Hinsichtlich der kardiodepressiven Wirkung von TNF- α wird zwischen akuten und chronischen Effekten unterschieden. Neben einer direkt zytotoxischen Wirkung entfaltet TNF- α akut negativ inotrope Effekte über eine vermehrte Synthese von Sphingosin. Dieses führt zu einer verminderten Kalzium-Freisetzung in Kardiomyozyten (Oral *et al.*, 1997). Es wird vermutet, dass die chronischen Effekte von TNF- α über die Stimulation der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) vermittelt sind. Danach sollen über einen cGMP-Mechanismus Myofilamente gegen Kalzium desensibilisiert werden (Finkel *et al.*, 1992). Die Wirkung von TNF- α auf das Herz beschränkt sich jedoch nicht allein auf die Kardiodepression. Experimentelle Daten belegen ein – potenziell günstiges – antiarrhythmisches und trophisches Potential von TNF- α an Kardiomyozyten sowie eine protektive Wirkung bei Ischämie (Kurrelmeyer *et al.*, 2000).

Für das Zytokin IL-1 β sind ähnliche Beobachtungen beschrieben worden. Es senkt die kardiale Kontraktionskraft im isoliert-perfundierten Rattenherzen (Hosenpud *et al.*, 1989), im isolierten Papillarmuskel (Evans *et al.*, 1993) und in isolierten Kardiomyozyten (Weisensee *et al.*, 1993; Stein *et al.*, 1996). Auch in diesem Fall ist die akute kardiodepressive Wirkung NO-vermittelt. Darüber hinaus scheinen Kalzium-regulierende Gene herunterreguliert zu werden. Der Mechanismus des chronischen IL-1 β -Effektes ist dagegen noch nicht geklärt.

1.3.1.4 Transmigration neutrophiler Granulozyten

Die Anhaftung neutrophiler Granulozyten – auch polymorphkernige Neutrophile (PMNs) genannt – an das reperfundierte Gefäßendothel und die darauffolgende Transmigration durch das Endothel erfolgt mehrstufig. Sie führt über die Ausschüttung von Enzymen (Elastase, Kollagenase) und reaktiven Sauerstoffspezies zu einer Gewebeerstörung (Entman und Smith, 1994; Jordan *et al.*, 1999).

Der Vorgang der PMN-Transmigration wird durch die Zytokin-induzierte Expression von spezifischen Adhäsionsmolekülen vermittelt. Dabei werden die PMNs zunächst durch Chemotaxis an den Ort des ischämischen Geschehens gelockt. Ein chemischer Stimulus bestimmt die Wanderungsrichtung der Zellen in Abhängigkeit von einem Konzentrationsgradienten der reizauslösenden Substanz. Zu den potenten Chemokinen gehören proinflammatorische Faktoren. Diese können beispielsweise über das Blut in das betroffene Gewebeareal gelangen [Leukotriene-B₄ (LTB₄), Plättchen-aktivierender Faktor (PAF), Komplementfaktoren (C3a, C5a)]. Sie können aber auch vom aktivierten Endothel selbst freigesetzt werden (IL-1 β , IL-6, TNF- α , ROS). Eine Zellaktivierung führt zur Hochregulation von Adhäsionsmolekülen. Relevante Adhäsions-vermittelnde Oberflächenmoleküle auf PMNs und Endothelzellen sind die so genannten Integrine, Selektine und Moleküle der Immunglobulinsuperfamilie (Massberg *et al.*, 1998). Im Speziellen werden nach Aktivierung auf den Zelloberflächen der PMNs L-Selektin und CD11/CD18 – auch LFA-1 und Mac-1 genannt – vermehrt exprimiert. Endothelzellen dagegen weisen eine vermehrte Expression von E-Selektin, P-Selektin, „vascular-cell-adhesion-molecule-1“ (VCAM-1) und „inter-cellular-adhesion-molecule-1“ (ICAM-1) auf (Larsen *et al.*, 1989; Kukreti *et al.*, 1997).

Wenn die Zellen den Ort des ischämischen Geschehens erreicht haben, beginnt ein Vorgang, der Rollen genannt wird. Hierbei wandern die Zellen entlang des Endothels, wobei ihre Geschwindigkeit gegenüber nicht-aktivierten Zellen deutlich herabgesetzt ist (Ley, 1993). Die Hochregulation des L-Selektins auf der Oberfläche von Neutrophilen und des P-Selektins auf der Oberfläche des Endothels ermöglicht dabei die transiente leukozytäre endotheliale Interaktion. Durch den Kontakt zum Endothel erfolgt eine erneute Stimulation der PMNs, die das Abspalten des L-Selektins von ihrer Oberfläche („L-Selektin-shedding“) und eine vermehrte

Expression von β_2 -Integrinen (CD11/CD18) induziert. Letztere verstärken durch Interaktion zum endothelialen E-Selektin und ICAM-1 den Zellkontakt, so dass es zu einer festen Bindung kommt (Rothlein *et al.*, 1986). Der Integrin-vermittelte Zellkontakt ermöglicht in einem weiteren Schritt den Übertritt der PMNs in das Interstitium.

1.3.1.5 Bedeutung der endothelialen Stickstoffmonoxidsynthase

Das Endothel ist jene Zellschicht, die die Arterien von innen auskleidet. Es stellt nicht allein eine passive Permeabilitätsbarriere dar, sondern greift aktiv in die Regulation des Gefäßtonus ein, indem es sowohl vasokonstriktorisches (Endothelin-1, Thromboxan A_2 , Angiotensin II) als auch vasodilatatorische Stoffe (NO, Prostacyclin, Bradykinin) bildet. Im Jahr 1980 beschrieben Furchgott und Zawadzki, dass eine Reihe von Substanzen nur in Anwesenheit eines intakten Endothels vasodilatierend wirkt. Sie postulierten eine vom Endothel freigesetzte Substanz, die sie „endothelium derived relaxing factor“ (EDRF) nannten. Heute ist bekannt, dass die sehr kurzlebige Substanz mit NO identisch ist und als Botenstoff an der Vermittlung der wichtigsten Endothelfunktionen beteiligt ist (Palmer *et al.*, 1987).

Die NO-Freisetzung aus dem Endothel erfolgt durch Aktivierung der konstitutiv exprimierten endothelialen NO-Synthase (eNOS, Typ III). Dieses Enzym oxidiert die Aminosäure L-Arginin zu L-Citrullin und bildet dabei NO (Moncada und Higgs, 1993). Die Aktivität der eNOS kann infolge neurohormonaler Faktoren wie erhöhte Katecholamin-, Vasopressin- oder Bradykininspiegel gesteigert werden (Boulanger und Vanhoutte, 1997). Die eNOS-Expression hingegen wird beispielsweise durch Scherkräfte oder Östrogene erhöht (Foersterman und Kleinert, 1995).

NO gilt als einer der potentesten relaxierenden Stoffe, der über die Stimulation der löslichen Guanylatcyclase (sGC) der glatten Muskelzellen mit konsekutiver cGMP-Erhöpfung zur Vasodilatation führt (Rapoport *et al.*, 1983; Murad, 1994). Darüber hinaus hemmt NO die Plättchenaggregation, die Proliferation von glatten Muskelzellen und besitzt über einen cGMP-unabhängigen Mechanismus antiapoptotische und antiinflammatorische Eigenschaften (Andrew und Mayer, 1999). Dabei hemmt NO die Oxidation von LDL sowie die Expression von Adhäsionsmolekülen und verhindert somit das Anhaften weißer Blutkörperchen an

das Endothel. Die Reaktivität von NO mit Superoxidanionen stellt eine klinisch ebenso relevante Schattenseite des kurzlebigen Moleküls dar, da hierbei zytotoxische Spezies wie Peroxynitrit (ONOO^-) entstehen (Beckman, 1990).

Neben der eNOS existieren noch zwei weitere NO-produzierende Enzyme: die neuronale NOS (nNOS, Typ I) und die induzierbare NOS (iNOS, Typ II). Die nNOS wird vorwiegend in Neuronen konstitutiv exprimiert, während die in Makrophagen und vielen anderen Zellen exprimierte iNOS durch Zytokine induziert wird. Allen drei NOS-Isoformen gemeinsam ist die Verwendung von L-Arginin als Substrat. Dementsprechend werden sie auch durch L-Arginin-Analoga wie N^ω -Nitro-L-Arginin-Methylester (L-NAME) gehemmt.

Die konstitutiven NO-Synthasen eNOS und nNOS sowie die induzierbare NO-Synthase iNOS sind Proteine, deren Aminosäuresequenz nur zu 52–58% übereinstimmt. Zwischen den Säugetierspezies sind die Aminosäuresequenzen hochkonserviert. Für die eNOS und nNOS bestehen Sequenzhomologien von über 90% und für die iNOS von über 80% (Foerstermann und Kleinert, 1995). Aus diesen Befunden kann ein erheblicher Nutzen gezogen werden. Die fast vollständige Übereinstimmung im Enzymaufbau zwischen den Säugetierspezies erlaubt Rückschlüsse vom Tiermodell auf den Menschen. Außerdem ermöglichen die unterschiedlichen Molekülstrukturen die Synthese hochselektiver Aktivatoren bzw. Inhibitoren der verschiedenen NO-Synthase-Isoenzyme. Zur Zeit stehen solche Inhibitoren allerdings noch nicht mit ausreichender Selektivität zur Verfügung.

Die Verwendung von relativ selektiven L-Arginin-Analoga zur Blockade der NO-Produktion ermöglicht nur eine bedingte Aussage über die physiologische Bedeutung der drei NOS-Isoformen. Erst die Entwicklung von NOS-defizienten Mäusen verbesserte das Verständnis der Funktion dieser Isoenzyme. Huang *et al.* entwickelten 1995 erstmals eNOS-Knock-out-Mäuse. Diese Mäuse weisen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen einen erhöhten basalen Gefäßtonus und einen erhöhten Blutdruck auf. Die Gabe des endothelabhängigen Vasodilatators Acetylcholin führte paradoxerweise zu einer verstärkten Gefäßverengung. Die Autoren schlussfolgerten, dass möglicherweise eine gestörte Endothelfunktion bei

arterieller Hypertonie zu einem erhöhten peripheren Widerstand und zu Gefäßkomplikationen dieser Erkrankungen beitragen.

Nachdem in unterschiedlichen tierexperimentellen Studien eine kardioprotektive Wirkung durch Gabe von Nitrovasodilatoren beschrieben wurde (Lefer *et al.*, 1993b; Pabla *et al.*, 1995), machten sich Lefer *et al.* (1999b) die eNOS-Knock-out-Maus zu Nutze, um die Rolle von endotheliale NO bei der Interaktion zwischen Leukozyten und Endothelzellen an der Arteria mesenterialis zu untersuchen. Im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen wiesen die eNOS-Knock-out-Mäuse neben einer erhöhten P-Selektin-Expression ein vermehrtes Rollen und Anhaften von Neutrophilen an das Endothel auf. Darüber hinaus beobachteten die Autoren eine deutlich erhöhte Transmigration von Neutrophilen nach Injektion eines proinflammatorischen Stimulus. Die Ergebnisse von Lefer *et al.* unterstreichen, dass dem endothelialen NO eine entscheidende Rolle zur Erhaltung der vaskulären Homöostase zugeschrieben werden muss.

1.3.1.6 Bedeutung der endothelialen Dysfunktion

Die Störung der endothelialen Funktion spielt eine Schlüsselrolle in der Pathogenese kardiovaskulärer Erkrankungen. So können sich Arteriosklerose, Hypertonie, Thrombosen und Vasospasmen auf der Grundlage einer gestörten Endothelfunktion entwickeln. Endothelschädigend sind, wie bereits aufgeführt, alle kardiovaskulären Risikofaktoren (Cooke und Dzau, 1997). Bei Patienten mit kardiovaskulären Risikofaktoren, bei denen eine endotheliale Dysfunktion nachweisbar ist, treten häufiger Herzinfarkte, Schlaganfälle und andere Herz-Kreislauf-Ereignisse auf als bei Patienten mit denselben Risikofaktoren, aber mit intaktem Endothel (Schächinger *et al.*, 2000). Die endotheliale Dysfunktion ist jedoch nicht nur Mitursache multifaktorieller kardiovaskulärer Erkrankungen, sondern häufig auch deren Folge, so dass sich differenzierte pathophysiologische Wechselwirkungen ergeben (Harrison, 1997). Daher nimmt die endotheliale Dysfunktion bei der Entstehung eines Reperfusionsschadens ebenfalls eine Schlüsselrolle ein (Lefer *et al.*, 1991).

Störungen der Endothelfunktion sind durch eine verminderte NO-Bioverfügbarkeit charakterisiert. Diese scheint nach derzeitigem Kenntnisstand Folge einer

verstärkten Inaktivierung durch Sauerstoffradikale und nicht durch eine Funktionsstörung der NO-Synthase bedingt zu sein (Ohara *et al.*, 1993). Die Beobachtung, dass arteriosklerotische Gefäße paradoxerweise erhöhte NO-Spiegel aufweisen, bestärkt diese Theorie. Denn sie weist darauf hin, dass es in der arteriosklerotischen Plaque zu einer vorzeitigen Inaktivierung von NO bei gleichzeitig erhöhter Synthese durch vermehrt vorhandene Sauerstoffradikale und oxidiertes LDL kommt (Wilkins und Leake, 1990). Diese Beobachtungen unterstreichen zusätzlich, dass die Balance zwischen endothelalem NO und Sauerstoffradikalen für die funktionelle Integrität des Endothels entscheidend ist.

Die große pathophysiologische Bedeutung einer gestörten Endothelfunktion ergibt sich aus den beschriebenen physiologischen Funktionen des endothelialen NO-Systems. Eine gestörte Endothelfunktion führt aber auch zu einer Freisetzung des chemotaktischen Proteins („monocyte-chemoattractant-protein-1“, MCP-1) aus Endothelzellen und glatten Gefäßmuskelzellen. Ferner kommt es zur endothelialen Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen (IL-6, TNF- α) und zur vermehrten Expression spezifischer Adhäsionsmoleküle (E-Selektin, L-Selektin, Mac-1).

Die Verminderung der endothelabhängigen Gefäßdilatation ist ein sehr frühes Zeichen einer endothelialen Dysfunktion. Sie stellt eine nachweisbare Veränderung des Endothels dar, die dem Entstehen der Arteriosklerose meistens vorausgeht (Drexler, 1997). Sie lässt sich experimentell mittels Bestimmung der so genannten reaktiven Hyperämieantwort feststellen. Hierbei wird durch eine Hemmung des oxidativen Stoffwechsels des Myokards eine Dilatation der Koronararterien mit einer entsprechenden Steigerung des Koronarflusses hervorgerufen (Hilton und Eichholtz; 1925). Nach Reperfusion steigt der Koronarfluss weit über das Ausgangsniveau an und normalisiert sich innerhalb weniger Sekunden wieder. Zur Bestimmung der reaktiven Hyperämie bei Patienten kann, mittels intrakoronarer Doppler-Flussmethode nach vorheriger Stauung, die Steigerung des Unterarm-Blutflusses bestimmt werden oder invasiv die Gefäßantwort nach intrakoronarer Acetylcholin-Gabe. Acetylcholin führt zu einer Rezeptor-vermittelten Freisetzung von endothelalem NO und somit zu einer Gefäßerweiterung. Bei einem dysfunktionellen

Endothel vermittelt Acetylcholin über Rezeptoren an der glatten Muskulatur eine Gefäßverengung (Zeiber *et al.*, 1993).

Neuere klinische Ansätze deuten darauf hin, dass eine endotheliale Dysfunktion therapeutisch reversibel sein kann (Celemajer, 1997). Daher kommt einer gestörten endothelialen Funktion eine erhebliche diagnostische, therapeutische und gegebenenfalls auch prognostische Bedeutung zu.

1.4 THERAPIE-OPTION: HMG-COA-REDUKTASE-HEMMER

Die HMG-CoA-Reduktase-Hemmer (Statine) sind als potente Hemmer des Cholesterolsynthese-Enzyms (CSE) in die Therapie kardiovaskulärer Erkrankungen eingeführt worden. In einem frühen Schritt der Cholesterolsynthese blockieren sie die Umwandlung des 3-Hydroxymethyl-Glutaryl-Coenzym A in Mevalonat durch die HMG-CoA-Reduktase und senken dadurch einen erhöhten Cholesterol-Blutspiegel. Statine zeichnen sich durch Strukturanalogie zu HMG-CoA aus. Mit Mevastatin und Lovastatin, zwei Naturprodukten aus einem *Penicillium*-Pilz bzw. dem Pilz *Aspergillus terreus*, konnte erstmals dieses Therapieprinzip genutzt werden. Simvastatin und Pravastatin sind Molekülvariationen des Lovastatins, die biotechnologisch hergestellt werden. Fluvastatin und Atorvastatin werden vollsynthetisch produziert.

1.4.1 HMG-CoA-Reduktase-Hemmer und ihre pleiotropen Wirkungen

Zunehmend zeigt sich, dass Statine ihre positiven Wirkungen auf das Herz-Kreislauf-System auch durch cholesterolunabhängige Mechanismen entfalten. Man spricht in diesem Zusammenhang von pleiotropen Wirkungen. Zum Beispiel war in angiographisch kontrollierten Regressionsstudien mit Statinen die Reduktion der kardialen Ereignisse viel ausgeprägter als die morphologischen Veränderungen an den Koronarstenosen (Brown *et al.*, 1993 & 1995; Jukema *et al.*, 1995). Weitere klinische Studien zeigten, dass eine Statin-Gabe auch bei Probanden mit normalen Cholesterolspiegeln zur Reduzierung kardiovaskulärer Ereignisse führt (Sacks *et al.*, 1996; Dows *et al.*, 1998). Den Statinen werden vor allem eine Verbesserung der

Endothelfunktion, antithrombotische, antiinflammatorische und antioxidative Effekte, eine Hemmung der Zellproliferation und eine Stabilisierung der arteriosklerotischen Plaques nachgesagt (Takemoto und Liao, 2001). Es würde den Rahmen dieser Einleitung sprengen, jede der cholesterolumabhängigen Wirkungen im Detail zu diskutieren. Im Folgenden sollen daher nur die Wirkungen der Statine auf die Endothelfunktion und deren antiinflammatorische Effekte vorgestellt werden.

Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* konnte eine Verbesserung der Endothelfunktion durch die Gabe von verschiedenen Statinen nachgewiesen werden. Laufs *et al.* zeigten in *in-vitro-Studien*, dass eine Statin-Inkubation die in kultivierten hypoxischen Endothelzellen verminderte NO-Bildung wieder aufhebt. Sie führten diese Beobachtung auf eine erhöhte Halbwertszeit der eNOS-mRNA zurück. Ein wesentlicher Mechanismus scheint dabei die Stabilisierung der eNOS-mRNA zu sein. Die gleiche Gruppe konnte 1998 zeigen, dass oxidiertes LDL die Menge an eNOS-mRNA und eNOS-Protein in kultivierten Endothelzellen vermindert. Dies konnte ebenfalls durch die Gabe von Statinen verhindert werden. Dabei wiesen die Autoren nach, dass die Statine die eNOS-mRNA zwar stabilisierten, jedoch keinen Einfluss auf die eNOS-Gentranskription hatten (Laufs *et al.*, 1997 und 1998). In klinischen Studien führte die Gabe von Statinen bei hypercholesterolämischen Probanden ebenfalls zu einer verbesserten Endothelfunktion (Tamai *et al.*, 1997; Dupuis *et al.*, 1999).

Weiterhin wirken Statine antiinflammatorisch. So wurde das bei Entzündungsprozessen verstärkt auftretende C-reaktive Protein (CRP) in klinischen Studien unter der Medikation mit Statinen signifikant gesenkt (Strandberg *et al.*, 1999). Neben den bekannten Risikofaktoren der KHK hat sich das CRP als unabhängiger Risikofaktor herauskristallisiert. Aktuelle klinische Studien deuten darauf hin, dass dieses Protein die Arteriogenese und die akute Plaqueruptur entscheidend mitbeeinflusst (Ridker *et al.*, 2001).

1.4.2 Simvastatin und der Reperfusionsschaden

Die Wirkung der Statine auf die Entstehung eines Reperfusionsschaden ist in der Vergangenheit tierexperimentell mehrfach untersucht worden. Das hierbei am besten charakterisierte Statin ist Simvastatin. Beispielsweise wiesen Endres *et al.* (1998) nach einer Simvastatin-Behandlung eine Verbesserung des zerebralen Blutflusses und eine Reduzierung der Infarktgröße in Mäusen nach. Die fehlende therapeutische Wirkung des Statins bei eNOS-Knock-out-Mäusen ließ die Autoren darauf schließen, dass die Wirkung des HMG-CoA-Reduktase-Hemmers NO vermittelt ist.

In einem Modell des PMN-induzierten Reperfusionsschadens mit isoliert-perfundierten Rattenherzen beobachteten Lefer *et al.* (1999a) nach akuter Simvastatin-Behandlung eine Verminderung des Reperfusionsschadens. Ihre Beobachtungen gewannen durch die *in-vivo-Untersuchung* von Pruefer *et al.* (1999) an Bedeutung. Mittels Intravital-Mikroskopie wiesen die Autoren eine verminderte endotheliale leukozytäre Interaktion im Mesenterium von Simvastatin-vorbehandelten Ratten nach. Das Rollen, Anhaften und die Transmigration von Neutrophilen durch das Endothel waren reduziert. Scalia *et al.* (2001) machten ähnliche Beobachtungen bei Mäusen, die mit Simvastatin behandelt worden waren. In einem *in vivo*-Modell wiesen die Simvastatin-behandelten Mäuse nach einer 30-minütigen Ischämie eine erhöhte NO-Freisetzung durch das Endothel auf. Mikroskopische und molekularbiologische Untersuchungen der Herzen zeigten eine deutlich verminderte Akkumulation von Neutrophilen im ischämischen Areal und eine erhöhte eNOS-mRNA-Expression im Vergleich zu den Placebo-behandelten Tieren. Die Autoren kamen zu der Schlussfolgerung, dass Simvastatin über einen NO-abhängigen Mechanismus die Interaktion zwischen Endothelzellen und Neutrophilen vermindert und somit einen durch Neutrophilen-induzierten Reperfusionsschaden reduziert.

Unter Berücksichtigung dieser Datenlage verwendeten wir in einem Modell des isoliert-perfundierten Rattenherzens den HMG-CoA-Reduktase-Hemmer Simvastatin als Positivkontrolle für einen NO-abhängigen Wirkungsmechanismus.

1.5 DAS ISOLIERT-PERFUNDIERTE RATTENHERZ NACH LANGENDORFF

Das in der vorliegenden Arbeit verwendete experimentelle Modell des isoliert-perfundierten Herzens nach Langendorff hat sich seit rund 100 Jahren sowohl in der Grundlagen- als auch der angewandten Forschung bewährt. Es ist standardisierbar und liefert folglich gut reproduzierbare Ergebnisse. Die meisten Warmblüterherzen können hierbei eingesetzt werden, jedoch ist die experimentelle Verwendung isoliert-perfundierter Rattenherzen am besten charakterisiert (Galinares und Hearse, 1990). Die Methode ermöglicht sowohl die mechanistische als auch die pharmakologische Untersuchung potenzieller Arzneistoffe auf die kontraktile und vaskuläre Funktion des Herzens. Dabei werden schlagende Herzen ohne die neurohormonale Regulation des Organismus untersucht (Ytrehus, 2000).

Das verwendete saline Perfusat ist in Elektrolytzusammensetzung, Temperatur, pH-Wert und Gassättigung so optimiert, dass die Herzen zwei bis drei Stunden lang ohne größere Funktionsbeeinträchtigung schlagen können (Sutherland und Hearse; 2000). Durch die Verwendung saliner Nährlösungen wird der Einfluss humoraler und zellulärer Faktoren aus dem „Vollblut-System“ ausgeschaltet. Ein weiterer Vorteil des Langendorff-Modells ist die relativ einfach durchzuführende Präparation. Außerdem können direkt im Anschluss an die experimentellen Versuche biochemische oder histologische Untersuchungen durchgeführt werden. Das Modell liefert somit ein breites Spektrum an biochemischen, physiologischen, morphologischen und pharmakologischen Versuchsdaten.

1.6 ZIELSETZUNG

Eine Vielzahl von experimentellen Studien hat eine Verminderung des oxidativen Stresses während der Ischämie und/oder während der Reperfusion zum Gegenstand. Die Maßnahmen lassen sich nach drei Prinzipien unterteilen: Verminderung der Radikalbildung, Entfernung von überschüssigen Radikalen bzw. Oxidantien und Verminderung der Aktivierung bzw. Akkumulation von Granulozyten. Für jedes Prinzip sind verschiedene Ansätze erprobt worden, die allerdings kein eindeutiges Bild ergaben. So sind für jede der aufgeführten Interventionsstudien positive Resultate und negative Effekte beschrieben worden (Bolli, 1993). Diese

Diskrepanzen reflektieren die große Komplexität der Ereignisse im reperfundierten Gewebe sowie die Unterschiede in den verwendeten Modellen. Eine bislang weniger untersuchte Möglichkeit zur Wiederherstellung der Homöostase der reaktiven Sauerstoffspezies ist vermutlich durch eine bedarfsgerechte Erhöhung der Aktivität endogener Schutzfaktoren zu erreichen. Hierbei bietet eine verstärkte Produktion von endogenem NO durch das Gefäßendothel eine Möglichkeit (Proctor, 1989).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluss von polymorphkernigen Granulozyten (PMNs) auf die Entwicklung eines funktionellen und strukturellen myokardialen Schadens nach einer Ischämie, gefolgt von einer Reperfusion, zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurde ein Modell mit isoliert-perfundierten Rattenherzen nach Oskar Langendorff etabliert und validiert. Des Weiteren sollte der Einfluss des neuen eNOS-Transkriptionsverstärkers S803 von Aventis auf die Entwicklung eines PMN-induzierten Reperfusionsschadens in diesem Modell untersucht werden. Ferner wurde in einem weiteren Langendorff-Modell mittels reaktiver Hyperämie-Versuche der Einfluss von S803 auf die myokardiale Endothelfunktion untersucht. Folgende Hypothesen lagen der Fragestellung zugrunde:

1. Die Reperfusion mit PMNs zeigt im Unterschied zur zellfreien Reperfusion in dem *ex-vivo-Modell* eine linksventrikuläre Funktionsminderung.
2. Intrakoronar ablaufende Interaktionen leukozytärer Zellen mit dem Endothel sind kausal an der Entstehung einer myokardialen Dysfunktion beteiligt.
3. Das Ausmaß der myokardialen Dysfunktion korreliert mit der myokardialen Zytokinkonzentration von IL-1 β und TNF- α .
4. Eine Hochregulation der eNOS-Expression durch S803 führt zu einer verbesserten Endothelfunktion und vermindert eine PMN-induzierte post-ischämische myokardiale Dysfunktion.

Der HMG-CoA-Reduktase-Hemmer Simvastatin diente in der Behandlungsstudie als Positivkontrolle für einen NO-abhängigen Mechanismus.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 CHEMIKALIEN, ANTIKÖRPER, KITSYSTEME

Chemikalien

Substanz	Hersteller
Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	Riedel-de Haën
BSA	PAA
Carbogen (95% O ₂ , 5% CO)	Messer-Griesheim
Complete [®] Mini Protease-Inhibitor	Roche Diagnostics
Criteriongradientengel	BioRad
Dextran (Mr 500000)	Fluka Biochemika
DPBS ohne Calcium & Magnesium	Sigma
ECF-Detektionsreagenz	Amersham Biosciences
EDTA	Merck
Ethanol absolut	Riedel-de Haën
fMLP (N-Formyl-Met-Leu-Phe)	Sigma
Glucose	Riedel-de Haën
Histopaque [®]	Sigma
Kaliumchlorid (KCl)	Merck
Kaliumhydrogencarbonat (KHCO ₃)	Riedel-de Haën
Kalziumchlorid (CaCl ₂ x 2 H ₂ O)	Merck
Liquemin [®] (Heparin Natrium; 5000 I.E./ml)	Hoffmann-La-Roche AG
L-NAME	Sigma
Magnesiumchlorid (MgCl ₂ x 6 H ₂ O)	Riedel-de Haën
Magnesiumsulfat (MgSO ₄ x 6 H ₂ O)	Riedel-de Haën
Narcoren [®] (Pentobarbital-Natrium)	Merial GmbH
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma
NuPage Transferpuffer	BioRad
PBS-Puffer	Linaris Biologische Produkte
Plastipur [®] (Isotone Kochsalzlösung; 0,9% NaCl)	Fresenius
Simvastatin (C ₂₅ H ₃₈ O ₅)	Apin Chemical Limited
Thrombin	Sigma
Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC)	Sigma
Tris-Puffer	Sigma
Trockenmilchpulver	BioRad
Trypanblau	Biochrom
Tween-20	Merck

Kitsysteme, Antikörper

Substanz	Hersteller
CD18-Antikörper (MCA503XZ)	Firma Serotec
CK-Test	Boehringer Mannheim Systems
LDH-Test	Boehringer Mannheim Systems
Quantikine [®] M Murine, IL-1 β -ELISA-Kit	R & D Systems
Quantikine [®] M Murine, TNF- α -ELISA-Kit	R & D Systems

2.2 PERFUSIONSLÖSUNGEN UND PUFFER

Für die Versuche am isoliert-perfundierten Rattenherzen nach Langendorff wurden zwei verschiedene Nährlösungen verwendet. Zur Erfassung des PMN-induzierten Reperfusionsschadens wurde eine Krebs-Bicarbonat-Pufferlösung nach dem Protokoll von Lefer *et al.* (1993c) verwendet. Dagegen wurde zur Messung der Endothelfunktion eine modifizierte Krebs-Henseleit-Pufferlösung (Krebs und Henseleit, 1932) verwendet. Die Perfusate wurden mit destilliertem Wasser täglich frisch angesetzt und über ein Druckfiltrationsgerät (Sartorius, Göttingen) gefiltert. Eine Filtration des Perfusats empfiehlt sich, da die verwendeten Chemikalien häufig unlösliche Partikel enthalten, die zu einer Schädigung des Gefäßsystems der Herzen führen können.

Krebs-Bicarbonat-Perfusat

Substanz	Konzentration [mmol/l]	Hersteller
EDTA	0,5	Merck
Glucose	17	Riedel-de Haën
Kaliumchlorid (KCl)	5,9	Riedel-de Haën
Kalziumchlorid (CaCl ₂ x 2 H ₂ O)	2,5	Riedel-de Haën
Magnesiumchlorid (MgCl ₂ x 6 H ₂ O)	1,2	Riedel-de Haën
Natriumchlorid (NaCl)	120	Riedel-de Haën
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	25	Riedel-de Haën
Natriumhydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	0,3	Merck

Modifiziertes Krebs-Henseleit-Perfusat

Substanz	Konzentration [mmol/l]	Hersteller
Glucose	5,5	Riedel-de Haën
Kaliumchlorid (KCl)	4,7	Riedel-de Haën
Kaliumhydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	1,2	Merck
Kalziumchlorid (CaCl ₂ x 2 H ₂ O)	2,5	Riedel-de Haën
Magnesiumsulfat (MgSO ₄ x 6 H ₂ O)	1,6	Riedel-de Haën
Natriumchlorid (NaCl)	118	Riedel-de Haën
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	25	Riedel-de Haën
Natriumpyruvat	2,0	Merck

Bei der täglichen PMN-Gewinnung aus humanem Vollblut wurde ein Lysepuffer folgender Zusammensetzung verwendet:

ACK-Lysepuffer

Substanz	Konzentration [mmol/l]	Hersteller
Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	155	Riedel-de Haën
EDTA	0,1	Riedel-de Haën
Kaliumhydrogencarbonat (KHCO ₃)	10	Riedel-de Haën

2.3 VERSUCHSTIERE

Für die Versuchsdurchführung am isolierten Rattenherzmodell nach Langendorff wurden ausschließlich männliche Wistar-Ratten mit einem Gewicht zwischen 300–360 g verwendet. Die Tiere wurden von dem Zuchtbetrieb Harlan Winkelmann (Paderborn) bezogen. Es wurden maximal drei Ratten in normierten Makrolon[®]-Käfigen (Größe 4) auf StandardEinstreu für Labortiere unter konstanten, kontrollierten Bedingungen gehalten. Der Tag-Nacht-Zyklus war auf 12 Stunden eingestellt. Während der zehntägigen Eingewöhnungszeit vor Versuchsbeginn bekamen die Tiere Futter und Wasser ad libitum. Das Futter bestand aus einer pelletierten Standard-Diät für Ratten und Mäuse (Firma Altromin GmbH, Lage).

2.4 ISOLIERUNG NEUTROPHILER GRANULOZYTEN AUS HUMANBLUT

2.4.1 Blutgewinnung

Gesunden männlichen und weiblichen Probanden wurden 60 ml Blut entnommen. Um eine Koagulation des Blutes zu verhindern, wurde der Konus der Perfusorspritzen mit Heparin gefüllt. Zur Punktion wurde eine Butterfly-Kanüle (Firma Braun) mit einem Innendurchmesser von 0,9 mm verwendet. Nach der Entnahme wurde das Blut durch vorsichtiges Schwenken mit dem Antikoagulans vermischt.

2.4.2 PMN-Gewinnung

Für die Gewinnung der PMNs aus humanem Vollblut wurde die Methode nach Boyum (1976) modifiziert. Das Prinzip der PMN-Auftrennung beruht auf einer Dextran-Sedimentation. Dabei werden zu Beginn durch Zentrifugation auf einem speziellem Medium Plasma, Lymphozyten und Monozyten von den Erythrozyten und den PMNs abgetrennt. Die Erythrozyten werden anschließend von den PMNs durch Sedimentation in einer Dextranlösung separiert. Es folgen die einzelnen Durchführungsschritte im Detail (siehe Abbildung 1).

Zunächst wurde das heparinisierte humane Vollblut unmittelbar nach der Blutentnahme mit Dulbeccos Phosphat-Puffer (DPBS, Sigma) 1:1 verdünnt und mit Histopaque[®] (Sigma) unterschichtet. Histopaque[®] ist eine steril gefilterte Lösung aus Polysaccharose (5,7 g/l) und Natriumdiatrizoat (9,0 g/l). Es wurden jeweils 20 ml verdünntes Humanblut vorsichtig auf 15 ml Histopaque[®] aufgetragen und 25 Minuten bei 400 x g (1550 rpm, Heraeus Sepatech, Minifuge RF) zentrifugiert. Dabei bildeten sich drei Phasen: Die oberste Phase bestand aus Plasma, die mittlere Phase war Histopaque[®]. Zwischen diesen beiden Phasen entstand ein weißer, aus mononuklearen Zellen bestehender Ring. In der untersten Phase befanden sich die Erythrozyten, diese waren mit einer weißen Schicht PMNs bedeckt. Mit einer Vakuumpumpe (Vacusafe Integra Biosciences) wurden die oberste Phase sowie das Histopaque[®] und der weiße Ring vorsichtig abgesaugt. Das verbleibende Sediment wurde mit 20 ml einer 3%-igen Dextranlösung (Mr 500000, Fluka Biochemika) in DPBS resuspendiert. Anschließend wurde die Suspension für eine Stunde bei Raumtemperatur zur Sedimentation stehen gelassen. Die Erythrozyten

sedimentierten hierbei, während die PMNs im Überstand verblieben. Der Überstand wurde vorsichtig entnommen, mit dem gleichen Volumen DPBS gewaschen und zentrifugiert (15 Minuten bei 400 x g). Nach beendeter Zentrifugation lagen die PMNs als Sediment vor. Sofern die PMNs noch mit Erythrozyten kontaminiert waren, wurden diese durch eine hypotone Lyse vollständig entfernt. Hierzu wurde das Sediment mit einem eiskalten ACK-Lysepuffer (Zusammensetzung siehe 2.2) fünf bis sieben Minuten bei 4 °C versetzt. Es folgte ein letztes Waschen mit DPBS-Puffer (Zentrifugation, 10 Minuten bei 400 x g). Abschließend wurden die Zellen in DPBS resuspendiert, mit Glucose (5,6 mM) versetzt und gezählt (Serono Baker Diagnostics Sytem 9000).

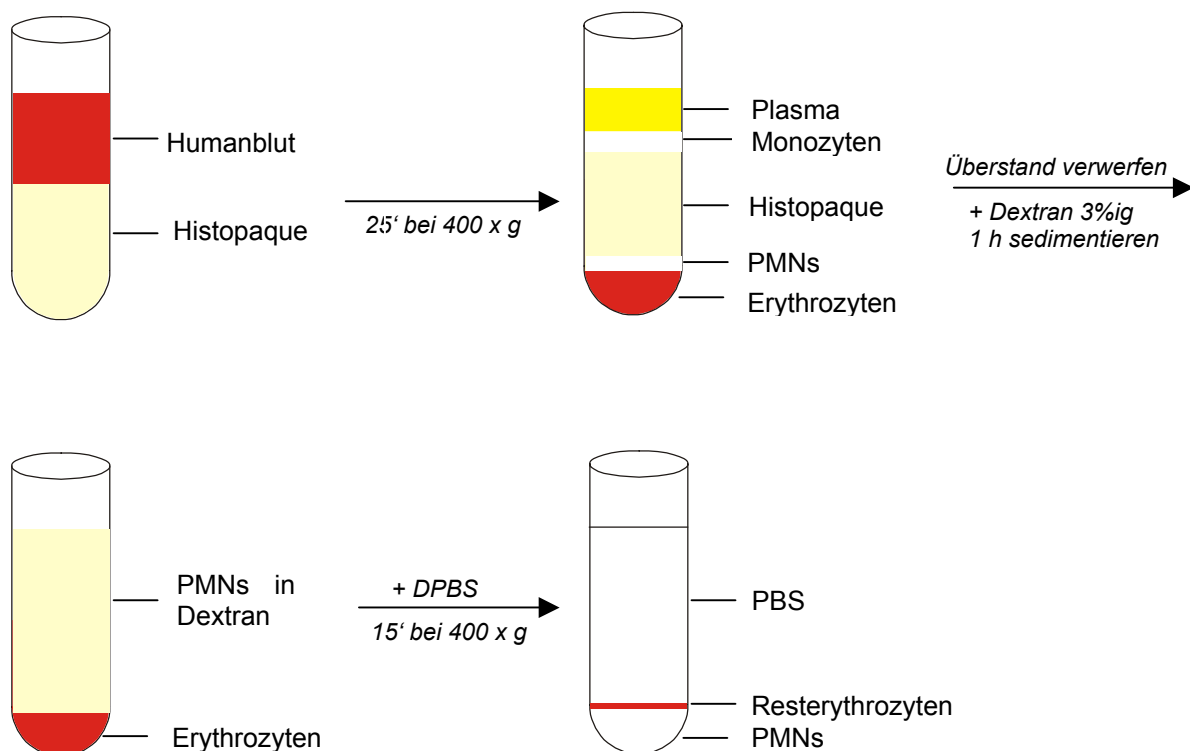


Abbildung 1: Schematische Darstellung der PMN-Isolierung (modifiziert nach Boyum, 1976)
Die Lyse der Resterythrozyten ist hier nicht dargestellt.

Um eine vorzeitige Aktivierung der Blutzellen zu minimieren, ist bei der gesamten Präparation darauf zu achten, dass man die PMNs so schonend wie möglich aus dem Vollblut isoliert. Es ist bekannt, dass Leukozyten durch Glas in hohem Maß aktiviert werden und an diesem Material adhären. Aus diesem Grund erfolgten alle Auftrennungsschritte in Kunststoffgefäßen (50 ml Polypropylen-Röhrchen mit konischem Boden).

Die Entscheidung, in dem isoliert-perfundierten Langendorff-Modell humane PMNs und nicht aus autologem Blut gewonnene PMNs zu verwenden, erfolgte aus mehreren Gründen. In der Vergangenheit haben verschiedene Studien gezeigt, dass isolierte autologe Blutzellen intrakoronar an puffer-perfundierten Nagerherzen im Vergleich zu humanen Zellen keine nachweisbaren Unterschiede in ihrem Adhäsionsverhalten aufweisen (Shandelya *et al.*, 1993). Insbesondere wurden dabei keine Unverträglichkeitsreaktionen beobachtet (Zahler *et al.*, 1997). Des Weiteren wurden für die PMN-Gewinnung keine zusätzlichen Spendertiere benötigt.

2.4.3 Vitalitätstest und Zellzählung

Zur Bestimmung der Zell-Überlebensrate (Viability) wurde aus der frisch gewonnenen Zellsuspension ein Aliquot von 10 µl mit 90 µl Trypanblau-Lösung (0,2 mg/ml) versetzt. Nach wenigen Minuten Inkubationszeit wurden die Zellen auf einer Neubauer-Zählkammer unter dem Lichtmikroskop ausgezählt. Trypanblau ist ein Farbstoff, der intakte Zellmembranen nicht durchdringt. Somit wurden blaugefärbte Zellen als tote Zellen definiert. Die Überlebensrate [%] wurde berechnet als:

$$\frac{n \times [\text{Lebende Zellen}] \times 100}{n \times [\text{Lebende Zellen}] + n \times [\text{Tote Zellen}]}$$

Für die Untersuchungen am isolierten Langendorff-Herzen wurde die täglich frisch gewonnene humane PMN-Suspension auf eine definierte Zellzahl (10–12 Millionen PMNs/ml) mittels Cell Counter (Serono Baker Diagnostics Sytem 9000) eingestellt.

2.5 ORGANPRÄPARATION

2.5.1 Blutentnahme aus Ratten

Es wurde nur bei vorbehandelten Tieren direkt vor der Herzentnahme eine Blutentnahme aus der Bauchaorta durchgeführt. Hierzu wurden die Ratten gewogen und mit Pentobarbital intraperitoneal (i.p.) narkotisiert (Narcoren[®], 180 mg/kg KG). Um eine mögliche Blutgerinnung zu vermeiden, wurde zusätzlich 0,1 ml Heparin (Liquemin[®], N = 5000 I.E./ml) pro 100 g Körpergewicht i.p. appliziert. Nach Eintritt der Vollnarkose wurde das Tier auf einem Kleintieroperationstisch in Rückenlage fixiert und die Aorta abdominalis aus dem Retroperitonealraum freipräpariert, sodann 1-2 ml Blut in ein heparinisiertes Zentrifugenröhrchen (Vacutainer[®]) aufgenommen und zentrifugiert (10 Minuten, 10 °C, 3000 rpm). Das auf diese Weise gewonnene Plasma diente zur Plasmaspiegeluntersuchung.

2.5.2 Herzentnahme bei Ratten

Für die Herzentnahme wurde ein Hautschnitt entlang des kaudalen Rippenbogens geführt. Anschließend wurde mit zwei parasternalen Schnitten durch die Rippen vom Zwerchfell aus die Brusthöhle eröffnet. Das Herz wurde freipräpariert und vollständig entnommen. Nach der Entnahme wurde das Herz sofort in eine 4 °C kalte Krebs-Henseleit-Lösung überführt. Die Aorta ascendens wurde von Fett und Lungengewebe freipräpariert und anschließend kanüliert. Nach Befestigung der Aortenkanüle wurde das isolierte Herz in die Langendorff-Apparatur eingehängt und mit Nährlösung perfundiert, woraufhin das Organ erneut zu schlagen begann. Mit diesem Vorgang endete die kurzzeitige hypotherme Versorgungsunterbrechung des Herzens (Dauer < 3 Minuten). Neben der möglichst raschen Durchführung ist die Präparation in eiskalter Pufferlösung besonders wichtig, um die unvermeidliche Ischämie des Herzens so gering wie möglich zu halten; denn in der kalten Lösung hört das Herz augenblicklich auf zu schlagen, so dass beim Freipräparieren der Aorta und bei der Anbringung der Aortenkanüle (Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten) nur eine geringfügige prä-experimentelle Ischämie des Herzens erzeugt wird.

2.6 VERSUCHSMODELL: ISOLIERT-PERFUNDIERTES RATTENHERZ NACH LANGENDORFF

2.6.1 Perfusionsmodalitäten für isolierte Herzen

Für die Untersuchungen am isoliert-perfundierten Herzen wurde die Versuchsanlage „Isoliertes Herz Größe 3“, Typ 830, von Hugo Sachs Elektronik Havard Apparatus, March-Hugstetten verwendet (siehe Abbildung 2).

Das Herz wurde in der Langendorff-Anlage retrograd mit einem konstanten Perfusionsdruck perfundiert. Hierbei bleiben die Aortenklappen geschlossen und das Perfusat gelangt durch die oberhalb der Aortenklappe lokalisierten Abgänge der Koronarien in den arteriellen Schenkel des Koronarsystems, so dass es zu einer anterograden (physiologischen) Koronarzirkulation kommt. Über den venösen Schenkel des Koronarsystems strömt der Koronarfluss aus dem Sinus coronarius in den rechten Vorhof und von dort in den rechten Ventrikel. Das koronarvenöse Effluat fließt anschließend über den Truncus pulmonalis ab, ohne dass das rechte Herz physiologische Arbeit zu leisten hat. Als Perfusat wurde eine mit Sauerstoff angereicherte saline Nährlösung verwendet. Das Perfusat wurde mit Carbogen, einem Gasgemisch aus 95% Sauerstoff und 5% Kohlendioxid, permanent begast. Die Nährlösung hatte einen konstanten pH-Wert von 7,4.

Über eine Zahnradpumpe (**A**) gelangt das Perfusat in den Oxygenator (**B**). Es handelt sich hierbei um ein temperierbares, doppelwandiges Glasgefäß mit kugelförmigen Ausbuchtungen des Innenteils, die durch ihre große Oberfläche eine optimale Temperierung (37 °C) und Oxygenierung des Perfusats ermöglichen. Das Carbogen wird im unteren Bereich des Oxygenators eingeleitet. Über eine motorbetriebene Schleuderscheibe (**C**) wird die Nährlösung in das obere Ende des Oxygenators eingeführt. Die Schleuderscheibe verteilt das Perfusat zu einem dünnen Flüssigkeitsfilm, damit die Sauerstoffsättigung ohne störende Schaumbildung stattfinden kann. Die Oxygenierung des Perfusats erfolgte demnach ähnlich – wie im bekannten Scheibenoxxygenator einer Herz-Lungen-Maschine – durch einen dünnen Flüssigkeitsfilm auf einer großen Oberfläche.

Der Koronarfluss wurde mit Hilfe eines Ultraschall-Flussaufnehmers (Transonic Systems Inc., Ithaca, New York, USA) (**D**) oberhalb der Aortenkanüle gemessen. Eine Blasenfalle, die direkt über dem Herzen platziert war, fing im Perfusat vorhandene Gasbläschen ab, bevor sie in die Koronargefäße gelangen konnten. Hier war auch der Anschluss des Druckaufnehmers (**E**) für die Messung des tatsächlichen Perfusionsdrucks angebracht. Die isovolumetrische Herzinnendruckmessung erfolgte mit Hilfe der „Ballonmethode“. Nach Eröffnung des linken Vorhofes wurde hierzu ein Latexballon (Größe 4, Hugo Sachs Elektronik Havard Apparatus) (**F**) durch die Mitralisklappe in den linken Ventrikel des Herzens eingeführt. Der Latexballon war über einen Stahlkatheter mit einem mechano-elektrischen Druckwandler (Isotec, Statham Transducer) verbunden. Dieser gab elektrische Signale an das elektronische Differenzierungssystem weiter, dessen analoge Signale digitalisiert und mit einer entsprechenden Software (Isoheart, Hugo Sachs Elektronik Havard Apparatus) aufgenommen wurden. Über eine Spindelspritze (**G**) wurde der Ballon vor jedem Versuch auf einen definierten diastolischen Druck (10–14 mm Hg) eingestellt. Zum Füllen des Druckaufnehmermesskreises, der aus dem Latexballon, dem Stahlkatheter, dem Druckaufnehmer und der Spindelspritze bestand, wurde eine Alkohol/Wasser-Mischung (1:1) verwendet. Die guten Benetzungseigenschaften dieser Mischung ermöglichen dabei ein blasenfreies Füllen des Messsystems. Darüber hinaus ist die Löslichkeit der Luft in dieser Mischung reduziert, so dass das nachträgliche Auftreten von Luftblasen im System vermindert wird. Nach beendeter Präparation wurde das Herz während der gesamten Versuchsdauer in eine mit Perfusat gefüllte Herzkammer (**H**) eingetaucht. Diese bestand wie der Oxygenator aus einem temperierten doppelwandigem Glasgefäß. Auf diese Weise entstand eine feuchte Kammer für das Herz. Diese verhinderte, dass das Herz Wärme und Wasserdampf abgab und somit während des Versuchs abkühlte oder austrocknete.

Die Substanz-Zugabe erfolgte über eine Schlauchpumpe, deren Schlauch direkt über der Aortenkanüle in das Perfusat mündete. Die Pumpe war an ein spezielles Pumpensteuerungsprogramm (IBJ-BMON 1.0, Ing. Büro Jäckel, Hanau) angeschlossen, das abhängig vom Koronarfluss die Pumprate steuerte. Dies ermöglichte eine genaue Dosierung der Substanz-Zugabe. Theoretisch kann eine Zugabe auch über das in einem Vorratsgefäß befindliche Perfusat erfolgen. Allerdings lässt sich die Zahnradpumpe, die das Perfusat vom Vorratsgefäß zum Oxygenator leitet, nur

sehr umständlich und unter großem Zeitaufwand von anhaftenden Wirksubstanzen reinigen. Daher empfiehlt sich die Anwendung einer Schlauchpumpe. Die PMN-Zugabe erfolgte über eine Infusionspumpe (Havard Apparatus). Der Perfusor wurde auf eine Perfusionsgeschwindigkeit von 0,5 ml/min eingestellt. Auch hier mündete der Zufuhrschlauch direkt über dem Herzen in das Perfusat.

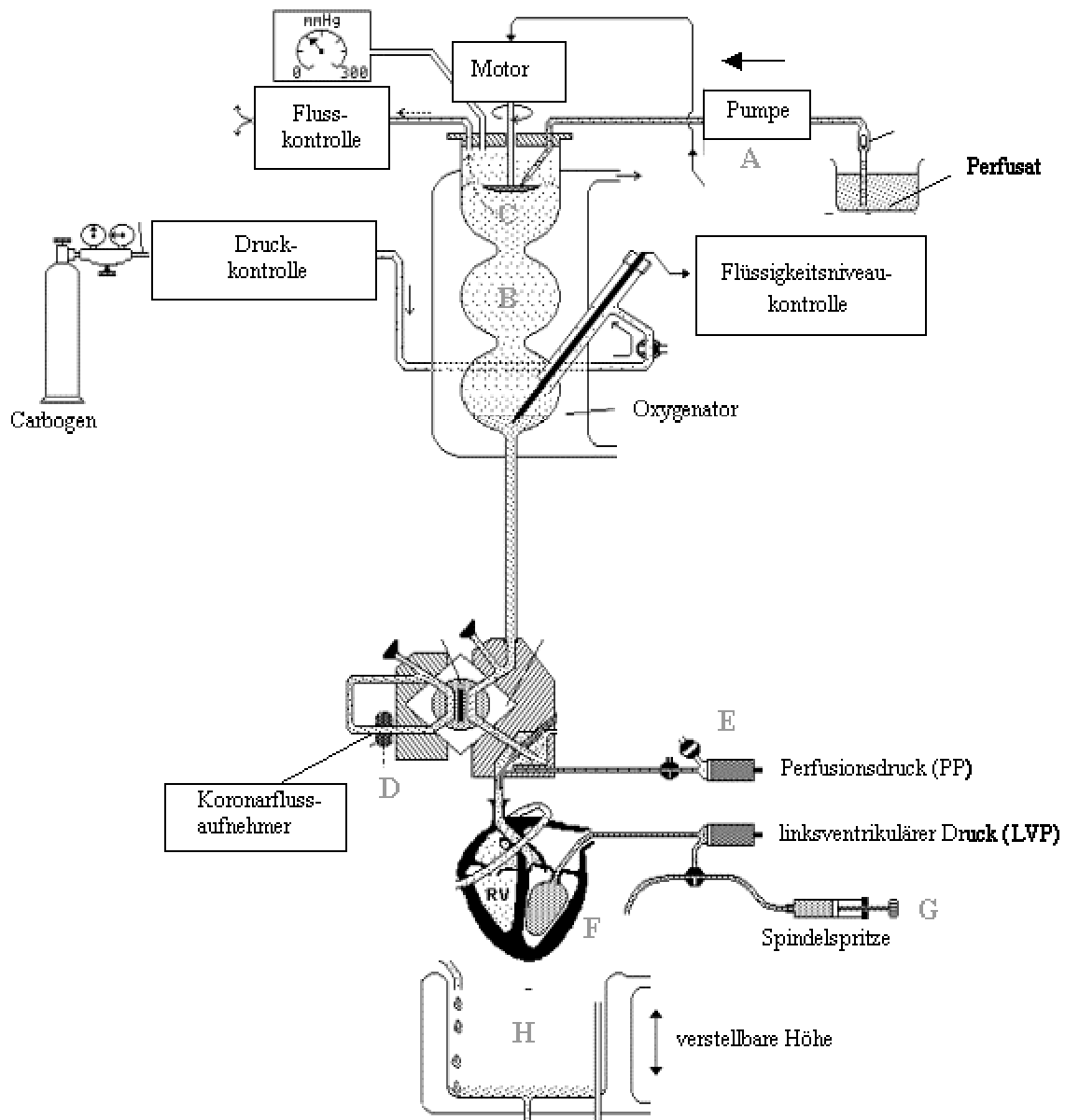


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Versuchsanordnung zur Perfusion isolierter Rattenherzen nach Langendorff (modifiziert nach HSE Havard Apparatus)

Alle Daten wurden über ein elektronisches Differenzierungssystem (Plugsys, Hugo Sachs Elektronik Harvard Apparatus), den Rückkopplungsverstärker und über ein Interface in einem Pentium-III-Computer (Isoheart[®] W-Programm Version 1.2, Hugo Sachs Elektronik) aufgenommen und ausgewertet.

2.6.2 Erfassung hämodynamischer Parameter

Es wurden kontinuierlich die Standardparameter der Hämodynamik (siehe Tabelle 1) wie die Herzfrequenz (HF), der Koronarfluss (CF) und der linksventrikuläre Druck gemessen. Hierbei wurden der linksventrikuläre systolische und der linksventrikuläre diastolische Druck (LVP_{sys} & LVP_{dia}) erfasst. Rechnerisch wurden ermittelt: die linksventrikuläre Druckentwicklung oder auch „Left Ventricular Developed Pressure“ (LVDP) genannt, definiert als die Differenz zwischen LVP_{sys} und LVP_{dia} ; die maximale Druckanstiegs- bzw. -abfallgeschwindigkeit des linken Ventrikels, die als Maß der Kontraktilität (dP/dt_{max}) bzw. der Relaxation (dP/dt_{min}) gilt und sich mathematisch aus dem LVDP ableitet; das Produkt aus der Herzfrequenz und dem LVDP wird als „Pressure Rate Product“ bezeichnet (PRP) und ist ein weiteres Maß der Kontraktilität.

Tabelle 1: Bezeichnung, Formelzeichen und Einheiten der gemessenen und berechneten Parameter im Langendorff-Versuchsmodell

Bezeichnung	Formelzeichen	Einheit
Herzfrequenz	HF	bpm
Linksventrikulärer systolischer Druck	LVP_{sys}	mm Hg
Linksventrikulärer diastolischer Druck	LVP_{dia}	mm Hg
Linksventrikuläre Druckentwicklung	LVDP	mm Hg
Maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit des linken Ventrikels (Maß für die Myokardkontraktion)	dP/dt_{max}	mm Hg/s
Maximale Druckabfallgeschwindigkeit des linken Ventrikels (Maß für die Myokardrelaxation)	dP/dt_{min}	mm Hg/s
Koronarfluss	CF	ml/min
„Pressure Rate Product“	PRP	mm Hg/min

2.6.3 Versuchsprotokolle

Um konstante Messparameter zu erzielen, begannen die Versuche mit einer 15-minütigen Vorphase. In einer darauffolgenden 20-minütigen Kontrollphase wurden die hämodynamischen Ausgangswerte aufgezeichnet. Sofern die Herzen den Sollvorgaben entsprachen, wurden sie in den Versuch genommen. Die Sollvorgaben sahen eine Herzfrequenz von 250 bis 350 Schlägen pro Minute vor. Außerdem sollten die Herzen eine linksventrikuläre Druckentwicklung (LVDP) von mindestens 70 mm Hg und einen Koronarfluss von 10–18 ml/min aufweisen.

2.6.3.1 Erfassung des PMN-induzierten Reperfusionsschadens

Im Folgenden wird das Versuchsprotokoll zum Versuchsmodell beschrieben, das die Erfassung der PMN-induzierten kardialen Dysfunktion im isolierten Rattenherzen ermöglicht. Es wurde ein modifiziertes Versuchsprotokoll nach Lefer *et al.* (1993c) und Raschke *et al.* (1993) angewandt. Eine Interaktion zwischen den Endothelzellen und den PMNs wurde durch Vorstimulierung beider Zelltypen gefördert. Die Stimulation des Endothels erfolgte mittels Thrombin-Gabe, während die PMNs durch Inkubation mit dem formylierten chemotaktischen Peptid Methionyl-Leucyl-Phenylalanin (fMLP; 10 nM) vorstimuliert wurden (Zimmerman *et al.*, 1985).

Nach Vor- und Kontrollphase wurde das Herz zehn Minuten lang mit einer Thrombinhaltigen Lösung (0,3 U/ml) perfundiert. Es folgte eine 30-minütige globale Ischämiephase durch Stoppen der Perfusion. In dieser Phase trat damit sofort eine nahezu vollständige Abnahme der Kontraktionskraft und des Koronarflusses ein. Nach der Ischämiephase wurde mit einer 60-minütigen Reperfusion begonnen. In der PMN-perfundierten Gruppe (I/R + PMN) erfolgte mit Einsetzen der Reperfusion eine PMN-Zugabe. Hierbei wurde in einem Zeitraum von zehn Minuten eine Gesamtzahl von 50–60 Millionen vorstimulierten PMNs in das isolierte Herz infundiert. Die Vorstimulierung der PMNs erfolgte durch eine 20-minütige fMLP-Inkubation (10 nM). Die Herzen der Kontrollgruppe (I/R) wurden mit reinem Perfusat 60 Minuten lang reperfundiert. Wie zuvor die Herzen der PMN-perfundierten Gruppe erhielten diese Herzen mit Einsetzen der Reperfusion fMLP (10 nM) für die Dauer von zehn Minuten. Die hämodynamischen Parameter wurden kontinuierlich über den gesamten Versuchszeitraum aufgezeichnet (siehe Abbildung 3).

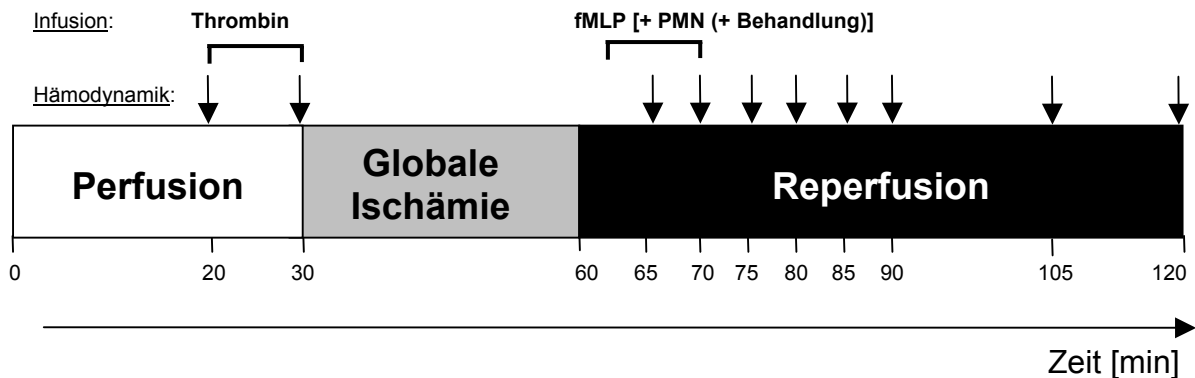


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Versuchsprotokolls zur Erfassung des PMN-induzierten Reperfusionsschadens im isoliert-perfundierten Langendorff-Herzen

Die Herzen wurden entweder mit Thrombin und fMLP perfundiert (Kontrollherzen: I/R) oder zusätzlich mit 50–60 Millionen humanen PMNs (PMN-perfundierte Herzen: I/R + PMN). Die Dokumentation der Hämodynamik ist durch Pfeile gekennzeichnet.

Zusätzlich zur elektronischen Aufzeichnung der Hämodynamik wurden während des Versuchs insgesamt acht Effluatproben zur Bestimmung der Creatinkinase und der Lactatdehydrogenase abgenommen. Zu diesem Zweck wurden jeweils 1000 µl Effluat zu definierten Zeitpunkten gesammelt.

Am Ende der Experimente wurden die Herzen für die biochemischen Nachfolgeuntersuchungen in Flüssigstickstoff schockgefroren und bei -80 °C aufbewahrt, sofern sie nicht zur Infarktgrößenbestimmung sofort weiterverarbeitet wurden.

2.6.3.2 Erfassung der Endothelfunktion

Zur Erfassung der Funktion des Gefäßendothels wurde im isoliert-perfundierten Langendorff-Herzen die post-ischämische Koronarflusssteigerung nach einer kurzzeitigen Ischämiephase (reaktiven Hyperämie) untersucht.

Die Perfusion der Herzen erfolgte auch in diesem Modell bei konstantem Perfusionsdruck (80 mm Hg). Nach der Kontrollphase wurde die reaktive Hyperämie bei zwei unterschiedlichen Ischämiezeiten untersucht. Zunächst wurde für 20 Sekunden eine globale Ischämie induziert. Diese war gefolgt von einer 5- bis 10-

minütigen Reperfusionphase. Im Anschluss erfolgte eine 60-sekündige Ischämie. Nach Versuchsende wurden die Herzen für die Bestimmung der eNOS-Proteinexpression in Flüssigstickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt.

Bei der quantitativen Auswertung der reaktiven Hyperämie wurde die relative Koronarflusssteigerung bestimmt. Diese ergibt sich durch Auswertung des maximal erreichten Koronarflusses zu Beginn der Reperfusion in Relation zum Ausgangsfluss. Außerdem wurde das Zeitintegral des Koronarflusses während der Hyperämiedauer berechnet. Hierzu wurde der Zeitpunkt bestimmt, bei dem der Koronarfluss nach beendeter reaktiver Hyperämie seinen Ursprungswert wiedererlangt hatte. Die sich daraus ergebende Fläche unter der Kurve (AUC) wurde planimetrisch bestimmt (siehe Abbildung 4).

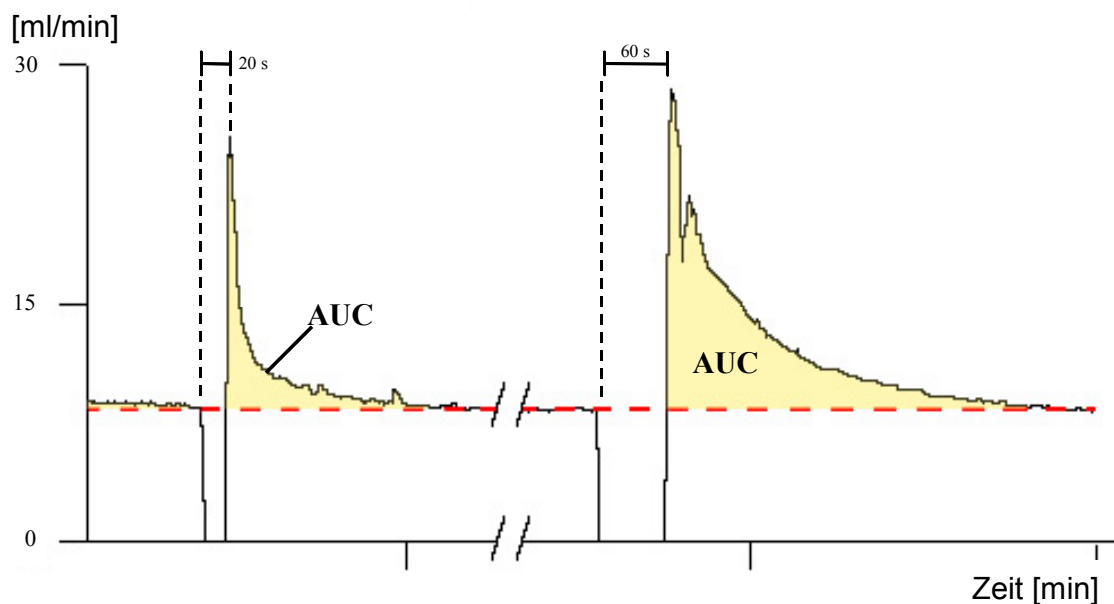


Abbildung 4: Exemplarische Originalaufzeichnung des Koronarflusses isoliert-perfundierter Langendorff-Hezen während der reaktiven Hyperämie

Am gleichen Rattenherzen wurde jeweils eine Ischämie von 20 und von 60 Sekunden Dauer eingeleitet. Die AUC wurde planimetrisch bestimmt u. in $\text{ml} \times \text{min}^{-1} \times \text{min} = \text{ml}$ bewertet.

2.7 WEITERE UNTERSUCHUNGSMETHODEN

2.7.1 Bestimmung der Infarktgröße

Die Infarktgröße wurde mittels Reduktion eines Tetrazoliumsalzes nach dem Prinzip von Sandritter und Jestädt (1958) ermittelt. Der Test beruht auf einer reduktiven Umsetzung des farblosen Triphenyltetrazoliumchlorids (TTC, Sigma) zu einem farbigen Triphenylformazansalz (siehe Abbildung 5). Nur gesundes Gewebe besitzt die hierzu benötigten Enzyme (Dehydrogenasen). Aufgrund mangelnder Enzymaktivität findet im nekrotischen Gewebe keine Reaktion des TTCs statt, so dass das Gewebe farblos erscheint und eine optische Unterscheidung vom gesunden Gewebe möglich ist.

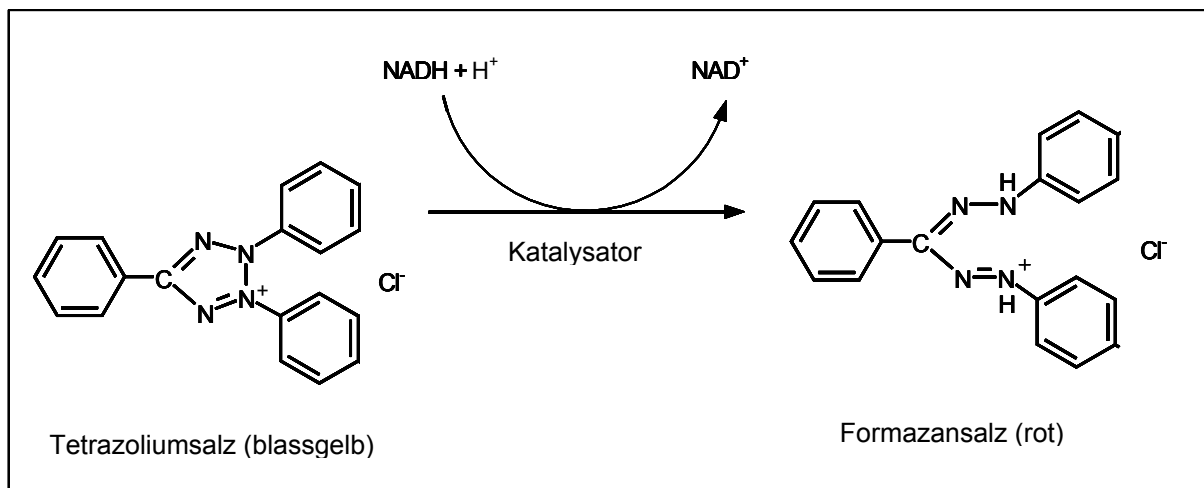


Abbildung 5: Redoxreaktionsgleichung der TTC-Färbung

Das Reagenz wird durch intrazellulär vorhandene Enzyme (Dehydrogenasen) zum farbigen Formazansalz umgesetzt und weist auf gesundes Gewebe hin.

Nach der Untersuchung der isoliert-perfundierten Herzen im Modell des PMN-induzierten Reperfusionsschadens wurden diese aus der Apparatur entnommen und von größeren Gefäßabgängen, den Vorhöfen sowie vom Bindegewebe befreit, so dass nur noch die linke und die rechte Herzkammer übrig blieben. Anschließend wurde das Herz von Apex bis Basis in fünf bis sechs gleich dicke Scheiben geschnitten. Es wurden die Gewichte der einzelnen Scheiben bestimmt und diese anschließend zehn Minuten lang in eine 1%ige, auf 37 °C temperierte TTC-Lösung gelegt. Abschließend wurde das Farbreagenz mit einer isotonischen Kochsalzlösung

abgespült und die Vorder- und Rückseite der Scheiben wurden in einer Petrischale photographisch aufgenommen. Die Infarktgröße wurde mit Hilfe eines Bildanalyse-systems (Leica Qwin, Leica Imaging Systems, Cambridge, GB) nach der Aufnahme planimetrisch bestimmt. Sie wurde als prozentualer Anteil bezogen auf die Gesamt-gewebefläche ausgedrückt.

2.7.2 Bestimmung der Creatinkinase und der Lactatdehydrogenase

Die quantitative Bestimmung der Creatinkinase (CK) und der Lactatdehydrogenase (LDH) erfolgte aus dem frischen koronarvenösen Effluat der isolierten Herzen und diente als Maß für die globale sarkolemmale Zellschädigung. Die Messung erfolgte nach einer optimierten Standard-Methode der Deutschen Gesellschaft für klinische Chemie. Hierzu wurden 1–2 µl Effluat photometrisch in einem klinisch-chemischen Analyseautomaten (Hitachi Typ 912 Automatic Analyzer, Roche Diagnostic, Mannheim) nach einer gekoppelten Enzymreaktion untersucht. Die ermittelte Enzym-aktivität wird in Enzymeinheiten pro Liter (U/l) angegeben. Dabei entspricht definitionsgemäß 1U der Enzymmenge, die bei 25 °C 1 µM Substrat pro Minute unter Standardbedingungen umsetzt.

2.7.2.1 Creatinkinase

Dem Testprinzip der CK-Bestimmung liegen drei Reaktionsschritte zugrunde (Oliver, 1955): In einem ersten Reaktionsschritt katalysiert CK die Dephosphorylierung von Creatinphosphat zu Creatin. Da keines der Substrate in der Messreaktion typische photometrische Eigenschaften besitzt, wird zur CK-Bestimmung zusätzlich eine Indikatorreaktion benötigt. Das im ersten Schritt entstehende ATP wird vorher in einer so genannten Hilfsreaktion vor der eigentlichen Messung entfernt. Hexokinase (HK) katalysiert hierbei unter ATP-Verbrauch die Phosphorylierung von Glucose zu Glucose-6-Phosphat (Glucose-6-P), welches im dritten Reaktionsschritt (Indikatorreaktion) mittels Glucose-6-Phosphatdehydrogenase (G6P-DH) zu Gluconat-6-Phosphat umgewandelt wird. Das hierbei entstehende NADPH wird photometrisch erfasst, wobei sich die Geschwindigkeit der NADPH-Bildung proportional zur CK-Aktivität verhält. Die von Oliver erstmals beschriebene Methode wurde von Szasz *et al.* (1976) auf optimale Testbedingungen verbessert.

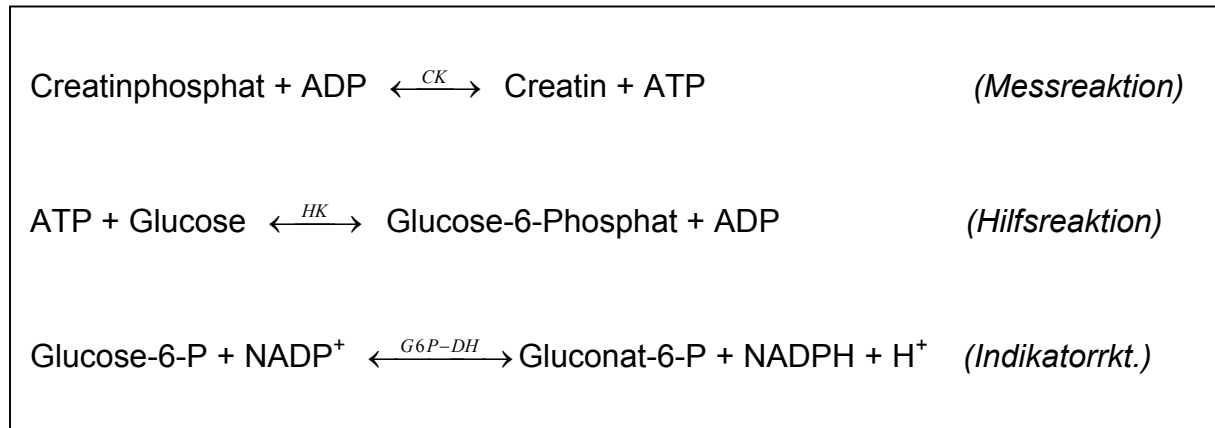


Abbildung 6: Testprinzip der CK-Messung

2.7.2.2 Lactatdehydrogenase

Das verwendete Enzymreagenz enthält Pyruvat/NADH (LDH-Test, Boehringer Mannheim Systems). Bei Zelltod freigesetztes LDH katalysiert die Umwandlung von Pyruvat zu Lactat, dabei wird NADH zu NAD⁺ oxidiert. NADH besitzt im Wellenlängenbereich von 340 nm ein Absorptionsmaximum, das NAD⁺ fehlt und dient daher der Enzymreaktion als Indikatorsubstrat. Die Absorptionsabnahme des NADH ist direkt proportional zur LDH-Aktivität, die wiederum ihrerseits bei Zelltod ansteigt. Folgende Enzymreaktion liegt der photometrischen Messung zugrunde (Amador und Wacker, 1965):

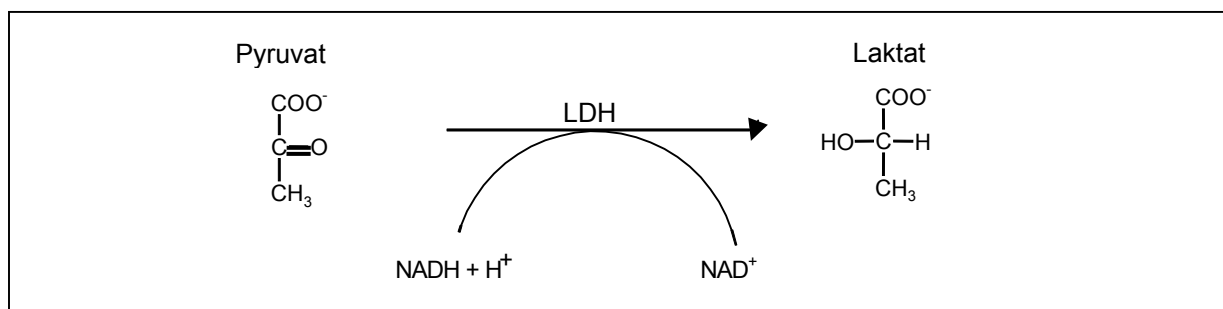


Abbildung 7: Testprinzip der LDH-Messung

Extrazelluläre Lactatdehydrogenasen katalysieren die Reduktion von Pyruvat zu Lactat, wobei äquivalente Mengen an NAD⁺ entstehen.

2.7.3 Zytokinbestimmung (IL-1 β und TNF- α)

Zur quantitativen Bestimmung von IL-1 β bzw. TNF- α wurden ELISA-Kits (Quantikine[®] M Murine) der Firma R & D Systems verwendet. Die Bestimmung erfolgte nach dem Prinzip eines „Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assays“ (ELISA).

Die schockgefrorenen Herzen wurden zunächst in einer Gefriermühle pulverisiert. Nach Extraktion wurde ein Aliquot aus dem Zentrifugationsüberstand mit dem jeweiligen Kit verarbeitet und photometrisch analysiert.

Als Nächstes sollen kurz die wichtigsten Schritte des ELISA-Prinzips erläutert werden. Die Kits enthalten einen monoklonalen Antikörper gegen die spezifischen Ratten-Antigene (Anti-IL-1 β bzw. Anti-TNF- α). Dieser Antikörper liegt auf einer Mikrotiterplatte gebunden vor. Die zu untersuchenden Proben werden in die Mikrotiterplatte pipettiert und an den Erstantikörper gebunden. Nach dem „Sandwich Prinzip“ wird ein zweiter, mit Peroxidase markierter Detektionsantikörper hinzupipettiert. Der Anteil an nichtgebundenem enzymmarkierten Antikörper wird ausgewaschen und ein Farbreagenz hinzugegeben, welches das Chromogen Tetramethylbenzidin enthält. Die Peroxidase katalysiert die Farbreaktion des Chromogens, dessen optische Dichte anschließend nach gestoppter Farbreaktion (Stoppreagenz: H₂SO₄) bei einer Wellenlänge von 450 nm in einem Plattenphotometer (ELISA-Reader) gemessen wird. Die gemessene Farbintensität verhält sich dabei proportional zur Zytokinkonzentration in der Probe.

2.7.4 Bestimmung der eNOS-Proteinexpression

Die Quantifizierung der eNOS-Expression erfolgte mittels Western-Blot-Analyse. Zuvor wurde eine Gesamtproteinbestimmung nach Lowry *et al.* (1951) durchgeführt.

Zur Vorbereitung der Proben wurden die Herzen zunächst unter Zusatz von Flüssigstickstoff in einer Gefriermühle zu Pulver zermahlen. Nach Zugabe eines kalten Puffers [10 mM Tris (Sigma), 1% Natriumdodecylsulfat (SDS), pH 7,4] und eines Proteaseinhibitors (Complete, Roche Biochemicals), wurde das Pulver in Kryoröhrchen überführt und 5–10 Sekunden mit einem Ultraschallstab behandelt.

Anschließend wurden die Proben in Zentrifugenröhrchen für eine Stunde auf Eis inkubiert und dann 30 Minuten bei 4 °C und 5000 rpm zentrifugiert. Die Proteinbestimmung erfolgte mit einem Aliquot aus dem klaren Überstand mittels eines Proteinassays von BioRad, München. Das Sediment wurde verworfen.

Bei der anschließenden Gelelektrophorese wurden je 80 µl Zentrifugationsüberstand mit 20 µl eines STOP-Probenpuffers [Tris-HCl, SDS, Glycerin, Bromphenolblau, β-Mercaptoethanol und Proteaseinhibitor, pH 6,8] versetzt und im Wasserbad 15 Minuten auf 70 °C erhitzt. Im Anschluss daran wurden die Proben auf ein Criterion-gradientengel (BioRad, München) aufgetragen. Neben den zu analysierenden Proben wurden ein Molekulargewichtsstandard und eine Positivkontrolle parallel aufgetragen. Nach einer Laufzeit von zehn Minuten bei 125 V und 53 Minuten bei 200 V wurden die Gele mit NuPage Transferpuffer (BioRad, München) für zwei Stunden bei einer Spannung von 25 V auf Nitrocellulose (Pall Gelman Lab., USA) transferiert. Die Membranen wurden über Nacht in einem Blockierungspuffer [20 mM Tris-HCl, 137 mM NaCl und 0,05% Tween-20, (TBST-Puffer) pH 7,6] und 5% eines fettfreien Trockenmilchpulvers (BioRad, München) bei 4 °C blockiert.

Im Anschluss folgte der immunologische Proteinnachweis mit spezifischen Antikörpern. Hierzu wurde ein erster polyklonaler Erstantikörper (Anti-eNOS III, „anti-rabbit from sheep“, Verdünnung 1:200, Firma SantaCruz, USA) eine Stunde lang inkubiert. Es folgte ein viermaliges Waschen mit TBST und die Inkubation mit dem Zweitantikörper [„anti-rabbit from sheep“, Verdünnung 1:20000 in TBST und 0,2% Rinderserumalbumin (Firma PAA, Cölbe)]. Um eine Proteindetektion zu ermöglichen, war der Zweitantikörper mit einer alkalischen Phosphatase verknüpft. Nach erneutem Waschen mit TBST wurden 2 ml ECF-Detektionsreagenz (Amersham Biosciences, Freiburg) hinzugegeben. Die Fluoreszenzmessung erfolgte nach einer Reaktionszeit von zwei Minuten mittels eines Flächenscanners mit Xenonlaser (Fluorimager 595, Molecular Dynamics, Krefeld).

2.8 UNTERSUCHTE SUBSTANZEN

In der vorliegenden Arbeit wurden ein CD11/18-Antikörper (MCA503XZ, Firma Serotec), ein HMG-CoA-Reduktase-Hemmer (Simvastatin, Apin Chemicals) und ein eNOS-Transkriptionsverstärker (S803, Aventis) in isoliert-perfundierten Langendorff- Herzen untersucht.

2.8.1 CD18-Antikörper

Das Adhäsionsmolekül CD11/CD18, auch $\alpha\beta$ -Integrin genannt, ist ein heterodimeres Protein der Integrin-Familie, das auf der Zelloberfläche von Leukozyten exprimiert wird. Diese Integrin-Komplexe vermitteln die Bindung von Leukozyten an das Gefäßendothel (Albelda und Buck, 1990).

Die Gabe von monoklonalen Antikörpern gegen die Leukozyten-Adhäsionsmoleküle der Integrin-Familie konnte bereits 1988 im Tiermodell eine Anlagerung von Granulozyten an ein entzündliches Endothel vermindern (Vedder und Harlan, 1988; Simpson *et al.*, 1988a). Winqvist und Hintze beobachteten zwei Jahre später durch Anwendung eines CD11/18-Antikörpers kardioprotektive Effekte in einem Ischämie/ Reperfusion-Modell.

Der CD11/18-Antikörper wurde zur Validierung des Modells des PMN-induzierten Reperfusionsschadens eingesetzt. Bei dem verwendeten Antikörper handelt es sich um einen Ratten-anti-human-Antikörper. Dieser wurde akut im isoliert-perfundierten Rattenherzen getestet. Hierzu wurden die PMNs 20 Minuten lang unter Lichtausschluss und bei Raumtemperatur mit 60 $\mu\text{g/ml}$ CD11/18-Antikörper inkubiert, bevor sie mit Reperfusionbeginn über einen Zeitraum von zehn Minuten in das isolierte Herz infundiert wurden. Der nichtgebundene Anteil des Antikörpers wurde zuvor durch einmaliges Waschen mit DPBS-Puffer aus der PMN-Suspension entfernt.

2.8.2 Simvastatin

Die Substanz liegt als inaktive Laktonestruktur vor (Abbildung 8). Als „Prodrug“ aufgenommen, wird sie in der Leber in die aktive ringoffene Hydroxysäure überführt. In dieser Arbeit wurde der HMG-CoA-Reduktase-Hemmer aus pharmakokinetischen Gründen in Form der Hydroxysäure appliziert. Hierzu wurde das Simvastatin vor Applikation alkalisch hydrolysiert (Gerson *et al.*, 1989).

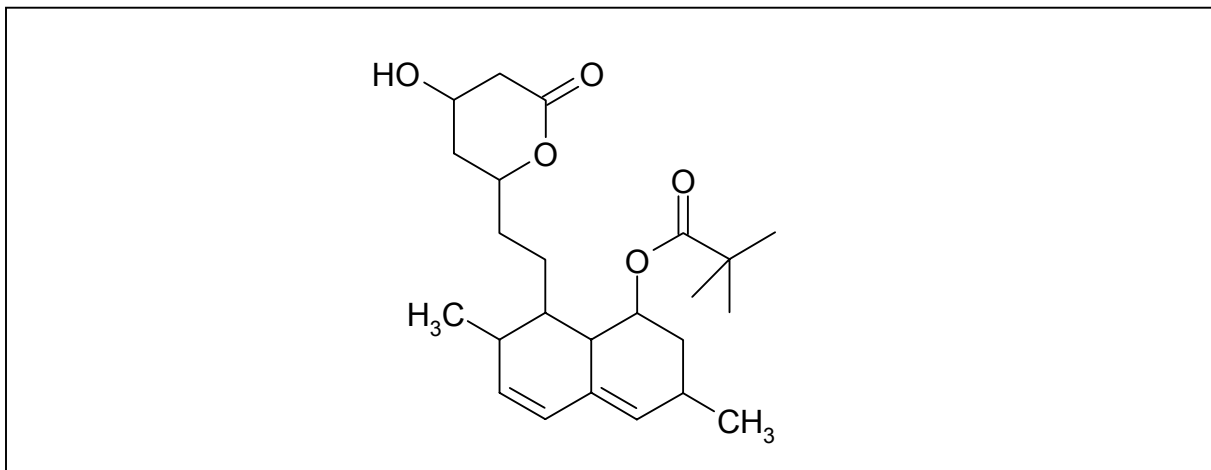


Abbildung 8: Strukturformel von Simvastatin

Die Wirkung von Simvastatin wurde nach einer subchronischen Behandlung der Ratten im isolierten Langendorff-Herz-Modell getestet. Hierzu wurde die Substanz vier Tage lang einmal täglich morgens in einer Dosis von 2 mg/kg KG subkutan appliziert (Endres *et al.*, 1998). Am vierten Behandlungstag erfolgte die Untersuchung im isoliert-perfundierten Herzen.

2.8.3 eNOS-Transkriptionsverstärker S803

S803 ist eine vollsynthetische Entwicklungssubstanz der Firma Aventis, die in einem Screening-Verfahren identifiziert worden ist (aus patentrechtlichen Gründen sind Strukturformel und Summenformel dieser Substanz nicht aufgeführt). In vorangegangenen *in-vitro-Studien* wurde der eNOS-Transkriptionsverstärker von Aventis auf seine Fähigkeit hin überprüft, die eNOS-Expression zu steigern. In einem zellulären Test auf Aktivierung der eNOS-Transkription wurde eine humane Endothelzelllinie mit einem Konstrukt transfiziert, das Luciferase als so genanntes

Reportergen an ein großes Fragment des humanen eNOS-Promotors gekoppelt enthielt (Li *et al.*, 1998). Der Luciferasegehalt wurde enzymatisch bestimmt. In diesem Test erhöhte S803 konzentrationsabhängig die Reporterexpression mit einer $EC_{50} = 0,14 \mu\text{mol/l}$. Zur Bestätigung, dass diese eNOS-Transkriptionsaktivierung auch zu einer eNOS-Proteinexpressionserhöhung führt, wurden Endothelzellen – wie bei Wohlfart *et al.* 1997 beschrieben – aus humanen Nabelschnüren als Primärkultur angelegt. Die Zellen wurden mit S803 inkubiert und sodann die eNOS-Proteinexpression mit einem spezifischen Western-Blot bestimmt. S803 erhöhte in diesem zellulären Test die eNOS-Proteinexpression mit einer EC_{50} zwischen 0,3–1 $\mu\text{mol/l}$.

Des Weiteren wurden bisher verschiedene Spezifitätstests mit S803 durchgeführt. So wurde bei der Firma CEREP (Paris, Frankreich) die Substanz bei einer Konzentration von 10 $\mu\text{mol/l}$ auf Bindung an eine repräsentative Auswahl aus 50 G-Protein-gekoppelten-Rezeptoren geprüft und zeigte dabei keinerlei Bindung. Ferner wurden 20 Standardenzyme, u. a. eNOS, iNOS, Phosphodiesterasen und Cyclooxygenasen mit S803 (10 $\mu\text{mol/l}$) inkubiert, ohne dass dabei eine Inhibition auftrat. Diese, aber auch andere hier nicht angeführte Ergebnisse weisen darauf hin, dass S803 spezifisch als eNOS-Transkriptionsverstärker in Endothelzellen zu einer Steigerung der Expression der endothelialen NO-Synthase führt. Ein entsprechendes Rezeptorprotein bzw. ein Signaltransduktions-Mechanismus ist bisher noch nicht bekannt, wobei gängige Rezeptoren bzw. Enzyme ausgeschlossen werden konnten.

Die Wirkung des eNOS-Transkriptionsverstärkers wurde nach einer subchronischen Behandlung der Tiere im Langendorff-Modell getestet. Hierzu wurde die Substanz in einer Hydroxyethylzellulose-Lösung (HEC 0,5%) suspendiert und zwei Stunden nassgemahlen. Die so erhaltene Suspension wurde vor jeder Applikation durch ein 15-minütiges Rühren homogenisiert. Die Applikation erfolgte vier Tage lang einmal täglich morgens per Schlundsonde in drei verschiedenen Dosen (3, 10 und 30 mg/kg KG). Die Untersuchung im isoliert-perfundierten Herzen erfolgte am vierten Behandlungstag.

2.9 VERSUCHSPLAN

2.9.1 Etablierungsstudie: PMN-induzierter Reperfusionsschaden

Für die Etablierung und Validierung des Ischämie/Reperfusion-Modells wurden insgesamt 48 Rattenherzen im Langendorff-Modell untersucht.

Das Studiendesign sah folgendermaßen aus:

Etablierungsstudie	Gruppenbezeichnung	n
Nicht-ischämische Kontrollherzen	Sham	12
Ischämische Kontrollherzen	I/R	12
PMN-perfundierte Herzen	I/R + PMN	12
PMN-perfundierte, CD18-AK-behandelte Herzen	I/R + PMN + CD18	12

Die Herzen der ischämischen Kontrollgruppe und die der PMN-perfundierten Gruppe durchliefen eine globale Ischämie mit anschließender Reperfusion (I/R). Die Herzen der nicht-ischämischen Kontrollgruppe wurden über den gleichen Versuchszeitraum kontinuierlich mit Nährlösung perfundiert. Nach der Untersuchung im Langendorff-Modell wurden einige Herzen zur Zytokinbestimmung in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bei den übrigen Herzen erfolgte eine Infarktgrößenbestimmung. Für eine Creatinkinase- und Lactatdehydrogenasebestimmung wurden in jedem Versuch zu acht definierten Zeitpunkten Effluat gesammelt. Die Validierung des Modells erfolgte mit einem CD18-Antikörper.

2.9.2 Behandlungsstudie: eNOS-Transkriptionsverstärker S803

Es wurde der Einfluss des eNOS-Transkriptionsverstärkers S803 auf den PMN-induzierten Reperfusionsschaden untersucht. Hierbei diente der HMG-CoA-Reduktase-Hemmer Simvastatin als Positivkontrolle für einen NO-abhängigen Wirkungsmechanismus. Die Ratten wurden einmal täglich vier Tage lang mit jeweils einer der beiden Untersuchungssubstanzen behandelt. Die Tiere der Kontrollgruppe erhielten den Substanzgruppen entsprechende Volumina des Vehikels. Zur Bestimmung der Plasmaspiegel erfolgte vor der Untersuchung im Langendorff-Modell

eine Blutentnahme an den S803-behandelten Tieren. Insgesamt wurden 51 Rattenherzen im Langendorff-Modell untersucht.

Das Studiendesign sah folgendermaßen aus:

Behandlungsstudie	Gruppenbezeichnung	n
Nicht-ischämische Kontrollherzen	Sham	11
Ischämische Kontrollherzen	I/R	11
PMN-perfundierte Herzen	I/R + PMN	11
PMN-perfundierte, Simvastatin-behandelte Herzen	I/R + PMN + Sim	11
PMN-perfundierte, S803-behandelte Herzen	I/R + PMN + S803	7

Ferner wurden in einer weiteren Versuchsreihe die Effekte der gleichen Substanzen auf die Endothelfunktion isolierter Rattenherzen untersucht.

Das Studiendesign sah folgendermaßen aus:

Behandlungsstudie	Gruppenbezeichnung	n
Placebo-behandelte Herzen	Placebo	7
Simvastatin 2 mg/kg/d-behandelte Herzen	Sim 2 mg/kg	5
Simvastatin 2 mg/kg/d-beh. Herz. + L-NAME 30 µM	Sim + L-NAME	6
S803 3, 10, 30 mg/kg/d-behandelte Herzen	S803 3, 10, 30 mg/kg	6
S803 30 mg/kg/d-beh. Herzen + L-NAME 30 µM	S803 + L-NAME	6

Im Anschluss an die Untersuchungen im Langendorff-Modell wurden die Herzen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur molekularbiologischen Bestimmung der eNOS-Proteinexpression bei -80 °C aufbewahrt.

2.10 AUSWERTUNG UND STATISTIK

Die Versuchsergebnisse werden als Mittelwerte und dem Standardfehler des Mittelwertes angegeben (**SEM** für **Standard Error of the Mean**). Die Anzahl der Experimente wird mit "n" angegeben. Die Berechnungen erfolgten mit Hilfe einer geeigneten Software (GraphPad Prism, Version 3.0). Ebenso wurden alle Diagramme mit diesem Programm erstellt.

Bei den Ischämie-Versuchen werden die Ergebnisse prozentual auf den jeweiligen prä-ischämischen Ausgangswert bezogen. Sofern die Daten normalverteilt waren, wurden sie mit Hilfe des gepaarten Student t-Tests oder mit dem multiplen t-Test, nach Bonferroni adjustiert, auf Signifikanz geprüft. Waren die Daten nicht normalverteilt, erfolgte die statistische Untersuchung mit Hilfe des Kruskal-Wallis-Tests. Unterschiede mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von kleiner 5% ($P < 0,05$) wurden als signifikant erachtet. Signifikanzen sind im Folgenden mit *, + oder # gekennzeichnet.

3 ERGEBNISSE

3.1 ETABLIERUNGSSTUDIE: PMN-INDUZierter REPERFUSIONSSCHADEN

3.1.1 Vorversuche

Ziel der Vorversuche war es, das Modell zur Erfassung des PMN-induzierten Reperfusionsschaden zu standardisieren und Bedingungen zu schaffen, unter welchen die hämodynamischen Parameter möglichst konstant bleiben.

Wie in Kapitel 2.6.3.1 bereits beschrieben, wurden während eines Experiments am isoliert-perfundierten Rattenherzen die folgenden Parameter der Hämodynamik erfasst: der Koronarfluss (CF), die Herzfrequenz (HF), der linksventrikuläre systolische (LVP_{sys}), der linksventrikuläre diastolische Druck (LVP_{dia}), die sich daraus ableitende linksventrikuläre Druckentwicklung (LVDP) sowie die Kontraktilität (dP/dt_{max} und PRP) und die Relaxation (dP/dt_{min}).

3.1.1.1 Versuchsdauer und Hämodynamik

Um das Modell zu charakterisieren, wurde zunächst im Rahmen von Vorversuchen der Einfluss der Versuchslänge auf die Stabilität der hämodynamischen Parameter untersucht. Hierzu wurden sechs Herzen über einen Zeitraum von 120 Minuten mit Krebs-Bicarbonat-Nährlösung perfundiert. Der Kontrollwert wurde im Anschluss an die Äquilibrationsphase erfasst und entspricht dem Zeitpunkt Null der Perfusion.

Sämtliche Parameter wiesen erwartungsgemäß nach 120 Minuten Perfusion nur einen geringfügigen Abfall auf. Dabei waren die Parameter der Kontraktilität (LVDP, dP/dt_{max} , PRP) im Vergleich zum Kontrollwert um 16% signifikant reduziert. Die übrigen Parameter wiesen dagegen eine Senkung lediglich von 5–10% auf. Diese war nicht signifikant (siehe Tabelle 2).

Tabelle 2: Hämodynamik isoliert-perfundierter Langendorff-Herzen unter basalen, nicht-ischämischen Bedingungen; 120 Minuten Perfusion

Messparameter (n = 6)	Kontrollwert 0. Minute	Perfusion 60. Minute	Perfusion 120. Minute
HF [bpm]	305 ± 8,3	291 ± 4,7	286 ± 5,8
LVP _{sys} [mm Hg]	100 ± 3,1	94,2 ± 2,7	89,4 ± 2,5
LVP _{dia} [mm Hg]	11,0 ± 0,6	10,9 ± 0,5	10,1 ± 0,4
LVDP [mm Hg]	90,6 ± 2,7	81,9 ± 2,4	77,8 ± 3,3 *
dP/dt _{max} [mm Hg/s]	2706 ± 96,9	2663 ± 74,4	2260 ± 86,2
dP/dt _{min} [mm Hg/s]	-1973 ± 84,7	-1881 ± 57,3	-1801 ± 84,2
PRP [mm Hg/min]	27,0 ± 0,7	24,4 ± 0,6	22,6 ± 0,8 *
CF [ml/min]	14,3 ± 1,2	13,8 ± 1,1	12,3 ± 0,3

Dargestellt sind die Herzfrequenz (HF), der linksventrikuläre systolische und diastolische Druck (LVP_{sys}, LVP_{dia}), die linksventrikuläre Druckentwicklung (LVDP), die Kontraktilität (dP/dt_{max}) und die Relaxation (dP/dt_{min}), das „Pressure Rate Product“ (PRP) und der Koronarfluss (CF). Aufgeführt sind der Zeitpunkt 0 sowie die 60. und 120. Minute des gesamten Beobachtungszeitraums ($\bar{x} \pm \text{SEM}$; *: $P < 0,05$ vs. Kontrollwert).

3.1.1.2 PMNs, fMLP, Thrombin und Hämodynamik

In einer weiteren Vorversuchsreihe wurde der Einfluss des chemotaktischen Peptids fMLP, von Thrombin und von den PMNs auf die Hämodynamik nicht-ischämischer Herzen untersucht. Hierzu wurden jeweils sechs Herzen über einen Zeitraum von 40 Minuten perfundiert. Die Zugabe der jeweiligen Substanz bzw. der Blutzellen erfolgte über einen Zeitraum von zehn Minuten ab der 20. Perfusionsminute.

Repräsentativ für die Funktionalität der Herzen sind in Tabelle 3 die Messwerte von LVDP, dP/dt_{max} und CF aufgeführt. Die Untersuchungen zeigten, dass weder die PMNs noch das chemotaktische Peptid fMLP oder Thrombin einen signifikanten Einfluss auf die mechanische Funktionalität der isoliert-perfundierten Herzen hatten.

Tabelle 3: Einfluss von fMLP, Thrombin und PMNs auf die Hämodynamik isoliert-perfundierter Langendorff-Herzen

Versuchsgruppe (n = 6)	LVDP [mm Hg]	dP/dt _{max} [mm Hg/s]	CF [ml/min]
Nährlösung	94,5 ± 6,7	2964 ± 183	14,2 ± 1,5
+ fMLP (50 nM)	106,0 ± 6,3	3098 ± 191	14,0 ± 1,2
+ Thrombin (0,3 U/ml)	91,0 ± 8,4	2789 ± 110	12,0 ± 1,3
+ PMNs (50–60 Mio.)	100,1 ± 9,5	2975 ± 160	13,8 ± 2,1

Exemplarisch für die Funktionalität der Herzen sind die linksventrikuläre Druckentwicklung (LVDP), die Kontraktilität (dP/dt_{max}) und der Koronarfluss (CF) dargestellt. Aufgeführt ist die 20. Minute nach Substanzgabe ($\bar{x} \pm SEM$).

3.1.1.3 PMN-Vitalitätsbestimmung

Aufgrund der schonenden Zell-Gewinnungsmethode lag der Anteil an nicht lebensfähigen Zellen unter 5%. Um auszuschließen, dass die Inkubation mit dem chemotaktischen Peptid fMLP einen Einfluss auf die Zellsterberate nahm, wurde nach der fMLP-Inkubation ebenfalls eine Trypanblaufärbung durchgeführt. Die Inkubation mit fMLP hatte eine schwache Abnahme der lebenden Zellen zur Folge, jedoch blieb auch in diesem Fall die Sterberate unter 5%.

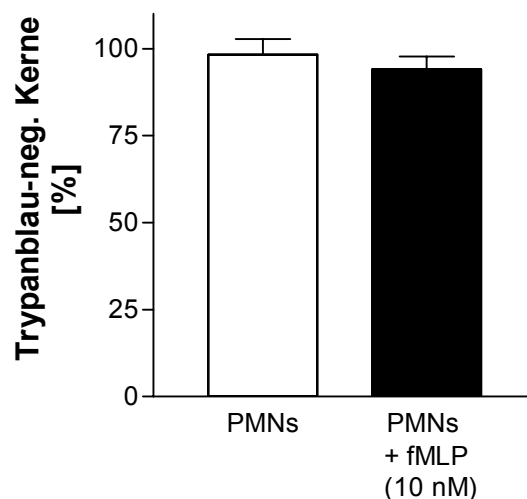


Abbildung 9: Vitalitätsbestimmung mittels Trypanblaufärbung

Die PMNs wurden direkt nach Gewinnung bzw. nach 10-minütiger fMLP-Inkubation lichtmikroskopisch untersucht ($\bar{x} \pm SEM$; n = 6).

3.1.2 Ergebnisse der Hämodynamikmessung

In der Etablierungsstudie wurden 48 isoliert-perfundierte Rattenherzen folgender Gruppeneinteilung (n = 12) untersucht: ischämische Kontrollgruppe (I/R) und PMN-perfundierte Gruppe (I/R + PMN). Die Validierung des Modells erfolgte mittels Inkubierung der PMNs mit einem CD11/18-Antikörper (I/R + PMN + CD18). Hierbei sollte der Antikörper das PMN-Adhäsionsmolekül CD11/18 blockieren und auf diese Weise eine endotheliale leukozytäre Interaktion unterbinden, um schließlich einen leistungsmindernden Effekt durch die PMNs wieder aufzuheben. Für die Bestimmung der CK/LDH-Konzentrationen sowie der Zytokinkonzentrationen wurden zusätzlich nicht-ischämische Kontrollherzen (Sham; n = 12) im Langendorff-Modell untersucht.

3.1.2.1 Herzfrequenz

In der Kontrollgruppe war die Herzfrequenz am Ende der Reperfusion gegenüber der prä-ischämischen Herzfrequenz nicht signifikant verändert. Die Zellperfusion zeigte in der PMN-perfundierten Gruppe keinen Einfluss auf die Herzfrequenz. Auch in dieser Gruppe war die Herzfrequenz am Ende der Reperfusion gegenüber der prä-ischämischen Herzfrequenz nicht signifikant verändert. Die Applikation der CD11/18-Antikörper-vorbehandelten PMNs hatte ebenfalls keinen Einfluss auf die Herzfrequenz (siehe Tabelle 4).

Tabelle 4: Herzfrequenz (HF) isoliert-perfundierter Langendorff-Herzen nach 30 Minuten Ischämie (I) und 60 Minuten Reperfusion (R)

Versuchsgruppe	HF [bpm]	
	Ausgangswert	Endwert
I/R (n = 12)	275 ± 5,3	262 ± 4,3
I/R + PMN (n = 12)	278 ± 10,0	261 ± 15,2
I/R + PMN + CD18 (n = 12)	285 ± 10,8	272 ± 14,9

Aufgeführt sind die prä-ischämischen Ausgangswerte und die Endwerte nach beendeter Reperfusion ($\bar{x} \pm SEM$). Untersucht wurden Kontrollherzen (I/R), PMN-perfundierte Herzen (I/R + PMN) und CD11/18-AK-behandelte PMN-perfundierte Herzen (I/R + PMN + CD18).

3.1.2.2 Linksventrikulärer Druck

Die Erfassung des linksventrikulären Drucks in isoliert-perfundierten Langendorff- Herzen erfolgte mittels isovolumetrischer Herzinnendruckmessung. Hierbei wurden der linksventrikuläre systolische und der diastolische Druck (LVP_{dia} und LVP_{sys}) gemessen. Rechnerisch ergab sich aus diesen beiden Werten die linksventrikuläre Druckentwicklung (LVDP).

Die Parameter der drei untersuchten Gruppen I/R, I/R + PMN, I/R + PMN + CD18 unterschieden sich nicht signifikant in ihren prä-ischämischen Ausgangswerten (siehe Tabelle 5 A und B).

30 Minuten Ischämie und die zellfreie Reperfusion hatten keinen signifikanten Einfluss auf den LVP_{sys} . Dagegen war der LVP_{dia} am Ende der zellfreien Reperfusion gegenüber dem prä-ischämischen diastolischen Ausgangsdruck signifikant erhöht. Sowohl der LVP_{sys} als auch der LVP_{dia} der PMN-perfundierten Herzen waren gegenüber den zellfreien Kontrollherzen signifikant verschlechtert (siehe Tabelle 5 A).

Die Gabe des CD11/18-Antikörpers verbesserte den LVP_{sys} gegenüber der unbehandelten PMN-Gruppe. Während die prozentuale funktionelle Erholung des LVP_{sys} am Ende der Reperfusion in der unbehandelten PMN-perfundierten Gruppe ($71 \pm 6,6\%$) im Vergleich zur zellfreien Kontrollgruppe ($97 \pm 5,3\%$) signifikant reduziert war, konnte mittels CD11/18-Antikörper-Behandlung ($88 \pm 2,7\%$) kein signifikanter Unterschied zur zellfreien Kontrollgruppe mehr festgestellt werden. Des Weiteren verminderte die CD11/18-Antikörper-Applikation den unter PMN-Perfusion beobachteten post-ischämischen Anstieg des LVP_{dia} . Hierbei wiesen die Herzen unter CD11/18-Behandlung eine ähnliche Erhöhung des LVP_{dia} ($82 \pm 4\%$) auf wie unter zellfreien Kontrollbedingungen ($98 \pm 3\%$). Dagegen zeigten die Herzen der unbehandelten PMN-Gruppe einen deutlich höheren Anstieg ($233 \pm 11\%$) des LVP_{dia} (siehe Tabelle 5 A).

Tabelle 5: (A) Linksventrikulärer systolischer und diastolischer Druck (LVP_{sys} und LVP_{dia}) und (B) linksventrikuläre Druckentwicklung (LVDP) isoliert-perfundierter Langendorff-Hezen nach 30 Minuten Ischämie (I) und 60 Minuten Reperfusion (R)

A

Versuchsgruppe	LVP_{sys} [mm Hg]		LVP_{dia} [mm Hg]	
	Ausgangswert	Endwert	Ausgangswert	Endwert
I/R (n = 12)	118 ± 6,6	113 ± 5,5	11,6 ± 0,5	23,1 ± 4,6 ⁺
I/R + PMN (n = 12)	122 ± 9,6	82,3 ± 5,0 ⁺ *	11,8 ± 0,3	39,3 ± 4,0 ⁺ *
I/R + PMN + CD18 (n = 12)	107 ± 8,1	92,8 ± 5,9	12,1 ± 0,5	22,1 ± 1,5 ⁺ #

B

Versuchsgruppe	LVDP [mm Hg]	
	Ausgangswert	Endwert
I/R (n = 12)	107 ± 6,5	93,8 ± 5,8
I/R + PMN (n = 12)	110 ± 9,5	43,0 ± 3,6 ⁺ *
I/R + PMN + CD18 (n = 12)	95,2 ± 8,0	70,7 ± 5,2 ⁺ #

Aufgeführt sind die prä-ischämischen Ausgangswerte und die Endwerte nach beendeter Reperfusion. Untersucht wurden die Kontrollherzen (I/R), die PMN-perfundierten Herzen (I/R + PMN) und die CD11/18-AK-behandelten PMN-perfundierten Herzen (I/R + PMN + CD18) ($\bar{x} \pm SEM$; ⁺: $P < 0,05$ vs. Ausgangswert; ^{*}: $P < 0,05$ vs. I/R; [#]: $P < 0,05$ vs. I/R + PMN).

Beispielhaft für den zeitlichen Verlauf eines linksventrikulären Parameters über den gesamten Versuchszeitraum ist der LVDP in Abbildung 10 dargestellt: Mit Einsetzen der Ischämiephase fiel der LVDP in den drei Gruppen unmittelbar auf Null ab und erholte sich unterschiedlich stark mit Beginn der Reperfusion. In der Kontrollgruppe ohne PMNs erholte sich der LVDP schon nach fünf Minuten Reperfusion auf über 50% des Ausgangswertes und erreichte mit Ende der Reperfusion $87 \pm 4,5\%$ des prä-ischämischen Ausgangswertes.

In der PMN-perfundierten Gruppe war der LVDP gegenüber dem der Kontrollgruppe zu jedem Zeitpunkt des gesamten post-ischämischen Beobachtungszeitraums signifikant reduziert und erreichte nach beendeter Reperfusion lediglich $41 \pm 3,4\%$ des prä-ischämischen Ausgangsdrucks.

Die Behandlung mit dem CD11/18-Antikörper resultierte ab der 10. Reperfusionsminute in einer signifikanten Verbesserung der Funktionalität. Am Ende der Reperfusion betrug der LVDP $79 \pm 4,5\%$ des Ausgangsdrucks.

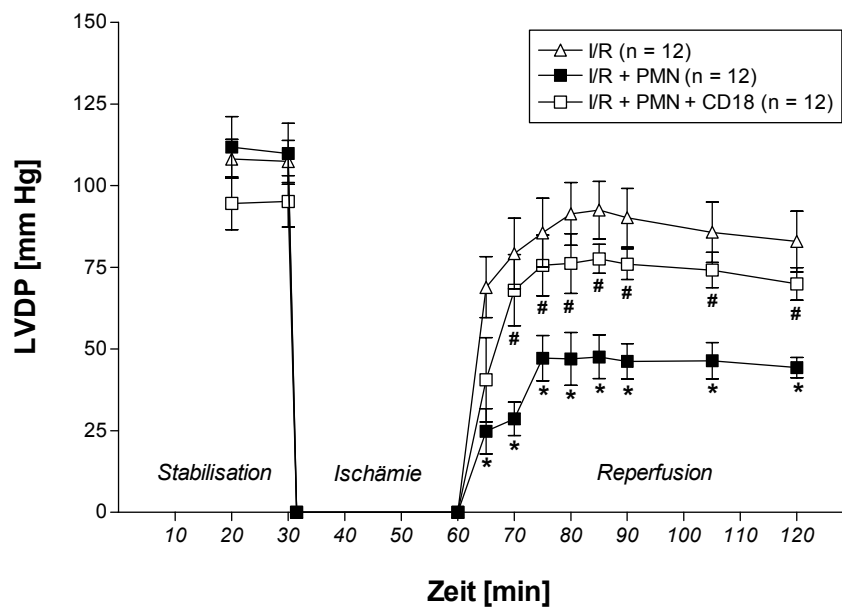


Abbildung 10: Linksventrikuläre Druckentwicklung (LVDP) isoliert-perfundierter Langendorff- Herzen nach 30 Minuten Ischämie (I) und 60 Minuten Reperfusion (R)
 Aufgeführt sind die Kontrollherzen (I/R), die PMN-perfundierten Herzen (I/R + PMN) und die CD11/18-AK-behandelten PMN-perfundierten Herzen (I/R + PMN + CD18). Dargestellt ist der zeitliche Verlauf des gesamten Beobachtungszeitraums ($\bar{x} \pm SEM$; *: $P < 0,05$ vs. I/R; #: $P < 0,05$ vs. I/R + PMN).

3.1.2.3 Kontraktilität und Relaxation

Als Maß für die Kontraktilität wurden die maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit (dP/dt_{max}) und das so genannte „Pressure Rate Product“ (PRP) gemessen. Die Relaxation wurde als maximale Druckabfallsgeschwindigkeit (dP/dt_{min}) erfasst.

Die drei Parameter der untersuchten Gruppen wiesen in ihren prä-ischämischen Ausgangswerten keine signifikanten Unterschiede auf. Nach 30 Minuten globaler Ischämie und 60 Minuten zellfreier Reperfusion waren alle drei Parameter gegenüber ihren prä-ischämischen Ausgangswerten signifikant reduziert (Tabelle 6 A und B).

Tabelle 6: (A) Maximale Druckanstiegs- und -abfallsgeschwindigkeit (dP/dt_{max} und dP/dt_{min}) und (B) „Pressure Rate Product“ (PRP) isoliert-perfundierter Langendorff-Herzen nach 30 Minuten Ischämie (I) und 60 Minuten Reperfusion (R)

A

Versuchsgruppe	dP/dt_{max} [mm Hg/s]		dP/dt_{min} [mm Hg/s]	
	Ausgangswert	Endwert	Ausgangswert	Endwert
I/R (n = 12)	3098 ± 191	2484 ± 161 ⁺	-2330 ± 159	-1789 ± 108 ⁺
I/R + PMN (n = 12)	3353 ± 284	1269 ± 78 ⁺⁺	-2418 ± 199	-865 ± 63 ⁺⁺
I/R + PMN + CD18 (n = 12)	2973 ± 185	2217 ± 160 ^{+#}	-2222 ± 152	-1518 ± 108 ^{+#}

B

Versuchsgruppe	PRP [mm Hg/min]	
	Ausgangswert	Endwert
I/R (n = 12)	30,1 ± 2,1	23,8 ± 1,5 ⁺
I/R + PMN (n = 12)	30,7 ± 3,0	11,4 ± 1,1 ⁺⁺
I/R + PMN + CD18 (n = 12)	26,9 ± 2,1	19,5 ± 1,5 ^{++ #}

Aufgeführt sind die prä-ischämischen Ausgangswerte und die Endwerte nach beendeter Reperfusion. Untersucht wurden die Kontrollherzen (I/R), die PMN-perfundierten Herzen (I/R + PMN) und die CD11/18-AK-behandelten PMN-perfundierten Herzen (I/R + PMN + CD18) ($\bar{x} \pm SEM$; ⁺: $P < 0,05$ vs. Ausgangswert; ⁺: $P < 0,05$ vs. I/R; [#]: $P < 0,05$ vs. I/R + PMN).

Durch die post-ischämische PMN-Applikation wurde sowohl die myokardiale Kontraktion (PRP) als auch die Relaxation (dP/dt_{min}) signifikant verschlechtert. Die funktionelle Erholung beider Parameter war am Ende der Reperfusion im Vergleich zu den Herzen der Kontrollgruppe (PRP: $79 \pm 5\%$; dP/dt_{min} : $77 \pm 6\%$) signifikant reduziert (PRP: $37 \pm 7\%$; dP/dt_{min} : $35 \pm 6\%$).

Unter CD11/18-Antikörper-Behandlung waren beide Parameter am Ende der Reperfusion gegenüber der unbehandelten PMN-Gruppe (PRP: $74 \pm 5\%$; dP/dt_{min} : $68 \pm 4\%$) deutlich verbessert, so dass zu den zellfreien Kontrollherzen kein signifikanter Unterschied mehr festzustellen war (siehe Tabelle 6 A und B).

Repräsentativ für die Parameter der Kontraktionskraft ist der zeitliche Verlauf des dP/dt_{max} während des gesamten Versuchs in Abbildung 11 dargestellt: Mit einsetzender Ischämie fiel das dP/dt_{max} in den untersuchten Gruppen unmittelbar auf Null ab und erholte sich unterschiedlich stark mit Beginn der Reperfusion. Hierbei

erholte sich das dP/dt_{max} der zellfreien Kontrollherzen bereits nach fünf Minuten Reperfusion auf annähernd 40% der Ausgangskontraktilität: Diese stieg bis zur 25. Minute stetig an und wies am Ende der Reperfusion eine funktionelle Erholung von $80 \pm 3,5\%$ des prä-ischämischen Ausgangswertes auf (siehe Tabelle 6 A).

In den PMN-perfundierten Herzen zeigte sich ein länger anhaltender post-ischämischer Kontraktilitätsverlust als in den zellfreien Kontrollherzen. Dementsprechend war das dP/dt_{max} gegenüber dem der zellfreien Kontrollherzen zu jedem Zeitpunkt der Reperfusion signifikant reduziert und wies nach fünf Minuten Reperfusion lediglich 10% und mit Ende der Reperfusion $38 \pm 5\%$ der prä-ischämischen Ausgangskontraktilität auf (siehe Tabelle 6 A).

Die Behandlung mit dem CD11/18-Antikörper führte zu einer signifikanten Verbesserung der kardialen Kontraktilität im Vergleich zu den Herzen der unbehandelten PMN-perfundierten Gruppe. Das dP/dt_{max} unterschied sich zu keinem Zeitpunkt des post-ischämischen Beobachtungszeitraums signifikant von dem dP/dt_{max} der zellfreien Kontrollgruppe und erreichte mit Ende der Reperfusion $75 \pm 4\%$ des Ausgangsdruck.

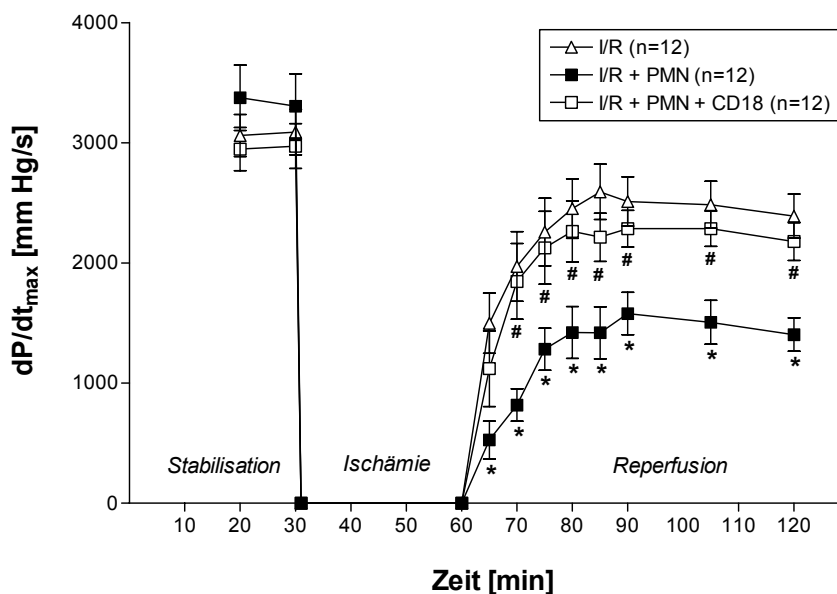


Abbildung 11: Maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit (dP/dt_{max}) isoliert-perfundierter Langendorff-Herzen nach 30 Minuten Ischämie (I) und 60 Minuten Reperfusion (R)

Aufgeführt sind die Kontrollherzen (I/R), die PMN-perfundierten Herzen (I/R + PMN) und die CD11/18-AK-behandelten PMN-perfundierten Herzen (I/R + PMN + CD18). Dargestellt ist der zeitliche Verlauf des gesamten Beobachtungszeitraums ($\bar{x} \pm SEM$; *: $P < 0,05$ vs. I/R; #: $P < 0,05$ vs. I/R + PMN).

3.1.2.4 Koronarfluss

Die Bestimmung des Koronarflusses ergab in den drei untersuchten Gruppen eine signifikante Verminderung der Werte nach beendeter Reperfusion im Vergleich zu den prä-ischämischen Ausgangswerten (siehe Tabelle 7).

Wie zuvor schon bei den anderen hämodynamischen Parametern beobachtet, wurde auch der post-ischämische Koronarfluss durch Zugabe der PMNs gegenüber dem der zellfreien Kontrollherzen signifikant verschlechtert. Die prozentuale funktionelle Erholung des Koronarflusses dieser Gruppe war im Vergleich zur zellfreien Kontrollgruppe um knapp 30% signifikant reduziert (siehe Tabelle 7).

Die Behandlung mit dem CD11/18-Antikörper verhinderte eine Reduktion des Koronarflusses durch die post-ischämische PMN-Applikation. Nach beendeter Reperfusion unterschied sich der Koronarfluss dieser Herzen nicht signifikant von dem Koronarfluss der zellfreien Kontrollherzen (siehe Tabelle 7).

Tabelle 7: Koronarfluss (CF) isoliert-perfundierter Langendorff-Herzen nach 30 Minuten Ischämie (I) und 60 Minuten Reperfusion (R)

Versuchsgruppe	CF [ml/min]	
	Ausgangswert	Endwert
I/R (n = 12)	12,4 ± 0,7	10,1 ± 0,5 ⁺
I/R + PMN (n = 12)	13,6 ± 7,3	7,3 ± 0,8 ^{+ *}
I/R + PMN + CD18 (n = 12)	14,5 ± 1,2	10,1 ± 0,8 ^{+ #}

Aufgeführt sind die prä-ischämischen Ausgangswerte und die Endwerte nach beendeter Reperfusion. Untersucht wurden die Kontrollherzen (I/R), die PMN-perfundierten Herzen (I/R + PMN) und die CD11/18-AK-behandelten PMN-perfundierten Herzen (I/R + PMN + CD18) ($\bar{x} \pm SEM$; ⁺: $P < 0,05$ vs. Ausgangswert; ^{}: $P < 0,05$ vs. I/R; [#]: $P < 0,05$ vs. I/R + PMN).*

3.1.3 Bestimmung der Zytokinfreisetzung

Eine Ischämie mit nachfolgender Reperfusion ist unter anderem charakterisiert durch die Freisetzung von Zytokinen im myokardialen Gewebe. In dem hier verwendeten Modell stellen die infundierten PMNs eine weitere Zytokinquelle dar. Aus der Literatur ist bekannt, dass IL-1 β und TNF- α die Funktionalität des Herzens beeinträchtigen können. Es galt, den Zusammenhang zwischen Funktionseinschränkung und Zytokinkonzentrationen im Gewebe zu untersuchen.

Im Vergleich zu den nicht-ischämischen Kontrollherzen wiesen die ischämischen PMN-freien Kontrollherzen signifikant erhöhte Zytokinwerte auf (siehe Abbildung 12). Die Zugabe der PMNs führte zu einem weiteren signifikanten Anstieg der myokardialen Zytokinkonzentrationen im Vergleich zu den ischämischen und nicht-ischämischen Kontrollherzen ohne PMNs.

Sowohl die TNF- α - als auch die IL-1 β -Konzentration wurden unter der CD11/18-Antikörper-Behandlung im Vergleich zu den Herzen der unbehandelten PMN-Gruppe signifikant reduziert. Dabei unterschieden sich die Zytokinkonzentrationen der CD11/18-AK-behandelten Herzen nicht signifikant von denen der PMN-freien ischämischen Kontrollherzen. Die gemessene TNF- α -Konzentration (pg/ml) betrug in den nicht-ischämischen Kontrollherzen $4,3 \pm 4,7$; in den ischämischen Kontrollherzen $32,0 \pm 7,7$; in den ischämischen PMN-perfundierten Herzen $120,2 \pm 22,6$ und in den ischämischen CD11/18-AK-behandelten PMN-perfundierten Herzen $31,0 \pm 4,8$.

In allen untersuchten Gruppen waren die IL-1 β -Konzentrationen mindestens doppelt so hoch wie die TNF- α -Konzentrationen (pg/ml): nicht-ischämische Kontrollherzen $44,3 \pm 14,7$; ischämische Kontrollherzen $87,7 \pm 26,2$; ischämische PMN-perfundierte Herzen $324,6 \pm 75,7$ und ischämische CD11/18-AK-behandelte PMN-perfundierte Herzen $122,0 \pm 19,6$.

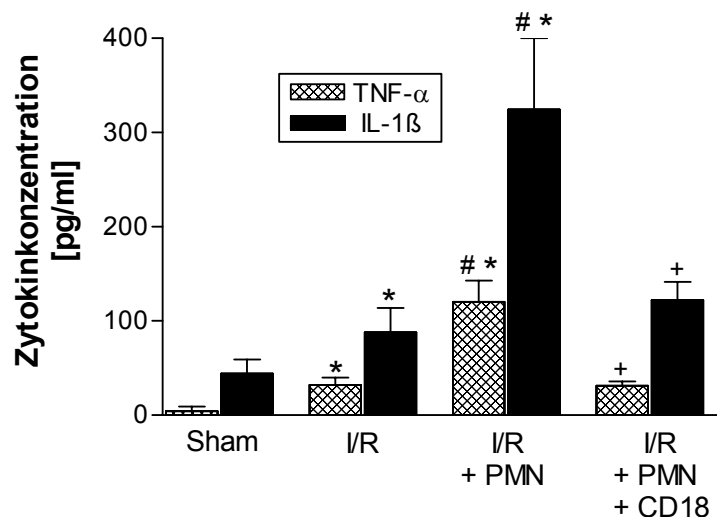


Abbildung 12: Zytokinfreisetzung (IL-1 β und TNF- α) isoliert-perfundierter Langendorff-Herzen nach 30 Minuten Ischämie (I) und 60 Minuten Reperfusion (R)

Aufgeführt sind die Herzen der nicht-ischämischen (Sham) und der ischämischen Kontrollgruppe (I/R), die PMN-perfundierten Herzen (I/R + PMN) und die CD11/18-AK-behandelten PMN-perfundierten Herzen (I/R + PMN + CD18) ($\bar{x} \pm SEM$; $n = 6$; *: $P < 0,05$ vs. Sham; #: $P < 0,05$ vs. I/R; +: $P < 0,05$ vs. I/R + PMN).

3.1.4 Bestimmung der Infarktgröße und der Zellschädigung

Die Bestimmung der Infarktgröße wurde planimetrisch nach einer TTC-Färbung direkt im Anschluss an die Versuche im isolierten Langendorff-Modell durchgeführt. Ferner wurde aus den im Versuch gewonnenen Effluaten die Konzentration der Creatinkinase und der Lactatdehydrogenase bestimmt. Es handelt sich hierbei um Enzyme, die unmittelbar bei einer Zellschädigung aus der Zelle ausgeschwemmt werden. Ihre Bestimmung wird standardmäßig zur Ermittlung sarkolemmaler Zellschädigungen angewandt.

3.1.4.1 Infarktgröße

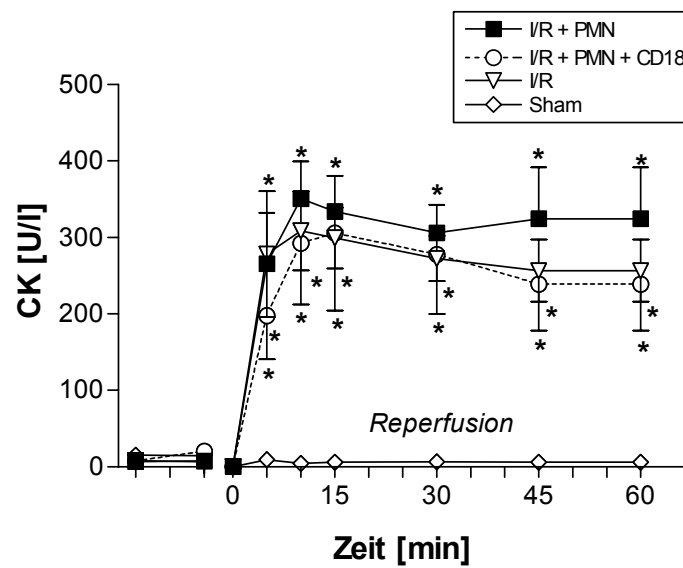
Bei der planimetrischen Bestimmung der Infarktgröße wiesen die Herzen der Kontrollgruppe (I/R) eine durchschnittliche Infarktgröße von $19,7 \pm 1,8\%$ auf. Die Infusion der PMNs zeigte in dem Modell keinen Einfluss auf die Infarktgröße ($23,9 \pm 1,9\%$). Daher wurde bei der mit CD11/18-Antikörper behandelten Gruppe auf diese Untersuchung verzichtet.

3.1.4.2 Creatinkinase und Lactatdehydrogenase

Zu folgenden Zeitpunkten wurden Koronareffluats der isoliert-perfundierten Rattenherzen für die Messung der Creatinkinase (CK) und der Lactatdehydrogenase (LDH) gesammelt: Minute 20 und 30 der Stabilisationsphase sowie Minute 5, 10, 15, 30, 45 und 60 der Reperusionsphase.

Die nicht-ischämischen Kontrollherzen (Sham) wiesen über den gesamten Versuchszeitraum CK-Werte knapp über der Nachweisgrenze auf (siehe Abbildung 13 A). Alle ischämischen Gruppen hingegen zeigten mit Einsetzen der Reperfusion einen drastischen Anstieg der CK-Werte um das Zweihundertfünzigfache des prä-ischämischen Ausgangswertes. In der zehnten Reperusionsminute wurden die höchsten Werte erreicht. Diese waren bei allen ischämischen Gruppen im Vergleich zur nicht-ischämischen Kontrollgruppe um ca. das Dreihundertfache erhöht. In den darauffolgenden 45 Minuten sanken die Werte wieder leicht ab. Sie blieben jedoch während des restlichen Versuchverlaufs um ca. das Zweihundert- bis Dreihundertfache über dem prä-ischämischen Ausgangswert.

A



B

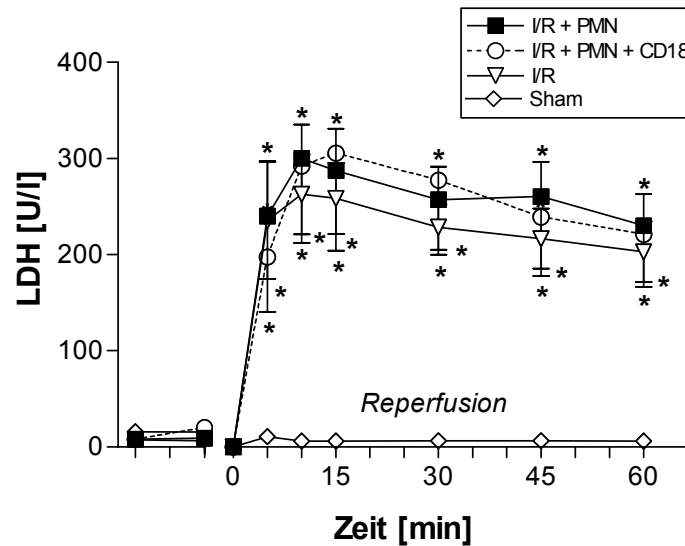


Abbildung 13: Sekretion von (A) Creatinkinase (CK) und (B) Lactatdehydrogenase (LDH) ins Koronareffluat isoliert-perfundierter Langendorff-Herzen nach 30 Minuten Ischämie (I) und 60 Minuten Reperfusion (R)

Aufgeführt ist der Zeitverlauf der Enzymkonzentrationen der Kontrollherzen (I/R), der PMN-perfundierten Herzen (I/R + PMN) und der CD11/18-AK-behandelten PMN-perfundierten Herzen (I/R + PMN + CD18). Die Ischämiephase ist durch eine Unterbrechung der x-Achse gekennzeichnet ($\bar{x} \pm \text{SEM}$; $n = 12$ *; $P < 0,05$ vs. Sham).

Die Enzymwerte der ischämischen Gruppen unterschieden sich während der Reperfusionsphase in keinem Zeitpunkt signifikant voneinander. Es konnte lediglich eine leichte Erhöhung der Werte in der PMN-perfundierten Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe nachgewiesen werden. Diese war jedoch nicht signifikant.

Die LDH-Werte verhielten sich analog zu denen der Creatinkinase (siehe Abbildung 13 B). Sie erreichten ebenfalls nach zehn Minuten Reperfusion ihren Höchstwert. Dieser war zweihundertfünfzig- bis dreihundertfach über dem prä-ischämischen Ausgangswert signifikant erhöht. In der restlichen Reperfusionszeit sanken die Werte bis auf ca. das Zweihundertfache wieder ab.

3.2 BEHANDLUNGSSTUDIE: ENOS-TRANSKRIPTIONSVERSTÄRKER

Bevor eine koronare Herzkrankheit manifest wird, treten bereits funktionelle Einschränkungen am Endothel auf. Die so genannte endotheliale Dysfunktion ist, wie eingangs erwähnt, charakterisiert durch eine verminderte NO-Synthese. In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst die Wirkung des endothelialen NO-Synthase-Transkriptionsverstärkers S803 auf die vasodilatierende Funktion des Endothels gesunder Rattenherzen während einer reaktiven Hyperämie untersucht. In einer weiteren Studie wurde die Wirkung derselben Substanz auf den PMN-induzierten Reperfusionsschaden im isoliert-perfundierten Rattenherzen untersucht. Als Positivkontrolle für eine NO-vermittelte Wirkung diente hierbei jeweils der HMG-CoA-Reduktase-Hemmer Simvastatin. Eine Plasmaspiegeluntersuchung belegte eine hinreichend hohe Substanzkonzentration im Blut der vorbehandelten Tiere.

3.2.1 Erfassung der Endothelfunktion

3.2.1.1 Ergebnisse der reaktiven Hyperämie-Versuche

Nach einer Okklusionsdauer von 20 Sekunden erreichte der post-ischämische Koronarfluss in allen untersuchten Gruppen mindestens das Doppelte des Initialflusses (siehe Tabelle 8). Dabei wiesen die Herzen der behandelten Gruppen lediglich eine tendenziell höhere prozentuale Koronarflusssteigerung gegenüber den Herzen der Placebogruppe auf. Weder Simvastatin noch S803 übten demnach einen

signifikanten Einfluss auf den in der reaktiven Hyperämie erreichten post-ischämischen Maximalfluss aus.

Tabelle 8: Koronarflussmessung während der reaktiven Hyperämie (RH) nach 20 Sekunden Ischämie in isoliert-perfundierten Langendorff-Herzen

		Vor RH	Während RH	
Versuchsgruppe (n = 6)		Initialfluss [ml/min]	Maximalfluss [ml/min]	Flusssteigerung [%]
Placebo		11,7 ± 0,9	21,9 ± 0,9 *	90,1 ± 14,4
Sim	2 mg/kg/d	10,9 ± 1,3	24,0 ± 1,5 *	124,0 ± 29,0
	2 mg/kg/d + L-NAME	8,2 ± 1,5 #	21,8 ± 3,2 *	168,6 ± 28,9 +
S803	3 mg/kg/d	12,8 ± 1,4	24,9 ± 1,0 *	104,5 ± 25,8
	10 mg/kg/d	11,1 ± 0,3	22,3 ± 1,3 *	105,6 ± 25,8
	30 mg/kg/d	11,9 ± 1,1	24,9 ± 1,4 *	115,0 ± 16,9
	30 mg/kg/d + L-NAME	8,7 ± 0,3 #	19,5 ± 3,1 *	123,7 ± 35,1

Untersucht wurden Kontrollherzen (Placebo), Simvastatin-behandelte (Sim) und S803-behandelte Herzen. Die Hemmung der reaktiven Hyperämie erfolgte mit L-NAME (30 µM) ($\bar{x} \pm SEM$, *: $P < 0,05$ vs. Initialfluss; +: $P < 0,05$ vs. Placebo; #: $P < 0,05$ vs. Behandlung ohne L-NAME).

Durch Verlängerung der Okklusionsdauer auf 60 Sekunden wurde in allen untersuchten Gruppen der Maximalfluss gegenüber der reaktiven Hyperämie nach 20 Sekunden Ischämie erhöht. Jedoch zeigten die Herzen der behandelten Gruppen auch bei diesem Versuchsprotokoll keine signifikanten Unterschiede in der prozentualen Flusssteigerung gegenüber den Placeboherzen (Tabelle 9).

Die Infusion des NO-Synthasehemmers L-NAME erzeugte einen signifikanten Abfall des basalen Koronarflusses um ca. 25% und hatte keinen hemmenden Effekt auf die prozentuale Flusssteigerung. Im Gegenteil, in den Simvastatin-behandelten Herzen wurde die prozentuale Flusssteigerung nach 20 Sekunden Ischämie gegenüber der Placebogruppe signifikant erhöht. Nach 60 Sekunden Ischämie wiesen unter L-NAME-Applikation sowohl die Simvastatin-behandelten Herzen als auch die S803-behandelten Herzen gegenüber den Placeboherzen eine signifikante Erhöhung der prozentualen Flusssteigerung auf.

Tabelle 9: Koronarflussmessung während der reaktiven Hyperämie (RH) nach 60 Sekunden Ischämie in isoliert-perfundierten Langendorff-Herzen

		Vor RH	Während RH	
Versuchsgruppe (n = 6)		Initialfluss [ml/min]	Maximalfluss [ml/min]	Flusssteigerung [%]
Placebo		11,9 ± 1,1	26,5 ± 1,3 *	122,7 ± 14,0
Sim	2 mg/kg/d	12,7 ± 1,1	29,7 ± 1,9 *	137,7 ± 32,6
	2 mg/kg/d + L-NAME	8,1 ± 1,6 #	25,9 ± 3,0 *	228,6 ± 31,5 + #
S803	3 mg/kg/d	12,7 ± 1,2	27,7 ± 1,2 *	118,1 ± 16,9
	10 mg/kg/d	11,9 ± 1,0	27,1 ± 1,3 *	127,4 ± 17,7
	30 mg/kg/d	12,6 ± 1,1	29,5 ± 1,5 *	141,8 ± 27,0
	30 mg/kg/d + L-NAME	7,2 ± 0,5 #	27,3 ± 2,3 *	281,9 ± 24,7 + #

Untersucht wurden Kontrollherzen (Placebo), Simvastatin-behandelte (Sim) und S803-behandelte Herzen. Die Hemmung der reaktiven Hyperämie erfolgte mit L-NAME (30 µM) ($\bar{x} \pm SEM$, *: $P < 0,05$ vs. Initialfluss; +: $P < 0,05$ vs. Placebo; #: $P < 0,05$ vs. Behandlung ohne L-NAME).

Berücksichtigt man bei der Auswertung das zeitliche Ausmaß der Koronarflusssteigerung durch Integration der Flusskurve über die Zeit, so zeigt sich eine lineare Beziehung zwischen Okklusionsdauer und der Fläche unter der Flusskurve. Das Ausmaß des durchschnittlichen Durchflussvolumens während der reaktiven Hyperämie war somit deutlich abhängig von der vorausgegangenen Ischämiedauer (siehe Abbildung 14 A und B). Bei einer Unterbrechung der Perfusion über einen Zeitraum von 20 Sekunden wurde in den Herzen der Placebogruppe während der reaktiven Hyperämie ein durchschnittliches Gesamtflussvolumen von $2,0 \pm 0,2$ ml ermittelt. Nach einer Okklusionsdauer von 60 Sekunden wurde hingegen ein ca. vierfach ($8,33 \pm 1,1$ ml) so großes Volumen beobachtet.

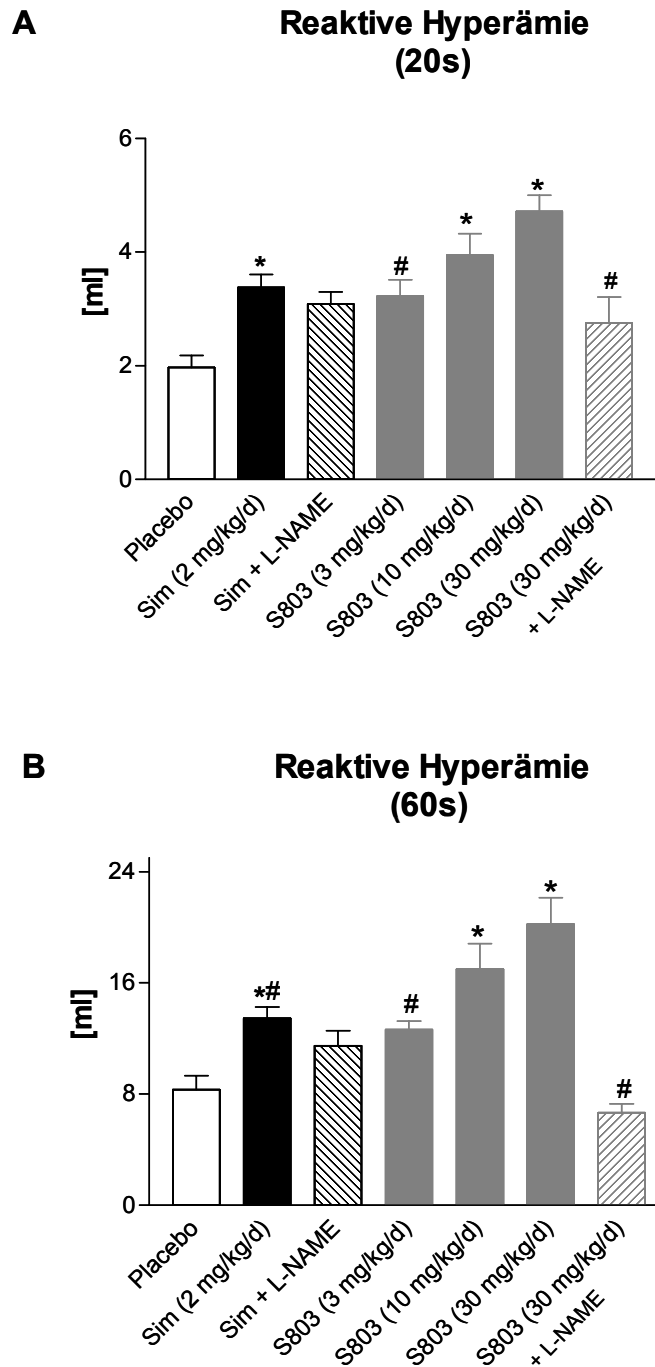


Abbildung 14: Wirkung des eNOS-Transkriptionsverstärkers (S803) auf die reaktive Hyperämie im isoliert-perfundierten Langendorff- Herzen nach (A) 20 und (B) 60 Sekunden Ischämie
 Aufgeführt sind die Durchflussvolumina der Herzen folgender Gruppen: Placebo, Sim (2 mg/kg/d), Sim (2 mg/kg/d) + L-NAME (30 μ M), S803 (3; 10; 30 mg/kg/d) und S803 (30 mg/kg/d) + L-NAME (30 μ M) ($\bar{x} \pm$ SEM; n = 6; *: P < 0,05 vs. Placebo; #: P < 0,05 vs. S803 30 mg/kg/d).

In den Herzen der vorbehandelten Gruppen war im Vergleich zu den Herzen der Placebogruppe eine deutliche Erhöhung des in der reaktiven Hyperämie erzielten Gesamtflussvolumens zu beobachten. Mit Ausnahme von S803 (3 mg/kg/d) wiesen alle behandelten Gruppen eine signifikante Steigerung des Volumens auf. Durch die Behandlung mit Simvastatin wurde das während der reaktiven Hyperämie erzielte Gesamtvolumen nach 20 Sekunden Ischämie auf $3,7 \pm 0,3$ ml und nach 60 Sekunden Ischämie auf $13,5 \pm 0,9$ ml signifikant gegenüber der Placebogruppe erhöht. Das Gesamtflussvolumen der S803-vorbehandelten Herzen wies eine dosisabhängige Volumenerhöhung auf: Nach 20 Sekunden Ischämie betrug sie in den einzelnen Dosierungen $3,2 \pm 0,3$ ml (3 mg/kg/d), $3,9 \pm 0,4$ ml (10 mg/kg/d) und $4,7 \pm 0,3$ ml (30 mg/kg/d), nach 60 Sekunden Ischämie $12,6 \pm 0,7$ ml (3 mg/kg/d), $17,0 \pm 1,9$ ml (10 mg/kg/d) und $20,2 \pm 2,1$ ml (30 mg/kg/d).

Bei der Hemmung der reaktiven Hyperämie mit L-NAME wurde das Gesamtvolumen der S803-behandelten (30 mg/kg/d) Herzen in beiden Versuchsprotokollen signifikant gesenkt. Das durchschnittliche Flussvolumen der Herzen erreichte nach 20 Sekunden Ischämie einen Wert von $2,8 \pm 0,5$ ml und nach 60 Sekunden Ischämie einen Wert von $6,7 \pm 0,7$ ml. Überraschenderweise zeigte L-NAME nur eine geringfügige Hemmung des Flussvolumens in der Simvastatin-behandelten Gruppe. Das durchschnittliche Flussvolumen betrug nach 20 Sekunden Ischämie $3,1 \pm 0,2$ ml und nach 60 Sekunden Ischämie $11,5 \pm 1,2$ ml.

3.2.1.2 Nachweis der eNOS-Expression

Die Herzen der vier behandelten Gruppen zeigten signifikante Expressionssteigerungen im Vergleich zu den Herzen der Placebogruppe. Unter der Simvastatin-Behandlung wiesen die Herzen eine 55%-ige Expressionssteigerung auf. Die Behandlung mit dem eNOS-Transkriptionsverstärker S803 führte dosisabhängig zu einer 34%-igen (3 mg/kg/d), 39%-igen (10 mg/kg/d) bzw. 72%-igen (30 mg/kg/d) Erhöhung der eNOS-Expression (siehe Abbildung 15 B).

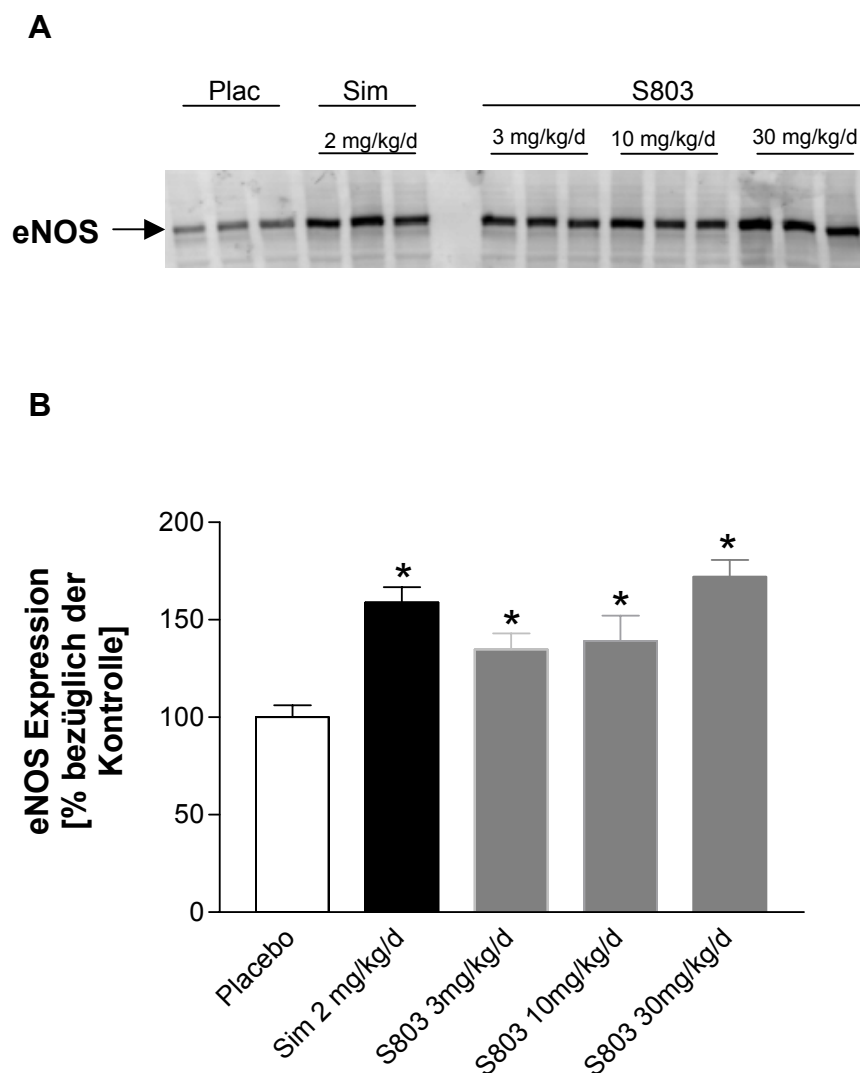


Abbildung 15: eNOS-Expression in Rattenherzen nach Behandlung mit dem eNOS-Transkriptionsverstärker S803

A zeigt einen exemplarischen Western-Blot der eNOS-Expression, B die prozentuale Expressionssteigerung der eNOS. Folgende Substanzdosierungen wurden untersucht: Simvastatin bei 2 mg/kg/d und S803 bei 3; 10; 30 mg/kg/d ($\bar{x} \pm \text{SEM}$; n = 8; *: P < 0,05 vs. Placebo).

3.2.2 Ergebnisse der Hämodynamikmessung

S803 wurde bei einer Dosierung von 10 mg/kg/d im Modell des PMN-induzierten Reperfusionsschadens getestet. Es wurden 51 isoliert-perfundierte Rattenherzen im Langendorff-Modell mit folgender Gruppeneinteilung untersucht (n = 11): ischämische zellfreie Kontrollgruppe (I/R); ischämische PMN-perfundierte Gruppe (I/R + PMN); ischämische PMN-perfundierte Simvastatin-vorbehandelte Gruppe (I/R + PMN + Sim; n = 7); ischämische PMN-perfundierte S803-vorbehandelte Gruppe (I/R + PMN + S803).

Für die Bestimmung der CK/LDH-Konzentrationen sowie der Zytokinkonzentrationen wurden zusätzlich nicht-ischämische Kontrollherzen (Sham; n = 11) im Langendorff-Modell untersucht.

3.2.2.1 Herzfrequenz

Wie bereits in der Etablierungsstudie beschrieben, war die Herzfrequenz in der zellfreien Kontrollgruppe nach Ischämie und Reperfusion nicht signifikant verändert. Ebenso hatten weder die Zellperfusion noch die Behandlung mit Simvastatin bzw. S803 einen Einfluss auf die post-ischämische Herzfrequenz (siehe Tabelle 10).

Tabelle 10: Herzfrequenz (HF) isoliert-perfundierter Langendorff-Herzen nach 30 Minuten Ischämie (I) und 60 Minuten Reperfusion (R)

Versuchsgruppe	HF [bpm]	
	Ausgangswert	Endwert
I/R (n = 11)	276 ± 8,3	261 ± 7,9
I/R + PMN (n = 11)	280 ± 5,3	266 ± 5,1
I/R + PMN + Sim (n = 7)	295 ± 8,3	269 ± 11,4
I/R + PMN + S803 (n = 11)	276 ± 5,8	266 ± 14,2

Aufgeführt sind die prä-ischämischen Ausgangswerte und die post-ischämischen Endwerte nach beendeter Reperfusion ($\bar{x} \pm SEM$). Untersucht wurden Kontrollherzen (I/R), PMN-perfundierte Herzen (I/R + PMN) und Simvastatin- bzw. S803-vorbehandelte PMN-perfundierte Herzen (I/R + PMN + Sim, I/R + PMN + S803).

3.2.2.2 Linksventrikulärer Druck

Der zuvor in der Etablierungsstudie beschriebene negative Einfluss der PMNs auf die Parameter des linksventrikulären Drucks konnte in der Behandlungsstudie bestätigt werden (siehe Tabelle 11 A und B).

Tabelle 11: (A) Linksventrikulärer systolischer und diastolischer Druck (LVP_{sys} und LVP_{dia}) und (B) linksventrikuläre Druckentwicklung (LVDP) isoliert-perfundierter Langendorff-Herzen nach 30 Minuten Ischämie (I) und 60 Minuten Reperfusion (R)

A

Versuchsgruppe	LVP_{sys} [mm Hg]		LVP_{dia} [mm Hg]	
	Ausgangswert	Endwert	Ausgangswert	Endwert
I/R (n = 11)	102 ± 2,2	103 ± 4,3	12,6 ± 0,9	29,3 ± 4,5 ⁺
I/R + PMN (n = 11)	95,7 ± 2,9	78,8 ± 3,2 ^{+*}	12,8 ± 0,5	42,9 ± 3,1 ^{+*}
I/R + PMN + Sim (n = 7)	97,0 ± 4,9	84,5 ± 8,0	13,0 ± 0,6	22,3 ± 4,7 ^{+ #}
I/R + PMN + S803 (n = 11)	101 ± 5,1	96,9 ± 4,9 [#]	12,1 ± 0,4	31,9 ± 5,0 ^{+ #}

B

Versuchsgruppe	LVDP [mm Hg]	
	Ausgangswert	Endwert
I/R (n = 11)	90,0 ± 2,4	73,8 ± 3,5 ⁺
I/R + PMN (n = 11)	82,9 ± 3,6	35,9 ± 1,4 ^{+*}
I/R + PMN + Sim (n = 7)	84,0 ± 2,6	62,2 ± 6,4 ^{+ #}
I/R + PMN + S803 (n = 11)	89,8 ± 5,1	65,0 ± 6,9 ^{+ #}

Aufgeführt sind die prä-ischämischen Ausgangswerte und die Endwerte nach beendeter Reperfusion. Untersucht wurden die Kontrollherzen (I/R), die PMN-perfundierten Herzen (I/R + PMN) und die Simvastatin- bzw. S803-vorbehandelten PMN-perfundierten Herzen (I/R + PMN + Sim, I/R + PMN + S803) ($\bar{x} \pm SEM$; ⁺: $P < 0,05$ vs. Ausgangswert; ^{*}: $P < 0,05$ vs. I/R; [#]: $P < 0,05$ vs. I/R + PMN).

Die PMN-induzierte signifikante Senkung des LVP_{sys} wurde unter der Behandlung mit dem eNOS-Transkriptionsverstärker S803 stärker verringert als unter der Behandlung mit Simvastatin. Unter der Behandlung mit S803 wurde sogar eine signifikante Verbesserung des LVP_{sys} im Vergleich zur unbehandelten PMN-Gruppe beobachtet. Während die funktionelle Erholung des LVP_{sys} durch die PMN-Applikation im Vergleich zu den zellfreien Herzen um ca. 18% signifikant reduziert war, wiesen die Simvastatin-behandelten Herzen einen um ca. 13% reduzierten

LVP_{sys} auf. Die Herzen der S803-behandelten Herzen zeigten lediglich eine um ca. 3% erniedrigte funktionelle Erholung des LVP_{sys} (siehe Tabelle 11 A).

Exemplarisch für den zeitlichen Verlauf eines der drei gemessenen linksventrikulären Parameter ist die linksventrikuläre Druckentwicklung (LVDP) über den gesamten Beobachtungszeitraum in Abbildung 16 dargestellt: Der durch PMN-Applikation gegenüber der zellfreien Kontrollgruppe signifikant reduzierte LVDP wurde sowohl unter Simvastatin- als auch unter S803-Behandlung schon in der frühen Reperfusionphase deutlich verbessert und unterschied sich bereits nach fünf Minuten Reperfusion nicht mehr signifikant von der Kontrollgruppe ohne PMNs. Dementsprechend erreichte der LVDP der PMN-perfundierten Herzen am Ende der Reperfusion lediglich $43 \pm 5\%$ des prä-ischämischen Ausgangswertes, während die zellfreien Kontrollherzen, die Simvastatin- und die S803-behandelten PMN-perfundierten Herzen $80 \pm 3,3\%$, $73 \pm 4,8\%$ und $78 \pm 3,9\%$ des prä-ischämischen Ausgangswertes erreichten.

Ferner wurde der unter PMN-Applikation deutlich erhöhte LVP_{dia} ($235 \pm 12\%$) durch beide Behandlungen signifikant gesenkt (Sim: $71,5 \pm 3\%$; S803: $145 \pm 5\%$), so dass sich die post-ischämischen Endwerte nicht mehr von dem zellfreien Kontrollwert ($132 \pm 7\%$) unterschieden. Interessanterweise wurde der LVP_{dia} der PMN-perfundierten Herzen unter der Simvastatin-Behandlung geringfügiger erhöht als unter zellfreien Kontrollbedingungen (siehe Tabelle 11 A).

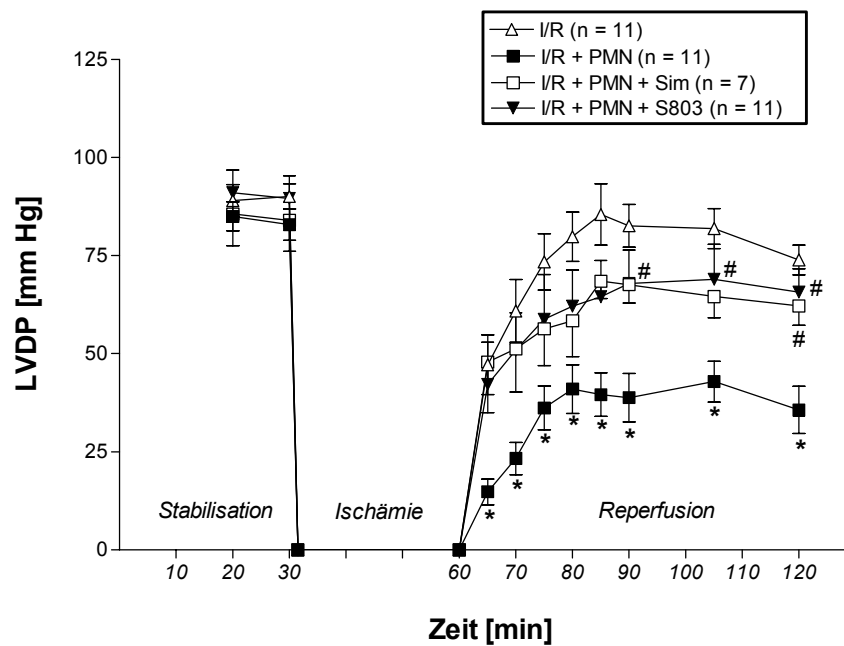


Abbildung 16: Linksventrikuläre Druckentwicklung (LVDP) isoliert-perfundierter Langendorff-Herzen nach 30 Minuten Ischämie (I) und 60 Minuten Reperfusion (R)

Aufgeführt ist der LVDP-Zeitverlauf der Kontrollherzen (I/R), der PMN-perfundierten Herzen (I/R + PMN) und der Simvastatin- bzw. S803-vorbehandelten PMN-perfundierten Herzen (I/R + PMN + Sim, I/R + PMN + S803). Dargestellt ist der zeitliche Verlauf des gesamten Beobachtungszeitraums ($\bar{x} \pm SEM$; *: $P < 0,05$ vs. I/R; #: $P < 0,05$ vs. I/R + PMN).

3.2.2.3 Kontraktilität und Relaxation

Die in der Etablierungsstudie beschriebene Verstärkung der post-ischämischen Funktionsminderung durch die Neutrophilen wurde sowohl durch die Simvastatin-Behandlung als auch durch den eNOS-Transkriptionsverstärker signifikant reduziert. Die Herzen der vorbehandelten PMN-perfundierten Gruppen wiesen eine signifikant verbesserte Kontraktion und Relaxation im Vergleich zu den Herzen der unbehandelten PMN-perfundierten Gruppe auf (siehe Tabelle 12 A und B).

Tabelle 12: (A) Maximale Druckanstiegs- und -abfallsgeschwindigkeit (dP/dt_{max} und dP/dt_{min}) und (B) „Pressure Rate Product“ (PRP) isoliert-perfundierter Langendorff-Herzen nach 30 Minuten Ischämie (I) und 60 Minuten Reperfusion (R)

A

Versuchsgruppe	dP/dt_{max} [mm Hg/s]		dP/dt_{min} [mm Hg/s]	
	Ausgangswert	Endwert	Ausgangswert	Endwert
I/R (n = 11)	2846 ± 150	2233 ± 130 ⁺	-2143 ± 115	-1648 ± 77 ⁺
I/R + PMN (n = 11)	2755 ± 123	1174 ± 87 ⁺⁺	-2048 ± 87	-853 ± 60 ⁺⁺
I/R + PMN + Sim (n = 7)	2474 ± 80	1686 ± 255 ^{++#}	-1915 ± 57	-1253 ± 168 ^{++#}
I/R + PMN + S803 (n = 11)	3030 ± 203	1973 ± 219 ⁺⁺	-2173 ± 133	-1374 ± 130 ⁺⁺

B

Versuchsgruppe	PRP [mm Hg/min]	
	Ausgangswert	Endwert
I/R (n = 11)	26,3 ± 1,8	19,3 ± 1,5 ⁺
I/R + PMN (n = 11)	23,0 ± 1,1	9,5 ± 0,4 ⁺⁺
I/R + PMN + Sim (n = 7)	24,5 ± 1,4	16,9 ± 2,6 ⁺⁺
I/R + PMN + S803 (n = 11)	24,8 ± 1,6	21,0 ± 2,6 [#]

Aufgeführt sind die prä-ischämischen Ausgangswerte und die post-ischämischen Endwerte der Kontrollherzen (I/R), der PMN-perfundierten Herzen (I/R + PMN) und der Simvastatin- bzw. S803-vorbehandelten PMN-perfundierten Herzen (I/R + PMN + Sim, I/R + PMN + S803) ($\bar{x} \pm SEM$; ⁺: $P < 0,05$ vs. Ausgangswert; ⁺⁺: $P < 0,05$ vs. I/R; [#]: $P < 0,05$ vs. I/R + PMN).

Der Kontraktilitätsparameter PRP erreichte in den zellfreien Kontrollherzen am Ende der Reperfusion $73,8 \pm 5\%$, bei den unbehandelten PMN-Herzen $41,85 \pm 2\%$ und bei den Simvastatin- bzw. S803-vorbehandelten Herzen $68,2 \pm 7\%$ und $77,5 \pm 9\%$ des präischämischen Ausgangswerts. Somit wurde die signifikante Reduzierung des PRP durch die PMNs bei beiden Behandlungen im Vergleich zu den unbehandelten PMN-perfundierten Herzen aufgehoben (siehe Tabelle 12 B).

Ebenso wurde die Relaxation unter Simvastatin- bzw. S803-Behandlung signifikant gegenüber den unbehandelten PMN-Herzen verbessert. Die funktionelle Erholung des dP/dt_{min} betrug in den zellfreien Kontrollherzen $77,7 \pm 3\%$ und sank signifikant auf $44,7 \pm 3\%$ unter PMN-Applikation. Nach Vorbehandlung mit Simvastatin ($65,2 \pm 7\%$) bzw. S803 ($54,2 \pm 6\%$) war am Ende der Reperfusion kein signifikanter Unterschied zur Relaxationsfähigkeit der zellfreien Kontrollherzen nachweisbar (siehe Tabelle 12 A).

Repräsentativ für die Parameter der Kontraktionskraft ist in Abbildung 17 der zeitliche Verlauf des dP/dt_{max} über den gesamten Beobachtungszeitraum dargestellt: Während das dP/dt_{max} der unbehandelten PMN-perfundierten Herzen zu jedem Zeitpunkt der Reperfusion gegenüber demjenigen der zellfreien Kontrollherzen signifikant reduziert war, kam es unter der Vorbehandlung mit Simvastatin und S803 vom Reperfusionbeginn an zu einer stetigen Verbesserung der Kontraktilität. Diese war allerdings zunächst nicht signifikant. Ab der 30. Reperfusionsminute wiesen die Herzen beider vorbehandelten PMN-Gruppen gegenüber den unbehandelten PMN-Herzen dagegen eine signifikante Verbesserung des dP/dt_{max} auf. Während die unbehandelten PMN-perfundierten Herzen am Ende der Reperfusion lediglich $42,7 \pm 4\%$ des prä-ischämischen Ausgangswertes erreichten, wiesen die Simvastatin-vorbehandelten Herzen $67,4 \pm 4\%$ und die S803-vorbehandelten Herzen $65,9 \pm 5\%$ des prä-ischämischen Ausgangswertes auf. Sie unterschieden sich nicht mehr signifikant von den zellfreien Kontrollherzen ($79,8 \pm 5\%$).

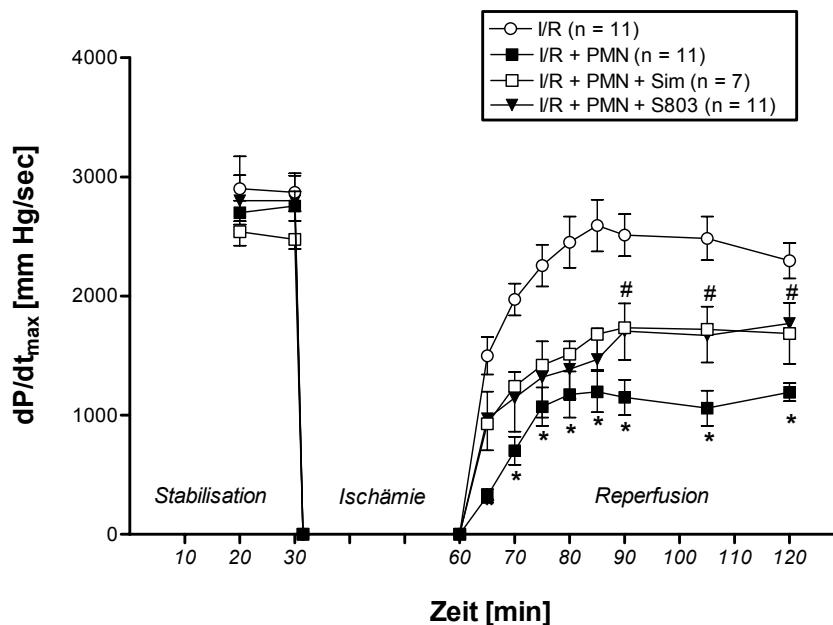


Abbildung 17: Maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit (dP/dt_{max}) isoliert-perfundierter Langendorff-Herzen nach 30 Minuten Ischämie (I) und 60 Minuten Reperfusion (R)

Aufgeführt sind die Werte der Kontrollherzen (I/R), die der PMN-perfundierten Herzen (I/R + PMN) und die der Simvastatin- bzw. S803-vorbehandelten PMN-perfundierten Herzen (I/R + PMN + Sim, I/R + PMN + S803). Dargestellt ist der zeitliche Verlauf des gesamten Beobachtungszeitraums ($\bar{x} \pm SEM$; *: $P < 0,05$ vs. I/R; #: $P < 0,05$ vs. I/R + PMN).

3.2.2.4 Koronarfluss

Der Koronarfluss zeigte in den vier untersuchten Gruppen im Vergleich zu den prä-ischämischen Ausgangswerten eine signifikante Verminderung der Werte nach beendeter Reperfusion (siehe Tabelle 13). Während der Koronarfluss in der Kontrollgruppe um 21% reduziert war, fiel er durch die PMN-Zugabe um 47%. Durch die Behandlung mit dem eNOS-Transkriptionsverstärker S803 wurde der Koronarfluss lediglich um 24% reduziert, so dass im Vergleich zum post-ischämischen Endwert der unbehandelten PMN-perfundierten Herzen eine signifikante Verbesserung des Koronarflusses zu verzeichnen war. Hierbei zeigte sich zum ersten Mal eine Abweichung in der Wirkung beider Substanzen. Durch die Simvastatin-Behandlung wurde der Fluss zwar tendenziell verbessert, allerdings war noch immer eine Reduzierung des Ausgangsflusses um 36% zu beobachten.

Tabelle 13: Koronarfluss (CF) isoliert-perfundierter Langendorff-Hezen nach 30 Minuten Ischämie (I) und 60 Minuten Reperfusion (R)

Versuchsgruppe	[ml/min]	
	Ausgangswert	Endwert
I/R (n = 11)	14,1 ± 0,9	11,0 ± 0,6 ⁺
I/R + PMN (n = 11)	16,5 ± 1,5	8,6 ± 0,9 ⁺⁺
I/R + PMN + Sim (n = 7)	17,0 ± 1,9	10,9 ± 0,9 ⁺
I/R + PMN + S803 (n = 11)	15,5 ± 1,3	11,7 ± 0,7 ^{+#}

Aufgeführt sind die prä-ischämischen Ausgangswerte und die post-ischämischen Endwerte der Kontrollherzen (I/R), der PMN-perfundierten Herzen (I/R + PMN) und der Simvastatin- bzw. S803-vorbehandelten PMN-perfundierten Herzen (I/R + PMN + Sim, I/R + PMN + S803) ($\bar{x} \pm SEM$; ⁺: $P < 0,05$ vs. Ausgangswert; ^{*}: $P < 0,05$ vs. I/R; [#]: $P < 0,05$ vs. I/R + PMN).

3.2.3 Bestimmung der Zytokinfreisetzung

Die TNF- α -Konzentration wurde unter der Behandlung mit Simvastatin bzw. S803 signifikant, die IL-1 β -Konzentration tendenziell reduziert. Die Bestimmung der TNF- α -Konzentrationen ergab folgende Resultate (pg/ml): nicht-ischämische Kontrollherzen 14,3 ± 4,2; ischämische Kontrollherzen 19,6 ± 3,8; ischämische PMN-perfundierte Herzen 70,6 ± 18,1; Simvastatin-behandelte PMN-perfundierte Herzen 13,3 ± 6,4 und S803-behandelte PMN-perfundierte Herzen 11,0 ± 1,5.

Auch in dieser Studie waren in allen untersuchten Gruppen die IL-1 β -Konzentrationen mindestens doppelt so hoch wie die TNF- α -Konzentrationen (pg/ml): in den nicht-ischämischen Kontrollherzen $38,7 \pm 5,0$, in den ischämischen Kontrollherzen $79,6 \pm 12,6$; in den ischämischen PMN-perfundierten Herzen $290,1 \pm 49,6$; in den Simvastatin-behandelten PMN-perfundierten Herzen $158,6 \pm 29,1$ und in den S803-behandelten PMN-perfundierten Herzen $178,8 \pm 12,6$ (siehe Abbildung 18).

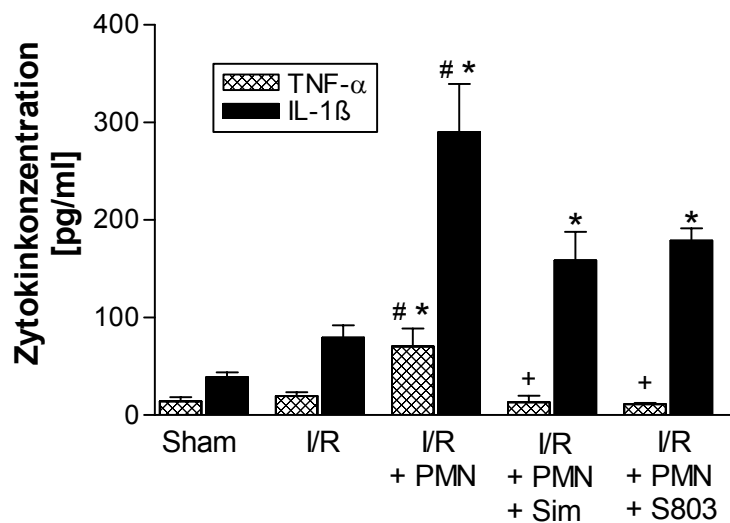


Abbildung 18: Zytokinfreisetzung (IL-1 β und TNF- α) isoliert-perfundierter Langendorff-Herzen nach 30 Minuten Ischämie (I) und 60 Minuten Reperfusion (R)

Aufgeführt sind die Werte der Herzen der nicht-ischämischen (Sham) und der ischämischen Kontrollgruppe (I/R), die der PMN-perfundierten Herzen (I/R + PMN) und die der Simvastatin- bzw. S803-vorbehandelten PMN-perfundierten Herzen (I/R + PMN + Sim, I/R + PMN + S803) ($\bar{x} \pm \text{SEM}$; *: $P < 0,05$ vs. Sham; #: $P < 0,05$ vs. I/R; +: $P < 0,05$ vs. I/R + PMN).

3.2.4 Bestimmung der Infarktgröße und der Zellschädigung

Die Bestimmung der Infarktgröße und der CK/LDH-Freisetzung hatte in der Etablierungsstudie gezeigt, dass die Infusion der PMNs die Nekroseentstehung im Modell des PMN-induzierten Reperfusionsschadens nicht signifikant beeinflusst. Im Vergleich zu den zellfreien Kontrollherzen wurde lediglich eine tendenzielle Erhöhung der Infarktgröße bzw. der CK/LDH-Freisetzung festgestellt. In der Behandlungsstudie sollte untersucht werden, ob die subchronisch applizierten Substanzen Simvastatin und S803 per se die Infarktgröße beeinflussen. Nach Vorbehandlung der Tiere wurden hierzu Versuche mit dem Standard-Ischämie/Reperusions-Protokoll ohne PMN-Infusion unternommen (jeweils $n = 6$).

3.2.4.1 Infarktgröße

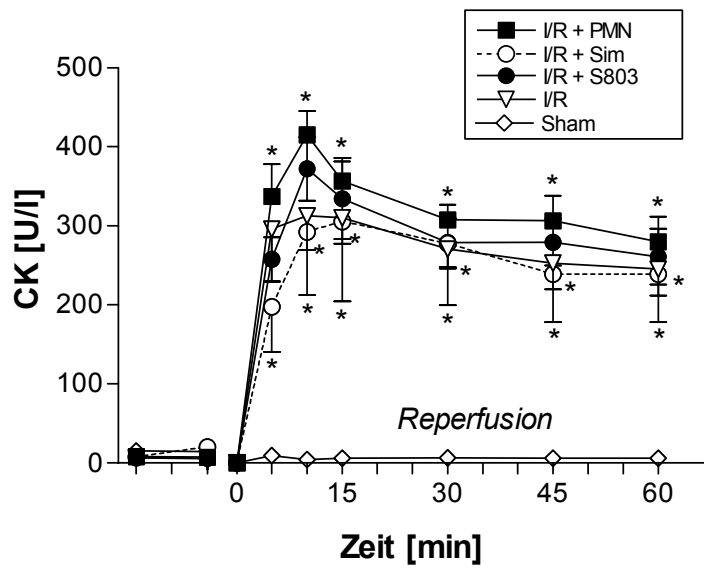
Bei der planimetrischen Bestimmung der Infarktgröße wiesen die Herzen der Simvastatin-vorbehandelten Tiere nach 30 Minuten Ischämie und 60 Minuten zellfreier Reperfusion eine durchschnittliche Infarktgröße von $17,9 \pm 1,6\%$ auf. Die Infarktgröße der S803-vorbehandelten Tiere betrug $18,9 \pm 0,7\%$. Die Infarktgrößen beider Behandlungsgruppen unterschieden sich somit nicht signifikant von der Infarktgröße der zellfreien unbehandelten Kontrollgruppe.

3.2.4.2 Creatinkinase und Lactatdehydrogenase

Bei der Bestimmung der Creatinkinase-Konzentrationen wiesen die nicht-ischämischen Kontrollherzen über den gesamten Versuchszeitraum keine Erhöhung der Enzymwerte auf. Mit Einsetzen der Reperfusion stiegen dagegen in den ischämischen Gruppen die Creatinkinasewerte (CK) stetig an und erreichten in der zehnten Reperfusionsminute die höchsten Konzentrationen. Diese waren bei allen ischämischen Gruppen im Vergleich zur nicht-ischämischen Gruppe um ca. das Zweihundertfünfzig- bis Dreihundertfünfzigfache signifikant erhöht. Im restlichen Beobachtungszeitraum sanken die Werte wieder leicht ab. Obwohl die CK-Werte der ischämischen Gruppen sich in keinem Zeitpunkt des Versuchs signifikant voneinander unterschieden, konnte – wie zuvor in der Etablierungsstudie beschrieben – in der PMN-perfundierten Gruppe im Vergleich zur zellfreien Kontrollgruppe eine leichte Erhöhung der Werte nachgewiesen werden. Diese war jedoch nicht signifikant (siehe Abbildung 19 A).

Die Lactatdehydrogenase-Werte (LDH) verhielten sich ähnlich. Die LDH-Konzentrationen der ischämischen Gruppen unterschieden sich zu keinem Zeitpunkt der Reperfusion signifikant voneinander. Während der Reperfusionsphase konnte lediglich ein signifikanter Unterschied zur LDH-Konzentration der nicht-ischämischen Herzen nachgewiesen werden. Auch hier wurde eine leichte Erhöhung der Werte in der PMN-perfundierten Gruppe im Vergleich zur zellfreien Kontrollgruppe festgestellt (siehe Abbildung 19 B).

A



B

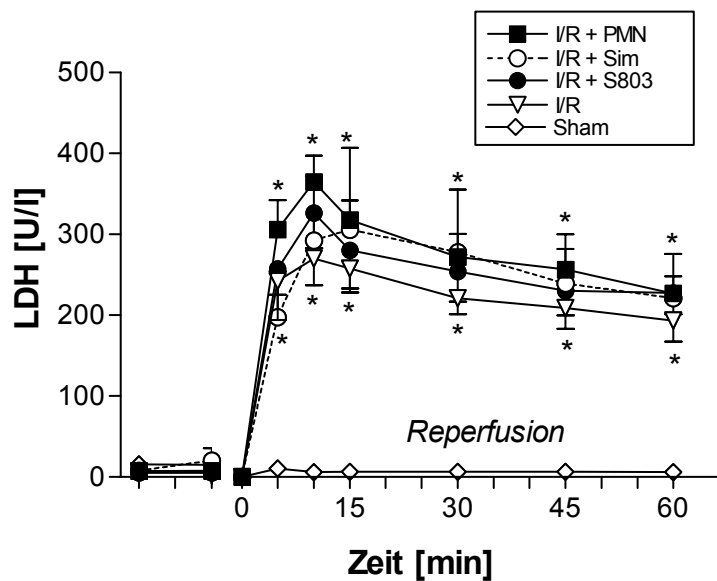


Abbildung 19: Sekretion von (A) Creatinkinase (CK) und (B) Lactatdehydrogenase (LDH) ins Koronareffluat der isoliert-perfundierten Langendorff-Herzen nach 30 Minuten Ischämie (I) und 60 Minuten Reperfusion (R)

Aufgeführt ist der Zeitverlauf der Enzymwerte der Kontrollherzen (I/R), der PMN-perfundierten Herzen (I/R + PMN) und der Simvastatin- bzw. S803-vorbehandelten Herzen (I/R + Sim, I/R + S803). Die Ischämiephase ist durch eine Unterbrechung der x-Achse gekennzeichnet ($\bar{x} \pm \text{SEM}$; $n = 6$; *: $P < 0,05$ vs. Sham)

4 DISKUSSION

4.1 MODELL DES PMN-INDUZIERTEN REPERFUSIONSSCHADENS ISOLIERT-PERFUNDIERTER HERZEN

4.1.1 Einfluss der PMNs auf die myokardiale Dysfunktion

Tierexperimentell wiesen wir in den isoliert-perfundierten Herzen nach 30 Minuten globaler Ischämie und 60 Minuten Reperfusion eine post-ischämische myokardiale Funktionsminderung nach. Während die zellfrei-perfundierten Herzen eine um knapp 20% verminderte linksventrikuläre Funktion aufwiesen, verschlechterten sich die systolische und die diastolische Funktion des linken Ventrikels durch die PMN-Applikation erheblich. Unter PMN-Applikation wurden sowohl die Kontraktion als auch die Relaxation des linken Ventrikels in ihrer Funktion um ca. 60% eingeschränkt. Dies äußerte sich in einer signifikanten Reduktion der maximalen Druckerhöhung (dP/dt_{max}) und Druckabfallgeschwindigkeit (dP/dt_{min}), des systolischen Drucks (LVP_{sys}) sowie des „Pressure Rate Products“ (PRP). Der linksventrikuläre diastolische Druck (LVP_{dia}) war im Vergleich zu den zellfrei-perfundierten Herzen signifikant erhöht. Des Weiteren stellten wir in den PMN-perfundierten Herzen einen gegenüber den zellfrei-perfundierten Kontrollherzen um 30% signifikant reduzierten Koronarfluss fest. In Kontrollversuchen wiesen die Herzen nach 120 Minuten Perfusion ohne Ischämie einen modellbedingten Kontraktilitätsverlust um 16% auf. Die übrigen funktionellen Parameter zeigten einen Funktionsverlust von 5–10%. Weder das zur PMN-Stimulation angewandte chemotaktische Peptid fMLP (10 nM) noch das zur Stimulation des Endothels angewandte Thrombin (0,3 U/ml) beeinträchtigten die Hämodynamik der isoliert-perfundierten Herzen unter nicht-ischämischen Kontrollbedingungen. Somit konnte ein direkter Einfluss auf die Herzfunktion durch die verwendeten Stimulanzen ausgeschlossen werden. Ebenso hatten nicht-stimulierte PMNs keinen Einfluss auf die Hämodynamik nicht-ischämischer Herzen.

Unsere Ergebnisse bestätigen verschiedene Befunde der Literatur. Eine Verstärkung des blutzellfrei auftretenden funktionellen Reperfusionsschadens ist nach einer PMN-Applikation in isoliert-perfundierten Herzen eindeutig mehrfach belegt worden. Hierbei erfolgten die Untersuchungen nach einer globalen Ischämiezeit von maximal

20 Minuten (Kupatt *et al.*, 1997; Lefer *et al.*, 1993c; Ohnishi *et al.*, 1999; Raschke *et al.*, 1993; Shandelya *et al.*, 1993 und Tsao *et al.*, 1992). Beispielsweise stellten Shandelya *et al.* im isoliert-perfundierten Rattenherzen nach 20-minütiger globaler Ischämie und Applikation von 50 Millionen humanen PMNs eine Kontraktionsminderung von 57% fest. Hierbei fand sich die Funktionalität der zellfrei-perfundierten Kontrollherzen um 10% gesenkt. Lefer *et al.* wiesen nach 20-minütiger Ischämie und PMN-Perfusion (55 Mio.) eine verminderte Herzfunktion um 70% nach. Dagegen war die Funktion der Herzen unter Kontrollbedingungen lediglich um 5–10% reduziert.

In vivo wird die PMN-Beteiligung an der Entstehung eines funktionellen Reperfusionsschadens dagegen kontrovers diskutiert. Neben Studien, die unter leukozytenfreien bzw. leukozytenarmen Reperusionsbedingungen eine kardiale Funktionsverbesserung beschreiben (Schmidt *et al.*, 1996), gibt es ebenso zahlreiche Publikationen, in denen nach Eliminierung oder Reduktion leukozytärer Zellen im Perfusat am Reperusionsende keine verbesserte funktionelle Erholung des Organs beschrieben wird (Becker, 1993; Bolli, 1993).

Das *ex-vivo-Modell* bietet gegenüber *in-vivo-Modellen* die Möglichkeit, das Ischämie-Reperusionsgeschehen unter Ausschluss zellulärer und humoraler Faktoren zu untersuchen. Durch die externe Zell-Applikation von zum Beispiel PMNs auf die Herzen erfolgt die separate Untersuchung eines Blutzellen-induzierten Reperusionschadens. Ischämiephasen von bis zu 20 Minuten erzeugen in einem solchen Modell lediglich funktionelle reversible Funktionsstörungen („stunning“). Die klinische Relevanz des „stunnings“ beschränkt sich auf Hochrisikopatienten und ist demzufolge nicht besonders groß (Heusch, 1998). In der vorliegenden Arbeit wählten wir daher eine globale Ischämiezeit, bei der im Myokardgewebe sowohl subletale als auch letale Schäden entstehen. Die Untersuchung des Reperusionsschadens nach 30-minütiger globaler „no-flow“-Ischämie ermöglichte uns somit, die Wirkung potenzieller Arzneistoffe sowohl auf die Entstehung eines reversiblen als auch eines irreversiblen Funktionsschadens zu untersuchen.

Festzuhalten ist, dass die PMN-Applikation den funktionellen Reperusionsschaden im Modell des isoliert-perfundierten Rattenherzens signifikant erhöht. Dabei ist die unter PMN-Applikation beobachtete erhöhte post-ischämische kardiale Dysfunktion

möglicherweise Folge einer vermehrten Freisetzung von freien Radikalen durch aktivierte PMNs. Dies belegten Shandelya und Kollegen (1993) in speziellen Untersuchungen an isoliert-perfundierten Rattenherzen. Die Autoren wiesen in der sehr frühen zellfreien Reperfusionphase eine Radikalfreisetzung nach, die schon innerhalb der ersten 20 Sekunden ein Maximum erreichte. Bereits nach zwei bis fünf Minuten Reperfusion war keine weitere Radikalfreisetzung feststellbar. Dagegen stellten sie in den PMN-perfundierten Herzen eine bedeutend höhere Radikalfreisetzung fest, die in der Reperfusion über eine Zeitdauer von mehr als zehn Minuten anhielt. Radikale führen in Kardiomyozyten zu einer Überladung der Zellen mit Kalziumionen („calcium overload“), die unter anderem zu einer Kontraktionsstörung der Zellen führt (Josephson, 1991). Bereits während der Ischämie kommt es durch einen gestörten Energiehaushalt der Zelle zu einem intrazellulären Kalziumanstieg (Shattock, 1998). Dieser während der Ischämie initiierte Prozess wird demnach möglicherweise unter PMN-Reperfusion fortgesetzt oder verstärkt.

Erklärungsmodelle für die post-ischämischen vaskulären Funktionsstörungen beziehen sich in erster Linie auf biochemische Milieuveränderungen während der Reperfusion (Heindl *et al.*, 1998). Bekannt ist, dass es nach Ischämie zu einem relativen Mangel an vasodilatatorisch wirksamem NO kommt. Zudem vermindern die im unterversorgten Gewebe vermehrt auftretenden freien Radikale die Relaxation der Gefäßmuskulatur (Vaage und Valen, 1993). Am Gefäßendothel adhärent gewordene PMNs könnten somit auch diese Prozesse durch die Freisetzung von Radikalen in der Reperfusion fortsetzen oder sogar verstärken. Kupatt und Kollegen (1997) wiesen in isoliert-perfundierten Meerschweinchenherzen einen direkten Zusammenhang zwischen einer PMN-Applikation und der post-ischämischen vaskulären Dysfunktion nach. Hierbei konnte die nach 15-minütiger globaler Ischämie beobachtete Reduktion des post-ischämischen Koronarflusses durch Infusion antioxidativ wirkender Harnsäure fast vollkommen wieder aufgehoben werden.

An dieser Stelle soll auf die Verwendung humaner PMNs und deren extrakorporale Stimulation durch das chemotaktische Peptid fMLP näher eingegangen werden. Zur Qualitätskontrolle der täglich frisch gewonnenen PMN-Suspension wurden standardmäßig Zellzählungen mittels Coulter Counter durchgeführt. Hierbei erfolgte automatisch eine Zelldifferenzierung, die eine Überprüfung der Reinheit der

Zellsuspension ermöglichte. Um auszuschließen, dass die Zellen während der Präparation beschädigt wurden, führten wir einen Zell-Vitalitätstest mittels Trypanblaufärbung durch. Übereinstimmend mit der von Hjorth *et al.* (1981) bei vergleichbarer PMN-Gewinnungsmethode beobachteten Vitalitätsrate (98%) wiesen wir trotz unvermeidbarer mechanischer Beanspruchung der Zellen während der Isolierung eine Vitalitätsrate von über 95% nach. Die Stimulierung der Zellen mit fMLP wirkte sich nicht signifikant auf die Vitalitätsrate aus, so dass von einer intakten Zellpopulation ausgegangen werden konnte.

Eine endotheliale leukozytäre Interaktion wird wie bereits beschrieben durch spezifische Adhäsionsmoleküle vermittelt (Kapitel 1.3.1.4). Erst die Zellaktivierung führt zur Hochregulation dieser Adhäsionsmoleküle. Um eine endotheliale leukozytäre Interaktion in dem Modell des isoliert-perfundierten Herzens zu fördern, war somit eine Aktivierung beider Zelltypen notwendig. In der Literatur wird für das Modell des PMN-induzierten Reperfusionsschadens im isoliert-perfundierten Herzen standardmäßig eine Stimulation des Endothels mittels Thrombin-Infusion beschrieben. Thrombin induziert die endotheliale Synthese des Plättchen-aktivierenden Faktors (PAF), welcher wiederum am Endothel rollende Leukozyten über spezifische PAF-Rezeptoren aktiviert (Park und Lucchesi, 1999). Im Rahmen der Modelletablierung untersuchten wir verschiedene PMN-Stimulationsmethoden. Eine sehr physiologische Stimulation der PMNs kann durch die simultane Applikation von Plasma erfolgen. Faktoren des Komplementsystems, wie C5a oder C3a, sollen dabei die PMNs aktivieren. Im Gegensatz zu Lefer *et al.* (1993c) konnten wir unter diesen Versuchsbedingungen keine PMN-induzierte Veränderung der Herzfunktion im Vergleich zur zellfreien Kontrollgruppe beobachten (Daten nicht gezeigt). In der Annahme, dass die PMN-Stimulation in unseren Versuchen zu gering ausgefallen war, veränderten wir unsere Versuchsbedingungen dahingehend, dass die PMNs einer etwas stärkeren Stimulation unterzogen wurden. Eine simultane Perfusion von fMLP und PMNs nach Raschke *et al.* (1993) führte jedoch ebenfalls nicht zu den erwarteten Ergebnissen. Erst die Inkubation der humanen PMNs mit fMLP (10 nM) kombiniert mit der Aktivierung des Endothels mittels prä-ischämischer Thrombin-Infusion (0,3 U/ml) führte im Vergleich zu den zellfrei-perfundierten Herzen zu einer Verschlechterung der myokardialen Hämodynamik.

Es stellt sich die Frage, ob die post-ischämische Applikation vorstimulierter PMNs die *in vivo*-Verhältnisse während eines Reperfusionsgeschehens widerspiegelt. Hierbei muss berücksichtigt werden, dass sowohl die Ischämie als auch die Reperfusion als Stimulus eines Entzündungsgeschehens gelten (Entman und Ballantyne, 1993). Unter Ischämie-Reperusionsbedingungen ist *in vivo* somit eine zunehmende Aktivierung und Adhäsionstendenz der Zellen zu erwarten. Des Weiteren werden Blutzellen bei herzchirurgischen Eingriffen durch Verwendung von extrakorporalen Zirkulationsverfahren ebenfalls aktiviert (el Habbal *et al.*, 1997; Royston, 1997). Die Blutzellen treten dabei in Kontakt mit einem Kunststoffschlauchsystem und werden durch mechanische Scherkräfte aktiviert. Klinische Studien belegen bei Patienten, an denen invasive kardiologische Eingriffe vorgenommen wurden, eine erhöhte Expression von Adhäsionsmolekülen auf Blutzellen (Furman *et al.*, 1998; Neumann *et al.*, 1994; Ott *et al.*, 1996). Aber auch ohne die Verwendung eines extrakorporalen Kreislaufs kommt es *in vivo* unter post-ischämischen Bedingungen zur Zellaktivierung. Dies belegen klinische Untersuchungen an Patienten mit einer instabilen Angina pectoris (Entman und Ballantyne, 1993), mit koronaren Spasmen (Ikeda *et al.*, 1995) oder nach akutem Myokardinfarkt (Mehta *et al.*, 1989).

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die Applikation vorstimulierter humaner PMNs auf isoliert-perfundierte Rattenherzen die *in-vivo-Situation* wiedergibt. Dieses *ex-vivo-Modell* ist somit geeignet, den Einfluss von PMNs auf den myokardialen Ischämie-Reperfusionsschaden zu untersuchen. Die Reperfusion der isolierten Langendorff-Herzen mit humanen PMNs erzeugte in unseren Versuchen eine deutliche Verstärkung der vaskulären und myokardialen Dysfunktion im Vergleich zu den zellfrei-perfundierten Herzen. Diese Daten bestätigen allgemeine Beobachtungen aus der Literatur und belegen eindeutig den Einfluss von PMNs auf den funktionellen Reperfusionsschaden in isoliert-perfundierten Rattenherzen.

4.1.2 Einfluss der PMNs auf die Infarktgröße

Die PMN-Applikation hatte in dem Modell des isoliert-perfundierten Herzens keinen signifikanten Einfluss auf die Infarktgröße. Im Vergleich zu den zellfrei-perfundierten Herzen (19,7%) wiesen die PMN-perfundierten Herzen (23,9%) lediglich eine tendenzielle Vergrößerung des Infarkts auf. Dieses Ergebnis wurde durch die Bestimmung

der CK- und LDH-Aktivitäten aus den koronarvenösen Effluaten der Herzen bestätigt. Eine solche Freisetzung von intrazellulärer CK und LDH kennzeichnet den Verlust der Zellmembranintegrität. Sie repräsentiert damit den Zelluntergang (Lott und Stang; 1980). Die CK- und LDH-Konzentrationen der PMN-perfundierten Herzen unterschieden sich während des gesamten Reperusionszeitraums nicht signifikant von den CK- und LDH-Konzentrationen der zellfrei-perfundierten Herzen.

Dieses Ergebnis war überraschend, da tierexperimentelle *in-vivo-Untersuchungen* eine Beteiligung von Leukozyten an der Entstehung eines letalen Reperfusionsschadens eindeutig belegt haben. Beispielsweise führte die Hemmung einer endothelialen Leukozyten-Adhäsion durch Behandlung mit einem gegen das Leukozyten-Adhäsionsmolekül CD11/18 gerichteten Antikörpers in unterschiedlichen Versuchsansätzen zu einer Verringerung der Infarktgröße (Tanaka *et al.*, 1993; Aversano *et al.*, 1995; Arai *et al.*, 1996; Palazzo *et al.*, 1998). Jedoch konnten diese tierexperimentellen Befunde bisher noch nicht in klinischen Studien bestätigt werden. Weder in der LIMIT-AMI- noch in der HALT-MI-Studie wurde bei Patienten mit akuten Myokardinfarkt die Infarktgröße durch eine Behandlung mit dem CD11/18-Antikörper verringert (Baran *et al.*, 2001; Faxon *et al.*, 2002). Die klinische Relevanz der PMNs für die Entstehung eines letalen Reperfusionsschadens ist demnach noch nicht vollkommen aufgeklärt. Unter Berücksichtigung der zur Zeit herrschenden Meinung über die Pathogenese des myokardialen Reperfusionsschadens und der tierexperimentellen Untersuchungsergebnisse der obengenannten Autoren wäre ein deutlicher gewebeschädigender Einfluss durch PMNs in unserem Modell zu erwarten gewesen.

Der Zusammenhang zwischen einer PMN-Applikation und der Infarktgröße während eines Ischämie-Reperusionsgeschehens ist im Modell des isoliert-perfundierten Herzens bisher lediglich von Ohnishi *et al.* (1999) untersucht worden. Die Autoren konnten unter PMN-Applikation nach einer 20-minütigen globalen Ischämie und Reperfusion keine PMN-induzierte Myokardnekrose nachweisen. Dieses Ergebnis ist weniger überraschend als unseres, da nach einer Ischämiezeit von 20 Minuten in der Regel noch keine irreversiblen Gewebeschädigungen eintreten. Möglicherweise wird in unserem Modell eine größere Gewebeschädigung durch die PMNs dadurch verhindert, dass im Verlauf der 60-minütigen Reperfusion die zu Beginn der

Reperfusion am Endothel adhärierenden Zellen mit dem Perfusat wieder aus dem Herzen ausgespült werden. Ferner ist möglicherweise die 10-minütige Dauer der PMN-Reperfusion zu kurz, als dass sie einen größeren PMN-induzierten Gewebeschaden erzeugen könnte. Eine Perfusion mit PMNs über den gesamten Reperusionszeitraum würde eine dauerhafte Zelladhäsion an das Gefäßendothel ermöglichen und ein Auswaschen mit dem Perfusat verhindern.

Will man *in-vivo-Untersuchungen* mit Versuchsergebnissen aus dem *ex-vivo-Modell* vergleichen, so sollte ebenfalls berücksichtigt werden, dass eine Reperfusion *in vivo* in der Regel über mehrere Stunden erfolgt. Im isoliert-perfundierten Herzen dagegen führen lange Reperusionszeiten zu einer modellbedingten Abnahme der Hämodynamik. Sie werden demzufolge vermieden. Folglich ist es durchaus möglich, dass ein *in vivo* beobachteter PMN-induzierter Nekroseschaden in dem von uns gewählten *ex-vivo-Modell* aufgrund einer verkürzten Reperusionszeit nicht in dem gleichen Ausmaß zu Tage tritt. Es ist jedoch nicht außer Acht zu lassen, dass die Infarktgröße unter PMN-Applikation in den isoliert-perfundierten Langendorff-Herzen gegenüber den zellfrei-perfundierten Kontrollherzen um 20% erhöht war. Das Testprinzip der myokardialen Infarktgrößenbestimmung mittels TTC-Färbung beruht auf einer enzymatischen Umsetzung des Farbreagenzes mittels Dehydrogenasen aus dem gesunden Gewebe. Diese ermöglicht jedoch keine so klare Abgrenzung zwischen gesundem und nekrotischem Gewebe in isoliert-perfundierten Herzen, wie dies beispielsweise bei Herzen aus *in-vivo*-Versuchen der Fall ist. Es ist daher denkbar, dass ein durch PMNs erzeugter Gewebeschaden nach der Untersuchung im Langendorff-Modell nicht so deutlich von dem gesunden Gewebe abgegrenzt werden kann. Somit ist es möglich, dass geringe Veränderungen in der Nekroseentstehung bei einer relativ geringen „N-Zahl“, wie sie von uns gewählt wurde, nicht erfasst werden konnten. Es bleibt jedoch festzuhalten, dass die erhöhte Infarktgröße nach PMN-Applikation ebenfalls mit einer geringen, wenn auch nicht signifikanten Erhöhung von CK und LDH einherging.

4.1.3 Einfluss der PMNs auf die Zytokinfreisetzung

Die ischämischen Herzen wiesen in dem Modell des isoliert-perfundierten Rattenherzens im Vergleich zu den nicht-ischämischen Herzen eine signifikant erhöhte Zytokinkonzentration auf. Durch die PMN-Perfusion wurden die myokardialen Zytokinkonzentrationen weiter erhöht. In den PMN-perfundierten Herzen war gegenüber den zellfrei-perfundierten ischämischen Kontrollherzen die TNF- α -Konzentration verdoppelt und die Il-1 β -Konzentration verdreifacht.

Während einer post-ischämischen Reperfusion werden die proinflammatorischen Zytokine TNF- α und Il-1 β freigesetzt (Entman und Smith, 1994; Gurevitch *et al.*, 1996). Die während eines Reperfusionsgeschehens vermehrt gebildeten Sauerstoffradikale induzieren hierbei die Zytokinfreisetzung (Barnes und Karin, 1997). Diese Zytokine sollen an der Entstehung einer myokardialen post-ischämischen Dysfunktion beteiligt sein (Gurevitch *et al.*, 1997; Frangogiannis *et al.*, 1998). Für TNF- α und Il-1 β ist eine negativ inotrope Wirkung in der Vergangenheit mehrfach belegt worden (siehe Kapitel 1.3.1.3).

Ein Zusammenhang zwischen einem PMN-induzierten Reperfusionsschaden und der Zytokinfreisetzung in isoliert-perfundierten Herzen ist bislang in der Literatur noch nicht beschrieben worden. In der vorliegenden Arbeit untersuchten wir daher, ob die Applikation humaner PMNs die myokardiale Zytokinfreisetzung in unserem Modell beeinflusst. Betrachtet man diese Ergebnisse in Zusammenhang mit unseren hämodynamischen Daten, so liegt die Vermutung nahe, dass die verstärkte linksventrikuläre Dysfunktion in den PMN-perfundierten Herzen mitunter durch eine Radikal-induzierte Zytokinfreisetzung erzeugt wird.

4.2 BEHANDLUNG MIT DEM CD18-ANTIKÖRPER

4.2.1 Einfluss auf die myokardiale Dysfunktion

Im verwendeten Modell des isoliert-perfundierten Rattenherzens führte die Behandlung mit dem CD11/18-Antikörper zu einer signifikanten Verminderung der PMN-induzierten myokardialen Dysfunktion. Übereinstimmend mit den Untersuchungen von Lefer *et al.* (1993c) konnten wir den unter PMN-Applikation beobachteten post-ischämischen linksventrikulären Funktionsverlust mittels CD11/18-Antikörper-Behandlung nahezu vollkommen aufheben. Hierbei wurden sowohl die unter PMN-Applikation verschlechterte Kontraktion und Relaxation als auch der post-ischämische Koronarfluss signifikant verbessert. Dies äußerte sich in einer signifikanten Erhöhung der maximalen Druckerhöhung (dP/dt_{max}) und Druckabfallgeschwindigkeit (dP/dt_{min}), einer Erhöhung des systolischen Drucks (LVP_{sys}) sowie des „Pressure Rate Products“ (PRP). Außerdem war der unter PMN-Perfusion erhöhte linksventrikuläre diastolische Druck (LVP_{dia}) weitestgehend normalisiert und unterschied sich nicht mehr von dem LVP_{dia} der zellfrei-perfundierten Herzen.

Das leukozytäre Adhäsionsmolekül CD11/CD18 gehört zur Familie der Integrine und vermittelt die fixe, so genannte sekundäre Adhäsion der Leukozyten an der Gefäßwand. Diese erfolgt *in vivo* entweder an immobilisierten, gefäßständigen Thrombozyten oder nach direktem Kontakt mit dem vaskulären Endothel über Selektin-vermitteltes Rollen (Konstantopoulos *et al.*, 1998). Eine vermehrte Expression von CD11/CD18 kann nach Rezeptor-vermittelter Stimulation, etwa durch den Plättchen-aktivierenden Faktor, oder nach mechanischer Irritation erfolgen (Park und Lucchesi, 1999). Die Beteiligung des CD11/CD18-Adhäsionsmoleküls an der Entstehung eines Reperfusionsschadens ist in einer Studie mit CD18-Knock-out-Mäusen eindeutig belegt worden. Hierbei wiesen Palazzo und Kollegen (1998) *in vivo* nach 30 Minuten Ischämie und 120 Minuten Reperfusion im ischämischen Herzmuskelgewebe der Knock-out-Mäuse einen verminderten Myokardschaden und eine verminderte PMN-Akkumulation nach. Des Weiteren wurde, wie bereits erwähnt, in tierexperimentellen Untersuchungen mehrfach eine Reduktion des Reperfusionsschadens nach Anwendung eines CD11/CD18-Antikörpers beschrieben

(Kapitel 4.1.2). Aus diesem Grund verwendeten wir in der vorliegenden Arbeit zur Validierung unseres Modells einen CD11/CD18-Antikörper.

Unsere unter CD11/CD18-Antikörper-Behandlung beobachteten Befunde bestätigen eine zu Anfang dieser Arbeit postulierte Beteiligung der PMNs an der Entstehung eines post-ischämischen Reperfusionsschadens in isoliert-perfundierten Rattenherzen. Ferner belegen sie, dass eine pharmakologische Intervention in unserem Modell möglich ist. Diese führt zu einer Verbesserung der PMN-induzierten post-ischämischen Myokardfunktion. Auf eine Untersuchung der Infarktgröße nach Behandlung mit dem CD11/CD18-Antikörper wurde verzichtet, da zuvor die PMN-Perfusion keinen signifikanten Effekt auf die Infarktgröße aufgewiesen hatte.

4.2.2 Einfluss auf die Zytokinfreisetzung

Die Konzentration der proinflammatorischen Zytokine TNF- α und Il-1 β wurde nach Behandlung mit dem CD11/CD18-Antikörper gegenüber den unbehandelten PMN-perfundierten Herzen signifikant gesenkt. Hierbei entsprachen die gemessenen myokardialen Zytokinkonzentrationen in etwa den Zytokinkonzentrationen der zellfrei-perfundierten Herzen. Im Zusammenhang mit den funktionellen Daten lassen diese Ergebnisse darauf schließen, dass TNF- α und Il-1 β im Modell des isoliert-perfundierten Herzens an der Entstehung eines funktionellen Reperfusionsschadens beteiligt sind. Diese Hypothese wird durch unterschiedliche *in-vivo-Untersuchungen* aus der Vergangenheit gestützt: Beispielsweise wird in Rattenherzen nach einer TNF- α -Antikörper-Behandlung eine verringerte post-ischämische linksventrikuläre Dysfunktion beschrieben (Bozkurt *et al.*, 1998). Des Weiteren führte die Hemmung der p38-MAP-Kinase – einem mitogen-aktivierten Protein – durch Behandlung mit dem Zytokinsuppressivum FR167653 zu einer verringerten TNF- α - und Il-1 β -Produktion. Diese wiederum führte in Ratten nach 20-minütiger Ischämie und zwei-stündiger Reperfusion zu einer Verringerung des myokardialen Reperfusionsschadens (Kobayashi *et al.*, 2002). Ferner haben jüngste Untersuchungen an TNF- α -Knock-out-Mäusen gezeigt, dass TNF- α einen Reperfusionsschaden über die Aktivierung des nukleären Transkriptionsfaktor- κ B (NF- κ B) vermittelt. Hierbei wiesen die Autoren eine konsekutive Expressionssteigerung von Chemokinen und Adhäsionsmolekülen nach. Diese erleichterte wiederum eine Leukozyten-Infiltration

(Maekawa *et al.*, 2002). Es ist demnach sehr wahrscheinlich, dass in unserem Modell durch eine externe PMN-Applikation in den isoliert-perfundierten Herzen eine Zytokinfreisetzung induziert wird und konsekutiv durch eine Zytokin-vermittelte negativ inotrope Wirkung der funktionelle Reperfusionsschaden erhöht wird. Die Beteiligung der Zytokine an der Entstehung eines myokardialen Reperfusionsschadens ist jedoch nicht isoliert zu betrachten, sondern muss als ein Teil von verschiedenen Schädigungsmechanismen angesehen werden.

4.3 BEHANDLUNG MIT DEM ENOS-TRANSKRIPTIONSVERSTÄRKER

4.3.1 Einfluss auf die myokardiale Dysfunktion

Erstmals untersuchten wir die Wirkung der Erhöhung der endothelialen NO-Synthese-Transkription durch S803 (10 mg/kg/d) auf den PMN-induzierten Reperfusionsschaden isoliert-perfundierter Rattenherzen. Dabei wiesen wir in unserer Studie durch Behandlung mit S803 eine signifikante Verminderung der PMN-induzierten myokardialen Dysfunktion nach: Der linksventrikuläre systolische Druck (LVP_{sys}) war gegenüber den unbehandelten Herzen signifikant erhöht. Die deutlich verbesserte linksventrikuläre systolische Funktion zeigte sich außerdem in einer signifikant erhöhten Druckanstiegsgeschwindigkeit (dP/dt_{max}) und in einem verbesserten „Pressure Rate Product“ (PRP) gegenüber den unbehandelten PMN-perfundierten Herzen. Auf eine deutlich verbesserte Relaxation in der Diastole wies die signifikant erhöhte maximale Druckabfallsgeschwindigkeit (dP/dt_{min}) hin. Ferner war der unter PMN-Perfusion erhöhte linksventrikuläre diastolische Druck (LVP_{dia}) weitestgehend normalisiert. Die Verbesserung von Systole und Diastole unter Behandlung mit S803 äußerte sich auch in einem erhöhten post-ischämischen Koronarfluss.

In der Vergangenheit hat die intravenöse Gabe von NO-Donoren zu einer verbesserten vaskulären und kardialen Funktionalität und einer verminderten PMN-Akkumulation im ischämischen Gewebe geführt. Ferner wurde nach Ischämie und Reperfusion eine verminderte Nekroseentstehung beobachtet (Tabelle 14). Welche möglichen Mechanismen können der Wirkung durch den eNOS-Transkriptionsverstärker in dem Modell des PMN-induzierten Reperfusionsschadens isoliert-

perfundierter Rattenherzen zugrunde liegen? Zunächst sei nochmals darauf hingewiesen, dass einer der wichtigsten Faktoren der frühen Entstehungsphase des Reperfusionsschadens die endotheliale Dysfunktion darstellt. Vor allem in den ersten fünf Minuten der Reperfusion ist sie charakterisiert durch eine verminderte endotheliale NO-Bioverfügbarkeit (Tsao und Lefer, 1990; Tsao *et al.*, 1990). Diese wiederum fördert das Anhaften von PMNs an das reperfundierte vaskuläre Endothel. Hierdurch wird möglicherweise sowohl eine vaskuläre als auch eine kardiale Dysfunktion durch die Freisetzung freier Radikale, Proteasen und proinflammatorischer Proteine gefördert (Ma *et al.*, 1993).

Tabelle 14: Wirkung verschiedener NO-Donoren auf das Myokard nach Ischämie und Reperfusion

Autor	NO-Donor	Tierspezies	Protokoll	Wirkung
Siegfried <i>et al.</i> (1992a)	SPM-5185	Katze	90' regionale I. + 270' R.	↓ Koronare vaskuläre Endothelschädigung u. ↓ myokardiale Nekrose
Siegfried <i>et al.</i> (1992b)	C84-3754 SIN-1	Katze	90' regionale I. + 270' R.	↓ Koronare vaskuläre Endothelschädigung u. ↓ myokardiale Nekrose
Lefer <i>et al.</i> (1993a)	SPM-5185	Hund	60' regionale I. + 270' R.	↓ PMN-Akkumulation u. ↓ myokardiale Nekrose
Lefer <i>et al.</i> (1993b)	SPM-5185	Hund	30' globale I. + 120' R.	↑ Myokardiale Kontraktilität
Pabla <i>et al.</i> (1995)	CAS-1609	Kaninchen	30' regionale I. + 360' R.	↓ PMN-Akkumulation u. ↓ myokardiale Nekrose
Wainwright <i>et al.</i> (1993)	CAS-936	Schwein	30' regionale I. + 0' R.	↓ Arrhythmien
Martorana <i>et al.</i> (1983)	Molsidomin	Hund	30' regionale I. + 0' R. 180' regionale I. + 0' R.	↓ Myokardiale Nekrose

Die Wirkungen auf die myokardiale post-ischämische Funktion, die Myokardnekrose und die PMN-Akkumulation wurden mit den folgenden Symbolen dargestellt: ↓ = vermindert, ↑ = erhöht (I = Ischämie; R = Reperfusion; PMN = polymorphkernige neutrophile Granulozyten).

Auf Grundlage dieser Datenlage postulierten wir am Beginn dieser Arbeit eine kardioprotektive Wirkung durch S803 über einen NO-abhängigen Mechanismus. Um diese Hypothese zu bestätigen, untersuchten wir zunächst die reaktive Hyperämieantwort isoliert-perfundierter Rattenherzen. Hierbei wiesen die Herzen S803-behandelter Ratten eine dosisabhängige signifikante Verbesserung des Durchflussvolumens gegenüber den Herzen Placebo-behandelter Ratten auf. Diese

Beobachtungen lassen auf eine durch den eNOS-Transkriptionsverstärker S803 induzierte vermehrte endotheliale NO-Verfügbarkeit schließen. Durch die Gabe des NO-Synthasehemmers L-NAME wurde die zuvor unter S803-Behandlung verbesserte reaktive Hyperämieantwort wieder aufgehoben und bestätigte somit einen postulierten NO-abhängigen Mechanismus. Darüber hinaus wiesen die Herzen S803-behandelter Ratten gegenüber den mit Placebo behandelten Herzen eine dosisabhängige signifikante Erhöhung der eNOS-Expression auf. Schließlich untersuchten wir als Positivkontrolle für einen NO-abhängigen Wirkungsmechanismus den Einfluss von Simvastatin auf die reaktive Hyperämieantwort und den PMN-induzierten Reperfusionsschaden isoliert-perfundierter Herzen. Wie bereits beschrieben (Kapitel 1.4.1), zeigen HMG-CoA-Reduktase-Hemmer eine Reihe cholesterolumabhängiger Effekte, wie beispielsweise eine Verbesserung der NO-Verfügbarkeit durch Stabilisierung der eNOS-mRNA (Laufs *et al.*, 1997). Ebenso wie die Behandlung mit S803 führte die Behandlung der Ratten mit Simvastatin zu einer signifikanten Erhöhung der myokardialen eNOS-Expression und folglich zu einer Verbesserung des Durchflussvolumens während der reaktiven Hyperämie. Ferner wurde unter der Vorbehandlung mit Simvastatin die PMN-induzierte myokardiale Dysfunktion der isoliert-perfundierten Rattenherzen signifikant vermindert. Überraschenderweise zeigte die Gabe von L-NAME in den Simvastatin-behandelten Herzen jedoch nur eine geringfügige Hemmung des Durchflussvolumens während der reaktiven Hyperämie. Die in unseren Versuchen verwendete L-NAME-Konzentration (30 μM) ist ausreichend, um eine effektive Hemmung der NO-Synthese zu bewirken (Rees *et al.*, 1990). Außerdem weisen sowohl der unter L-NAME herabgesetzte basale Koronarfluss als auch die verminderte reaktive Hyperämieantwort der S803- und Placebo-behandelten Tiere auf eine Hemmung der NO-Produktion durch L-NAME hin. Dies lässt vermuten, dass die erhöhte reaktive Hyperämieantwort nach einer Behandlung mit Simvastatin bei einer Dosierung von 2 mg/kg pro Tag nicht ausschließlich NO-vermittelt ist. Der HMG-CoA-Reduktase-Hemmer beeinflusst möglicherweise andere Mediatoren der reaktiven Hyperämie, wie z. B. Adenosin, Prostacycline, den endothelialen hyperpolarisierenden Faktor (EDHF) oder ATP-sensitive Kaliumkanäle (K^+ -ATP-Kanäle) (Kanatsuka *et al.*, 1992; Kostic und Schrader, 1992; Lee *et al.* 1992; Viau *et al.*, 1997). Weiterführende Untersuchungen sind notwendig, um die Interaktion von Simvastatin und den Mediatoren der reaktiven Hyperämie aufzuklären.

Die Herzen der mit Simvastatin behandelten Ratten haben trotz stärkerer eNOS-Expressionssteigerung im Vergleich zu den Herzen der S803-behandelten Ratten weder eine verbesserte reaktive Hyperämieantwort noch eine bessere Funktion nach PMN-Applikation aufgewiesen. Dagegen führte die Behandlung der Ratten mit S803 zu einer dosisabhängigen myokardialen eNOS-Expressionssteigerung. Ebenfalls wiesen wir ein dosisabhängig verbessertes Durchflussvolumen während der reaktiven Hyperämie nach. Nach der Behandlung mit Simvastatin war dagegen kein quantitativer Rückschluss von der myokardialen eNOS-Proteinmenge auf die verbesserte reaktive Hyperämieantwort möglich. Diese Beobachtungen geben weitere Hinweise darauf, dass Simvastatin im Modell des isoliert-perfundierten Rattenherzens nicht ausschließlich über eine Erhöhung der NO-Bioverfügbarkeit gewirkt haben könnte.

Auf welche Weise der eNOS-Transkriptionsverstärker die eNOS-Expression in den Rattenherzen erhöht, ist bislang nicht bekannt. Auf der Suche nach einem möglichen Rezeptor bzw. Zielprotein für diese Substanz konnte bisher nur eine Reihe von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, u. a. adrenerge, muskarinische bzw. cholinerge Rezeptoren, ausgeschlossen werden. Ferner moduliert die Substanz *in vitro* weder die Aktivität von Adenylatcyclasen, Guanylatcyclasen, NO-Synthasen, Phosphodiesterasen noch die von Proteinkinase C. Bisher bekannte kardiovaskulär wichtige Zielproteine scheinen damit als Angriffspunkt für S803 ausgeschlossen.

In dem Modell des isoliert-perfundierten Rattenherzens haben wir nach Behandlung mit dem eNOS-Transkriptionsverstärker S803 sowohl funktionell als auch molekularbiologisch im Wirkungsmechanismus eine eNOS-Abhängigkeit belegen können. Es ist demnach denkbar, dass eine nach Ischämie und Reperfusion verminderte NO-Bioverfügbarkeit teilweise durch S803 wieder aufgehoben wird und dass auf diese Weise ein vorhandenes Ungleichgewicht zwischen endotheliale NO und Sauerstoffradikalen zugunsten des endogenen NO verschoben wird.

Welcher molekularbiologische Wirkungsmechanismus durch das endogene NO kann in dem PMN-perfundierten Rattenherzmodell vorliegen? NO steuert die Translokation des zellulären Adhäsionsmoleküls P-Selektin über die Regulation der Proteinkinase C (PKC). Während einer myokardialen Ischämie und ganz besonders

während der frühen Reperfusionperiode wird die PKC vermehrt aktiviert (Strasser *et al.*, 1992). Eine PKC-Aktivierung führt auf Plättchen und Endothelzellen zu einer schnellen Hochregulierung des P-Selektins. Diese wiederum fördert die Zell-Zell-Interaktion (Geng *et al.*, 1990). Die PKC wird durch endotheliales NO gehemmt (Takai *et al.*, 1981; Gopalakrishna *et al.*, 1993). Dies lässt vermuten, dass NO in einem Ischämie-Reperfusionsgeschehen die Expression von P-Selektin hemmen und somit die PMN-Akkumulation im reperfundierten Myokard vermindern könnte. Tatsächlich beobachteten Scalia *et al.* (1996) als Folge der direkten Hemmung der PKC mittels eines trimethylierten Sphingosinderivates (TMS) ein vermindertes Rollen und Adhärenzen von Leukozyten am Gefäßendothel der Ratte. Zwei Jahre später bestätigten Campbell und Kollegen diese Versuchsergebnisse in einer *ex-vivo*-Studie. Die Autoren untersuchten die Wirkung von TMS auf einen PMN-induzierten Reperfusionsschaden in isoliert-perfundierten Rattenherzen. Neben einer verminderten PMN-Akkumulation wiesen sie eine kardioprotektive Wirkung nach. Im gleichen Modell stellten Ohnishi *et al.* (1999) nach Gabe eines anti-P-Selektin-Antikörpers (PB1.3) eine verbesserte post-ischämische Myokardfunktion fest. Diese Daten deuten darauf hin, dass P-Selektin in der Pathogenese des PMN-induzierten Reperfusionsschadens eine wichtige Rolle spielt und dass diese über NO reguliert werden kann.

Ein weiterer Zusammenhang zwischen einer PKC-Hemmung und der kardioprotektiven Wirkung durch NO ist in der Arbeit von Young *et al.* (2001) beschrieben. Die Autoren wiesen eine Hemmung der Superoxidfreisetzung aus PMNs nach Gabe des PKC-Inhibitors Staurosporin nach. Des Weiteren führte die Applikation von Staurosporin zu einem verminderten PMN-induzierten Reperfusionsschaden in isoliert-perfundierten Herzen. Die Hemmung der Superoxidfreisetzung aus PMNs durch Staurosporin ist in jüngster Zeit mehrfach beschrieben worden (Chen und Catravas, 1998; Yan und Novak, 1999; Zhang *et al.*, 1999). Dieser Effekt soll nach Young und Kollegen die kardiodepressive Wirkung durch Radikale verzögern und somit eine kardiale Dysfunktion in dem *ex-vivo-Modell* vermindern. Eine pharmakologische Reduktion der Bildung freier Radikale und deren beschleunigte Elimination durch niedermolekulare Antioxidantien oder der enzymatische Abbau schwächen eine myokardiale Dysfunktion ab. Die Erholung der kontraktile Funktion wird hierbei beschleunigt. Kausale Bedeutung für die

Ausbildung des „stunings“ haben nur die freien Radikale, die unmittelbar mit Beginn der Reperfusion gebildet werden (Bolli *et al.*, 1989). Wie groß der quantitative Anteil freier Radikale an der Ausbildung eines kardialen Funktionsschaden ist, bleibt unklar, denn auch rechtzeitige und kombinierte antioxidative Therapie kann das „stunning“ nicht vollständig verhindern (Hearse, 1991). Es wäre demnach vorstellbar, dass eine erhöhte NO-Verfügbarkeit nach einer Behandlung mit S803 sowohl die endotheliale leukozytäre Interaktion als auch die Radikalbildung über die Regulierung der PKC-Aktivität vermindert und somit eine PMN-induzierte linksventrikuläre Dysfunktion nach Ischämie und Reperfusion verbessert.

4.3.2 Einfluss auf die Infarktgröße

Wir untersuchten den Einfluss des eNOS-Transkriptionsverstärkers S803 auf die Nekroseentstehung nach 30 Minuten Ischämie und 60 Minuten zellfreier Reperfusion. Die Herzen der mit S803 vorbehandelten Ratten wiesen keine signifikant unterschiedliche Infarktgröße (17,9%) gegenüber den Herzen Placebo-behandelter Ratten (19,7%) auf. Ebenso hatte die Behandlung mit Simvastatin (18,9%) keinen Einfluss auf die Infarktgröße. Die Bestimmungen der Creatinkinase und Lactatdehydrogenase bestätigten diese Befunde. Während des gesamten Reperusionszeitraums waren die CK- und LDH-Konzentrationen in den Effluaten der mit S803 behandelten Herzen von denen Effluaten der mit Placebo behandelten Herzen nicht signifikant unterschiedlich. Ebenso wiesen die Effluate der mit Simvastatin behandelten Ratten keine erhöhten CK- und LDH-Konzentrationen auf.

Diese Beobachtungen sind insofern von Bedeutung, als sie die Vermutung bestärken, dass endogenes NO im *ex-vivo-Modell* des myokardialen Reperfusionsschadens über eine Hemmung des PMN-induzierten Myokardschadens kardioprotektiv wirkt, nicht jedoch den ischämiebedingten Myokardschaden verhindert. In der Vergangenheit ist durch exogen zugeführtes NO (NO-Donoren) eine Reduzierung der Infarktgröße nach Ischämie und Reperfusion mehrfach belegt worden (Tabelle 14). Unter Berücksichtigung dieser Datenlage erscheint der fehlende Einfluss von S803 auf die Entstehung eines ischämiebedingten Gewebes Schadens überraschend. Die Aktivierung der endothelialen NO-Synthase während einer Ischämie ist im isoliert-perfundierten Rattenherzen mehrfach beschrieben worden

(Csonka *et al.*, 1999; Depre *et al.*, 1997). Da wir in den Herzen S803-behandelter Ratten eine signifikante eNOS-Expressionssteigerung nachgewiesen haben, muss von einer vermehrten endogenen NO-Produktion ausgegangen werden, auch wenn wir diese in unseren Versuchen nicht durch eine Messung der endothelialen NO-Freisetzung belegt haben. Jedoch belegen *in-vitro-Studien* von Aventis, dass eine Erhöhung der eNOS-Transkription durch S803 zu einer Gesamterhöhung der eNOS-Expression in humanen Zellkulturen führt. Diese geht auch mit einer Erhöhung des endothelial freigesetzten NO einher. Um letzteres in den Zellkulturen verlässlich zu messen, wurden nach 18-stündiger Vorbehandlung mit S803 humane Endothelzellen mit Bradykinin stimuliert und intrazellulär gebildetes cGMP als Surrogat für NO bestimmt (Wohlfart *et al.*, 2003). Die hierbei gemessenen cGMP-Konzentrationen waren nach Behandlung mit S803 um das 1,7-fache erhöht.

In intakten Organpräparaten dagegen lässt sich die Menge an endogen, aus Endothelzellen freigesetztem NO nicht zuverlässig messen. Zwar existieren heutzutage eine Reihe von technischen Möglichkeiten, wie z. B. so genannte NO-Sonden, die aber wohl aufgrund ihrer geringen Sensitivität bisher nicht breit zur Anwendung gekommen sind. Alternativ wurde die indirekte Bestimmung des NO in Erwägung gezogen. In Vorversuchen wies jedoch die Bestimmung des cGMP-Gehalts aus dem Effluat isoliert-perfundierter Herzen hohe Schwankungen auf. Daher wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit ebenfalls auf diese Methodik verzichtet. Entsprechende *in-vitro-Studien* haben jedoch eine Erhöhung der eNOS-Expression durch S803 lückenlos nachgewiesen. Diese geht mit einer gleichsinnigen Erhöhung von endothelalem NO um einen vergleichbaren Faktor einher. Aus diesem Grund wurde im komplexen Modell des isoliert-perfundierten Herzens die kardiale eNOS-Expression als Zielparameter für die Modulation des endothelialen NO-Signaltransduktionsweges verwendet.

Festzuhalten ist, dass durch den eNOS-Transkriptionsverstärker S803 die Freisetzung von endothelalem NO nur moderat beeinflusst wird. Dagegen werden über die Gabe eines NO-Donors vergleichsweise 100-fach höhere Konzentrationen an NO zur Verfügung gestellt (Ignarro *et al.*, 2002). Die Verminderung der Infarktgröße unter der Gabe eines NO-Donors lässt sich somit auf eine im Vergleich zu S803 vielfach höhere NO-Konzentration zurückführen.

4.3.3 Einfluss auf die Zytokinfreisetzung

Die Zytokinkonzentrationen wurden sowohl nach S803- als auch nach Simvastatin-Behandlung gegenüber den unbehandelten PMN-perfundierten Herzen signifikant gesenkt. Wie unter CD11/18-Antikörper-Behandlung liegt in diesem Fall die Vermutung nahe, dass auch diese Behandlungsformen indirekt die Zytokinfreisetzung beeinflussen. Dies erfolgt über die Hemmung einer Interaktion zwischen Leukozyten und Endothel und der daraus folgenden verringerten Radikalfreisetzung. Die Reduzierung der myokardialen Zytokinkonzentration könnte sich ebenfalls positiv auf einen arteriogenen Prozess auswirken. Ähnlich wie im Ischämie-Reperfusionsgeschehen werden in arteriosklerotischen Gefäßwandläsionen schon frühzeitig Entzündungszellen nachgewiesen. Bedingt durch eine in diesen Bereichen reduzierte NO-Bildung exprimieren Endothelzellen vermehrt Adhäsionsmoleküle (MCP-1, VCAM-1, ICAM-1). Daraus folgt an diesen Stellen eine erleichterte Anhaftung und Transmigration von Entzündungszellen in die Gefäßwand. Es kommt zu einer Freisetzung von Sauerstoffradikalen und proinflammatorischen Zytokinen. Der daraus resultierende Entzündungsprozess verstärkt die Mechanismen der Arteriogenese. Dies trägt wesentlich zum Risiko der Instabilität von arteriosklerotischen Plaques bei.

Es wäre demnach vorstellbar, dass eine Erhöhung der eNOS-Expression nicht nur die Schäden eines kardiovaskulären Ereignisses reduzieren, sondern ebenfalls eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung einer instabilen Plaque mit nachfolgender Deckplattenruptur spielen könnte. Tatsächlich hat der eNOS-Transkriptionsverstärker in der Vergangenheit in verschiedenen Arteriosklerose-Modellen eine antiarteriosklerotische Wirkung gezeigt (Wohlfart *et al.*, 2003). Die Erhöhung der eNOS-Transkription durch die Substanz führte zu einer verminderten Plaqueentstehung in mit Cholesterol gefütterten ApoE-Knock-out-Mäusen. Ferner wurde die Neointimabildung in der Femoralarterie nach Anlage eines „Cuffs“ – ein Modell, das die Frühstadien der Arteriosklerose widerspiegelt – durch den eNOS-Transkriptionsverstärker reduziert. Durch eine chirurgische Umhüllung der Mausarterie mit einer Polyethylenmanschette wurde hierbei innerhalb weniger Tage eine Neointimabildung induziert (Moroi *et al.*, 1998). Zusätzlich belegte im Cuff-Modell mit eNOS-Knock-out-Mäusen das Ausbleiben einer Wirkung durch S803 eindeutig einen eNOS-abhängigen Wirkungsmechanismus.

4.4 ABSCHLIESSENDE BETRACHTUNG

Eine wichtige Arzneistoffgruppe in der symptomatischen Behandlung von koronaren Herzkrankheiten stellt die Gruppe der Nitrovasodilatoren (Nitraten) dar. Erst die Entdeckung des relaxierenden Faktors EDRF und dessen Identifizierung als Stickstoffmonoxid führten zu der Erkenntnis, dass Nitrate über die Freisetzung von NO zur Vasodilatation führen (Moncada *et al.*; 1991). Das Problem einer kontinuierlichen Nitrattherapie ist jedoch das rasche Auftreten einer deutlichen Abschwächung der Nitratwirkung (Nitratoleranz). Bislang sind die Mechanismen, die an der Entwicklung einer Nitratoleranz beteiligt sind, noch nicht vollständig aufgeklärt (Munzel *et al.*, 1996). Hier hat sich die asymmetrische Dosierung von retardierten Präparaten bewährt, die ein mehrstündiges Nitrat-freies Intervall berücksichtigt und auf diese Weise eine Nitratoleranz vermeidet (Schoebel *et al.*, 1997). Ein Nachteil hierbei liegt sicherlich in der Gefahr von vermehrt auftretenden Angina-pectoris-Anfällen während der Nitrat-freien Intervalle. Im Gegensatz zu den NO-Donoren, die durch chemische Hydrolyse bis zu 100-fach höhere Konzentrationen an NO zur Verfügung stellen, wird die Freisetzung von endothelialelem NO durch S803 nur moderat beeinflusst. Eines der möglichen Vorteile des Prinzips eines schwachen endogenen „NO-Donors“ könnte u. a. auch sein, dass es dabei nicht zu Toleranzphänomenen kommt, wie sie durch relative hohe NO-Konzentrationen durch Nitrate ausgelöst werden können. Allerdings hat exogen zugeführtes NO keinen Einfluss auf die Progression der koronaren Arteriosklerose gezeigt (De Meyer *et al.*, 1997).

In der vorliegenden Arbeit wiesen wir erstmals eine Verbesserung der PMN-induzierten post-ischämischen myokardialen Dysfunktion in isoliert-perfundierten Rattenherzen durch Behandlung mit einem eNOS-Transkriptionsverstärker nach. Der eNOS-Transkriptionsverstärker S803 wirkt in dem Modell des PMN-induzierten Reperfusionsschadens vermutlich über eine Erhöhung der endothelialen NO-Verfügbarkeit. Dies eröffnet somit einen neuen Therapieansatz zur Behandlung von ischämischen Herzerkrankungen möglicherweise ohne Toleranzentwicklung

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die Wiederherstellung der Perfusion eines ischämischen Areals, auch Reperfusion genannt, ist vorrangiges Therapieziel bei Herzinfarktpatienten. Durch Thrombolyse oder Ballondilatation eines verschlossenen Koronargefäßes erzielt, kann sie jedoch selbst zum Organschaden beitragen. Dieser so genannte Reperfusionsschaden manifestiert sich je nach vorangegangener Ischämiedauer in funktionellen oder in strukturellen Schäden. Frühere Untersuchungen haben gezeigt, dass während der Reperfusion auftretende Entzündungsreaktionen maßgeblich zu einem myokardialen Reperfusionsschaden beitragen. Diese können durch polymorphkernige Neutrophile (PMNs) hervorgerufen werden. Das erste Ziel dieser Arbeit war es, ein Tiermodell zu etablieren, das die präklinische Prüfung von neuen Therapieansätzen erlaubt, die einen PMN-induzierten Reperfusionsschaden pharmakologisch verhindern.

In einem Modell des isoliert-perfundierten Rattenherzens nach Langendorff wurde durch die externe Applikation von humanen PMNs eine mögliche Beteiligung dieser Zellen an der Entstehung eines Reperfusionsschadens nach globaler no-flow-Ischämie untersucht. Hierbei wurden unterschiedliche myokardiale Funktionsparameter, das Ausmaß der Zellschädigung und die myokardiale Konzentration der proinflammatorischen Zytokine Interleukin-1 β (IL-1 β) und Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α) erfasst. Die Quantifizierung der Zellschädigung erfolgte mittels histologischer Triphenyltetrazoliumchlorid-(TTC)-Färbung. Ferner wurde aus dem koronarvenösen Effluat die Konzentration der Creatinkinase (CK) und der Lactatdehydrogenase (LDH) bestimmt.

Die Reperfusion der Herzen mit PMNs führte im Vergleich zur zellfreien Reperfusion zu einer signifikanten Verschlechterung der linksventrikulären Funktion. Ferner wiesen die PMN-reperfundierten Herzen eine signifikant höhere Zytokinkonzentration auf. Dagegen führte die PMN-Reperfusion lediglich zu einer tendenziellen Erhöhung der myokardialen Zellschädigung. Unter Verwendung eines Antikörpers gegen das Adhäsionsmolekül CD11/18 auf der Zelloberfläche der PMNs wurde das Modell validiert. Hierbei verminderte die Blockade der CD11/18-vermittelten PMN-Adhäsion an das Koronarendothel sowohl die PMN-induzierte myokardiale Dysfunktion als auch die myokardiale Zytokinkonzentration in den PMN-perfundierten Herzen.

Das zweite Ziel dieser Arbeit war es, erstmals die pharmakologische Wirkung des neuen eNOS-Transkriptionsverstärkers S803, auf den PMN-induzierten Reperfusionsschaden in isoliert-perfundierten Rattenherzen zu untersuchen. Um einen in diesem Therapieansatz postulierten NO-abhängigen Mechanismus zu bestätigen, erfolgte eine Bestimmung der myokardialen eNOS-Expression mittels Western-Blot-Analyse. Ferner wurde in einem zusätzlichen Modell mit isoliert-perfundierten Rattenherzen die NO-abhängige Dilatationsfähigkeit der Koronarien untersucht. Darüber hinaus diente der HMG-CoA-Reduktase-Hemmer Simvastatin, der über die Stabilisierung der eNOS-mRNA zu einer erhöhten NO-Verfügbarkeit führt, als Positivkontrolle für einen NO-abhängigen Wirkungsmechanismus.

Die subchronische Gabe des eNOS-Transkriptionsverstärkers S803 führte in den isoliert-perfundierten Herzen zu einer signifikanten Besserung der PMN-induzierten linksventrikulären Dysfunktion und verminderte signifikant die myokardiale Zytokinkonzentration gegenüber den PMN-perfundierten Kontrollherzen. Ferner wurde die eNOS-Proteinexpression in den Herzen signifikant erhöht. Diese Ergebnisse deuten auf eine Verbesserung der PMN-induzierten linksventrikulären Dysfunktion über eine Erhöhung der NO-Verfügbarkeit hin. Diese Hypothese wurde durch die therapeutische Wirksamkeit von Simvastatin im Modell des PMN-reperfundierten Herzens bestätigt. Zudem führte Simvastatin zu einer signifikanten Erhöhung der eNOS-Expression. Des Weiteren war die myokardiale Dilatationsfähigkeit während der reaktiven Hyperämieantwort nach S803- und Simvastatin-Behandlung im Vergleich zu den Kontrollherzen signifikant verbessert. Durch Gabe des NO-Synthasehemmers L-NAME wurde diese im Modell der reaktiven Hyperämie unter S803-Behandlung wieder aufgehoben und bestätigte ebenfalls einen NO-abhängigen Mechanismus. Die verbesserte reaktive Hyperämieantwort unter Simvastatin-Behandlung war dagegen nicht ausschließlich NO-vermittelt.

S803, ein neuer eNOS-Transkriptionsverstärker, verbesserte in isoliert-perfundierten Rattenherzen sowohl einen PMN-induzierten Reperfusionsschaden als auch die reaktive Hyperämieantwort. Ferner wies die Substanz in der Vergangenheit in Arteriosklerose-Modellen in ApoE-Knock-out-Mäusen antiarteriosklerotische Wirkungen auf. S803 eröffnet somit einen neuen, vielversprechenden Therapieansatz zur Behandlung koronarer Herzkrankheiten.

LITERATURVERZEICHNIS

Albelda, S. M. & Buck, C. A. (1990) Integrins and other cell adhesion molecules. *FASEB J.* **4**: 2868-2880

Amador, E. & Wacker, W. (1965) Enzymatic methods used for diagnosis. *Methods Biochem. Anal.* **13**: 265-356

Ambrosio, G. & Tritto, I. (1999) Reperfusion injury: experimental evidence and clinical implications. *Am. Heart J.* **38**: S69-S75

Andrew, P. & Mayer, B. (1999) Enzymatic function of nitric oxide synthases. *Cardiovasc. Res.* **43**: 521-531

Arai, M., Lefer, D. J. & So, T. (1996) An anti-CD18 antibody limits infarct size and preserves left ventricular function in dogs with ischemia and 48-hour reperfusion. *J. Am. Coll. Cardiol.* **27**: 1278-1285

Aversano, T., Zhou, W. & Nedelman, M. (1995) A chimeric IgG4 monoclonal antibody directed against CD18 reduces infarct size in a primate model of myocardial ischemia and reperfusion. *J. Am. Coll. Cardiol.* **25**: 781-788

Baran, K. W., Nguyen, M., McKendall, G., Lambrew, C., Dykstra, G., Palmeri, S., Gibbons, R., Borzak, S., Sobel, B., Gurlay, S., Rundle, A., Gibson, C. & Barron, H. (2001) Double-blind, randomized trial of an anti-CD18 antibody in conjunction with recombinant tissue plasminogen activator for acute myocardial infarction: limitation of myocardial infarction following thrombolysis in acute myocardial infarction (LIMIT AMI) study. *Circulation* **104**: 2778-2783

Barnes, P. J. & Karin, M. (1997) Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N. Engl. J. Med.* **336**: 1066-1071

Becker, B. F. (1993) Towards the physiological function of uric acid. *Free Rad. Biol. Med.* **14**: 615-631

Becker, B. F., Heindl, B., Kupatt, C. & Zahler, S. (2000) Endothelial function and hemostasis. *Z. Kardiol.* **89**: 160-167

Beckman, J. S. (1990) Ischemic injury mediator. *Nature* **3**: 27-28

Biasucci, L. M., Vitelli, A. & Liuzzo, G. (1996) Elevated levels of interleukin-6 in unstable angina. *Circulation* **94**: 874-877

Blasig, I., Dickson, B., Weglicki, W. & Kramer, J. (1996) Uncoupling of mitochondrial oxidative phosphorylation alters lipid peroxidation-derived free radical production but not recovery of post-ischemic rat hearts and post-hypoxic endothelial cells. *Mol. Cell. Biochem.* **161**: 167-177

Bolli, R., Jeroudi, M., Patel, B., Aruoma, O., Halliwell, B., Lai, E. & McCay, P. (1989) Marked reduction of free radical generation and contractile dysfunction by antioxidant therapy begun at the time of reperfusion: evidence that myocardial stunning is a manifestation of reperfusion injury. *Circ. Res.* **65**: 607-622

Bolli, R. (1990) Mechanisms of myocardial stunning. *Circulation* **82**: 723-738

Bolli, R. (1993) Role of neutrophils in myocardial stunning after brief ischaemia: the end of a six year old controversy (1987-1993). *Cardiovasc. Res.* **27**: 728-730

Bolli, R. & Marban, E. (1999) Molecular and cellular mechanisms of myocardial stunning. *Physiol. Rev.* **79**: 609-634

Boulanger, C. & Vanhoutte, P. (1997) G-proteins and endothelium-dependent relaxations. *J. Vasc. Res.* **34**: 175-185

Boyum, A. (1976) Isolation of lymphocytes, granulocytes and macrophages. *Scand. J. Immunol.* **5** (Suppl.): 9-15

Bozkurt, B., Kribbs, S., Clubb, F., Michael, L., Didenko, V., Hornsby, P., Seta Y., Oral, H., Spinale, F. & Mann, D. (1998) Pathophysiologically relevant concentrations of tumor necrosis factor-alpha promote progressive left ventricular dysfunction and remodeling in rats. *Circulation* **97**: 1382-1391

Braunwald, E. & Kloner, R. A. (1985) Myocardial reperfusion: a double-edged sword? *J. Clin. Invest.* **76**: 1713-1719

Brown, B., Zhao, X., Sacco, D. & Albers, J. (1993) Lipid lowering and plaque regression: new insights into prevention of plaque disruption and clinical events in coronary disease. *Circulation* **87**: 1781-1791

Brown, B., Hillger, L., Zhao, X., Poulin, D. & Albers, J. (1995) Types of change in coronary stenosis severity and their relative importance in overall progression and regression of coronary disease: observations from the FATS Trial: Familial Atherosclerosis Treatment Study. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **748**: 407-418

Campbell, B., Shin, Y., Scalia, R. & Lefer, A. M. (1998) Beneficial effects of N,N,N-trimethylsphingosine following ischemia and reperfusion in the isolated perfused rat heart. *Cardiovasc. Res.* **39**: 393-400

Carr, A., McCall, M. & Frei, B. (2000) Oxidation of LDL by myeloperoxidase and reactive nitrogen species. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **20**: 1716-1723

Celemajer, D. S. (1997) Endothelial dysfunction: does it matter? Is it reversible? *J. Am. Coll. Cardiol.* **30**: 325-333

Chen, Z. & Catravas, J. D. (1998) Release of a leukocyte activation inhibitor by staurosporine-treated pulmonary artery endothelial cells. *Am. J. Physiol.* **275**: L184-L192

Chen, Z., Sui, B. & Ho, Y. S. (1998) Overexpression of MnSOD protects against myocardial ischemia reperfusion injury in transgenic mice. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **30**: 2281-2289

Cooke, J. & Dzau, V. (1997) Nitric oxide synthase: Role in the genesis of vascular disease. *Annu. Rev. Med.* **48**: 489-509

Csonka, C., Szilvassy, Z., Fulop, F., Pali, T., Blasig, E., Tosaki, A., Schulz, R. & Ferdinandy, P. (1999) Classic preconditioning decreases the harmful accumulation of nitric oxide during ischemia and reperfusion in rat hearts. *Circulation* **100**: 2260-2266

Depre, C., Fierain, L. & Hue, L. (1997) Activation of nitric oxide synthase by ischemia in the perfused heart. *Cardiovasc. Res.* **33**: 82-87

Dhalla, N. S., Elmoselhi, A. B., Hata, T. & Makino, N. (2000) Status of myocardial antioxidants in ischemia-reperfusion injury. *Cardiovasc. Res.* **47**: 446-456

Dinarello, C. A. (2000) Proinflammatory cytokines. *Chest* **118**: 503-508

Downs, J., Clearfield, M., Weis, S., Whitney, E., Shapiro, D., Beere, P., Langendorfer, A., Stein, E., Kruyer, W. & Gotto, A. (1998) Primary prevention of acute coronary events with lovastatin in men and women with average cholesterol levels: results of AFCAPS/TexCAPS. Air Force/Texas Coronary Atherosclerosis Prevention Study. *JAMA* **279**: 1615-1622

Drexler, H. (1997) Endothelial dysfunction: Clinical implications. *Prog. Cardiovasc. Diseases* **39**: 287-324

Dupuis, J., Tardif, J., Cernacek, P. & Theroux, P. (1999) Cholesterol reduction rapidly improves endothelial function after acute coronary syndromes. The RECIFE (reduction of cholesterol in ischemia and function of the endothelium) trial. *Circulation* **99**: 3227-3233

El Habbal, M., Carter, H., Smith, L., Elliott, M. & Strobel, S. (1997) Cardiopulmonary bypass tubes and prime solutions stimulate neutrophil adhesion molecules. *Cardiovasc. Res.* **33**: 209-215

Endres, M., Laufs, U., Huang, Z., Huang, P. L., Moskowitz, M. A. & Liao, J. K. (1998) Stroke protection by HMG CoA reductase inhibitors mediated by upregulation of endothelial nitric oxide synthase. *Proc. Natl. Aca. Sci. U.S.A.* **95**: 8880-8885

Entman, M. & Ballantyne, C. (1993) Inflammation in acute coronary syndromes. *Circulation* **88**: 800-803

Entman, M. & Smith, C. W. (1994) Postreperfusion inflammation: a model for reaction to injury in cardiovascular disease. *Cardiovasc. Res.* **28**: 1301-1311

Evans, H. G., Lewis, M. J. & Shar, A. M. (1993) Interleukin-1 β modulates myocardial contraction via dexamethasone-sensitive production of nitric oxide. *Cardiovasc. Res.* **27**: 1486-1490

Falk, E. & Fuster, V. (1995) Angina pectoris and disease progression. *Circulation* **92**: 2033-2035

Faxon, D. P., Gibbons, R., Chronos, N., Gurbel, P. & Sheehan, F. (2002) The effect of blockade of the CD11/CD18 integrin receptor on infarct size in patients with acute myocardial infarction treated with direct angioplasty: the results of the HALT-MI study. *J. Am. Coll. Cardiol.* **40**: 199-204

Finkel, M. S., Oddis, C. V., Jacob, T., Watkins, S., Hattler, B. & Simmons, R. (1992) Negative inotropic effects of cytokines on the heart mediated by nitric oxide. *Science* **257**: 387-389

Fishbein, M. & Siegel, R. (1996) How big are coronary atherosclerotic plaques that rupture? *Circulation* **78**: 1157-1166

Flögel, U., Decking, U., Godecke, A. & Schrader, J. (1999) Contribution of NO to ischemia-reperfusion injury in the saline-perfused heart: a study in endothelial NO synthase knockout mice. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **31**: 827-836

Foerstermann, U. & Kleinert, H. (1995) Nitric oxide synthase: expression and expressional control of the three isoforms. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **352**: 351-364

Frangogiannis, N., Lindsey, M., Michael, L., Youker, K., Bressler, R., Mendoza, L., Spengler, R., Smith, C. & Entman, M. (1998) Resident cardiac mast cells degranulate and release preformed TNF- α , initiating the cytokine cascade in experimental canine myocardial ischemia/reperfusion. *Circulation* **98**: 699-710

Furchgott, R. F. & Zawadzki, J. V. (1980) The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* **288**: 373-376

Furman, M., Benoit, S., Barnard, M., Valeri, C., Borbone, M., Becker, R., Hechtman, H. & Michelson, A. (1998) Increased platelet reactivity and circulating monocyte-platelet aggregates in patients with stable coronary artery disease. *J. Am. Coll. Cardiol.* **31**: 352-358

Fuster, V. (1994) Mechanisms leading to myocardial infarction: insights from studies of vascular biology. *Circulation* **90**: 2126-2146

Galino, P., Ragni, M. & Cirillo, P. (1996) Effects of tissue factor induced by oxygen free radicals on coronary flow during reperfusion. *Nat. Med.* **2**: 35-40

Geng, J., Bevilacqua, M., Moore, K., McIntyre, T., Prescott, S., Kim, J., Bliss, G., Zimmerman, G. & McEver, R. (1990) Rapid neutrophil adhesion to activated endothelium mediated by GMP-140. *Nature* **343**: 757-760

Gerson, R., MacDonald, J., Alberts, A., Kornbrust, D., Majka, J., Stubbs, R. & Bokelman, D. (1989) Animal safety and toxicology of simvastatin and related hydroxy-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitors. *Am. J. Med.* **87**: S28-S38

Gopalakrishna, R., Chen, Z. H. & Gundimeda, U. (1993) Nitric oxide and nitric oxide-generating agents induce a reversible inactivation of protein kinase C activity and phorbol ester binding. *J. Biol. Chem.* **268**: 27180-27185

Granger, D. (1988) Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischemia reperfusion injury. *Am. J. Physiol.* **24**: H1269-H1275

Gross, G. J., Kersten, J. R. & Warltier, D. C. (1999) Mechanisms of postischemic contractile dysfunction. *Ann. Thorac. Surg.* **68**: 1898-1904

Gryglewski, R., Palmer, R. & Moncada, S. (1986) Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. *Nature* **320**: 454-456

Guntheroth, W. G., Jacky, J. P., Kawabori, I., Stevenson, J. G. & Moreno, A. H. (1982) Left ventricular performance in endotoxin shock in dogs. *Am. J. Physiol.* **239**: F271-F280

Gurevitch, J., Frolkis, I., Yuhas, Y., Paz, Y., Matsa, M., Mohr, R. & Yakirevich, V. (1996) Tumor necrosis factor-alpha is released from the isolated heart undergoing ischemia and reperfusion. *J. Am. Coll. Cardiol.* **28**: 247-252

Gurevitch, J., Frolkis, I., Yuhas, Y., Lifschitz-Mercer, B., Paz, Y., Matsa, M., Kramer, A. & Mohr, R. (1997) Anti-tumor necrosis factor alpha improves myocardial recovery after ischemia and reperfusion. *J. Am. Coll. Cardiol.* **30**: 1554-1561

Harrison, D. G. (1997) Perspective series: Nitric oxide and nitric oxide synthases. Cellular and molecular mechanisms of endothelial cell dysfunction. *J. Clin. Invest.* **100**: 2153-2157

Hearse, D. J. (1991) Stunning: a radical review. *Cardiovasc. Drugs Ther.* **5**: 853-876

Heindl, B., Zahler, S., Welsch, U. & Becker, B. (1998) Disparate effects of adhesion and degranulation of platelets on myocardial and coronary function in postischaemic hearts. *Cardiovasc. Res.* **38**: 383-394

Heusch G. (1998) Stunning – great paradigmatic, but little clinical importance. *Basic Res. Cardiol.* **93**:164-166

Heyndrickx, G. R., Millard, R., McRitchie, R. J., Maroko, P. R. & Vatner, S. (1975) Regional myocardial functional and electrophysiological alterations after brief coronary artery occlusion in conscious dogs. *J. Clin. Invest.* **56**: 978-985

Hill, G. E. (1998) Cardiopulmonary bypass-induced inflammation: is it important? *J. Cardiothor. Vasc. Anesth.* **12** (Suppl.): 21-25

Hilton, R. & Eichholtz, F. (1925) The influence of chemical factors on the coronary circulation. *J. Physiol.* **59**: 413

Hjorth, R., Johnsten, A. & Vretblad, P. (1981) A rapid method for purification of human granulocytes using Percoll. *J. Immunol. Methods* **43**: 95-101

Hosenpud, J. D., Campbell, S. & Mendelson, D. J. (1989) Interleukin-1-induced myocardial depression in an isolated beating heart preparation. *J. Heart Transplant.* **8**: 460-464

Hoshida, S., Kuzuya, T., Fuji, H., Oe, H., Hori, M., Kamada, T. & Tada, M. (1993) Transcardiac alteration of neutrophil function relates to myocardial ischemia/reperfusion injury. *Cardiovasc. Res.* **27**: 377-383

Huang, P. L., Huang, Z., Mashimo, H., Bloch, K., Moskowitz, M., Bevan, J. & Fishman, M. (1995) Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. *Nature* **377**: 239-242

Ignarro, L., Napoli, C. & Loscalzo, J. (2002) Nitric oxide donors and cardiovascular agents modulating the bioactivity of nitric oxide: an overview. *Circ. Res.* **90**: 21-28

Ikeda, H., Takajo, Y., Ichiki, K., Ueno, T., Maki, S., Noda, T., Sugi, K. & Imaizumi, T. (1995) Increased soluble form of P-selectin in patients with unstable angina. *Circulation* **92**: 1693-1696

Ikonomidis, I., Andreotti, F., Economou, E., Stefanadis, C., Toutouzas, P. & Nihoyannopoulos, P. (1999) Increased proinflammatory cytokines in patients with chronic stable angina and their reduction by aspirin. *Circulation* **100**: 793-798

Inoue, T., Sakai, Y., Morooka, S., Hayashi, T., Takayanagi, K. & Takabatake, Y. (1996) Expression of polymorphonuclear leukocyte adhesion molecules and its clinical significance in patients treated with percutaneous transluminal coronary angioplasty. *J. Am. Coll. Cardiol.* **28**: 1127-1133

Jennings, R. B. & Reimer, K. (1991) The cell biology of acute myocardial ischemia. *Annu. Rev. Med.* **42**: 225-246

Jennings, R. B. & Yellon, D. M. (1992) Reperfusion injury: Definitions and clinical background. *Yellon D. M., Jennings R. B. Hrsg. Myocardial protection, Raven Press Ltd., New York*: 1-12

Jeroudi, M., Hartley, C. & Bolli, R. (1994) Myocardial reperfusion injury: role of oxygen radicals and potential therapy with antioxidants. *Am. J. Cardiol.* **73**: 2-7

Jones, S., Girod, W., Palazzo, A., Granger, N., Grisham, M., Jourd'heuil, D., Huang, P. & Lefer, D. J. (1999) Myocardial ischemia-reperfusion injury is exacerbated in absence of endothelial cell nitric oxide synthase. *Heart Circ. Physiol.* **45**: H1567-H1573

Jordan, J. E., Zhao, Z.-Q. & Vinten-Johansen, J. (1999) The role of neutrophils in myocardial ischemia-reperfusion injury. *Cardiovasc. Res.* **43**: 860-878

Josephson, R., Silverman, H., Lakatta, E., Stern, M. & Zweier, J. (1991) Study of the mechanisms of hydrogen peroxide and hydroxyl free radical-induced cellular injury and calcium overload in cardiac myocyte. *J. Biol. Chem.* **266**: 2354-2361

Jukema, J., Bruschke, A., van Boven, A., Reiber, J., Bal, E., Zwinderman, A., Jansen, H., Boerma, G., van Rappard, F. & Lie, K. (1995) Effects of lipid lowering by pravastatin on progression and regression of coronary artery disease in symptomatic men with normal to moderately elevated serum cholesterol levels. The regression growth evaluation statin study (REGRESS). *Circulation* **91**: 2528-2540

Kanatsuka, H., Sekiguchi, N. & Sato, K. (1992) Microvascular sites and mechanisms responsible for reactive hyperemia in the coronary circulation of the beating canine heart. *Circ. Res.* **71**: 912-922

Kellog, E. W. (1975) Superoxide, hydrogen peroxide and singlet oxygen in lipid peroxidation by a xanthine oxidase system. *J. Biol. Chem.* **250**: 8812-8817

Kilgore, K. S., Friedrichs, G., Homeister, J. W. & Lucchesi, B. R. (1994) The complement system in myocardial ischemia/reperfusion injury. *Cardiovasc. Res.* **28**: 437-444

Kirschenbaum, L. A. & Signal, P. K. (1992) Changes in antioxidant enzymes in isolated cardiac myocytes subjected to hypoxia-reoxygenation. *Lab. Invest.* **67**: 796-803

Kloner, R. A. & Przyklenk, K. (1993) Understanding the jargon: a glossary of terms used (and misused) in the study of ischemia and reperfusion. *Cardiovasc. Res.* **27**: 162-166

Kobayashi, M., Takeyoshi, I., Yoshinari, D., Matsumoto, K. & Morishita, Y. (2002) P38 mitogen-activated protein kinase inhibition attenuates ischemia-reperfusion injury of the rat liver. *Surgery* **131**: 344-349

Konstantopoulos, K., Neelamegham, S., Burns, A. R., Hentzen, E., Kansas, G., Snapp, K., Berg, E., Hellums, J., Smith, C., McIntire, L. & Simon, S. (1998) Venous levels of shear support neutrophil-platelet adhesion and neutrophil aggregation in blood via P-selectin and beta2-integrin. *Circulation* **98**: 873-882

Kostic, M. & Schrader, J. (1992) Role of nitric oxide in reactive hyperemia of the guinea pig. *Circ. Res.* **70**: 208-212

Krebs, H. A. & Henseleit, K. (1932) Untersuchungen über die Harnstoffbildung im Tierkörper. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **210**: 33-36

Kukreja, R. C. & Hess, M. L. (1992) The oxygen free radical system: from equations through membran-protein interactions to cardiovascular injury and protection. *Cardiovasc. Res.* **26**: 641-655

Kukreti, S., Konstantopoulos, K., Smith, C. W. & McIntire, L. V. (1997) Molecular mechanisms of monocytes adhesion to interleukin-1 beta-stimulated endothelial cells under physiologic flow conditions. *Blood* **89**: 4104-4111

Kupatt, C., Habazettl, H., Zahler, S., Weber, C., Becker, B., Messmer, K. & Gerlach, E. (1997) ACE-inhibition prevents postischemic coronary leukocyte adhesion and leukocyte-dependent reperfusion injury. *Cardiovasc. Res.* **36**: 386-395

Kurrelmeyer, K. M., Michael, L. H. & Baumgarten, G. (2000) Endogenous tumor necrosis factor protects the adult cardiac myocyte against ischemic-induced apoptosis in a murine model of acute myocardial infarction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**: 5456-5461

Langendorff, O. (1895) Untersuchungen am überlebenden Säugetierherzen. *Pflügers Arch. Ges. Physiol.* **61**: 291-332

Larsen, E., Celi, A., Gilbert, G. E., Furie, B., Erban, J., Bonganti, R., Wagner, D. D. & Furie, B. (1989) PADGEM protein: a receptor that mediates the interaction of activated platelets with neutrophils and monocytes. *Cell* **59**: 305-312

Laufs, U., La Fata, V. & Liao, J. K. (1997) Inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl (HMG)-CoA-reductase blocks hypoxia-mediated down-regulation of endothelial nitric oxide synthase. *J. Biol. Chem.* **272**: 31725-31729

Laufs, U., La Fata, V., Plutzky, J. & Liao, J. K. (1998) Up-regulation of endothelial nitric oxide synthase by HMG-CoA reductase inhibitors. *Circulation* **97**: 1129-1135

Lee, S., Mallet, R., Shizukuda, Y., Williams, A. & Downey, H. (1992) Canine coronary vasodepressor responses to hypoxia are attenuated but not abolished by 8-phenyltheophylline. *Am. J. Physiol.* **262**: H955-H960

Lefer, A. M., Tsao, P. S., Lefer, D. J. & Ma, X.-L. (1991) Role of endothelial dysfunction in the pathogenesis of reperfusion injury after myocardial ischemia. *FASEB J.* **5**: 2029-2034

Lefer, D. J., Nakanishi, K. & Johnsten, W. (1993a) Endothelial and myocardial cell protection by a cysteine-containing nitric oxide donor after myocardial ischemia and reperfusion. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **22** (Suppl.): 34-43

Lefer, D. J., Nakanishi, K., Johnsten, W. & Vinten-Johansen, J. (1993b) Anti-neutrophil and myocardial protecting actions of a novel nitric oxide donor after acute myocardial ischemia and reperfusion of dogs. *Circulation* **88**: 2237-2250

Lefer, D. J., Shandelya, S. M., Serrano, C., Becker, L., Kuppusamy, P. & Zweier, J. (1993c) Cardioprotective actions of a monoclonal antibody against CD-18 in myocardial ischemia-reperfusion injury. *Circulation* **88**: 1779-1787

Lefer, A. M. (1999) Role of beta₂-integrins and immunoglobulin superfamily members in myocardial ischemia-reperfusion. *Ann. Thorac. Surg.* **68**: 1920-1923

Lefer, A. M., Campbell, B., Shin, Y. K., Scalia, R., Hayward, R. & Lefer, D. (1999a) Simvastatin preserves the ischemic-reperfused myocardium in normo-cholesterolemic rat hearts. *Circulation* **100**: 178-184

Lefer, D. J., Jones, S., Girod, W., Baines, A., Grisham, M., Cockrell, A., Huang, P. & Scalia, R. (1999b) Leukocyte-endothelial cell interactions in nitric oxide synthase-deficient mice. *Am. J. Physiol.* **276**: 1943-1950

Ley, K. (1993) Molecular mechanisms of leukocyte rolling and adhesion to microvascular endothelium. *Eur. Heart J.* **14** (Suppl.): 68-73

Li, H., Oehrlein, S. A., Wallerath, T., Ihrig-Biedert, I., Wohlfart, P., Ulshofer, T., Jessen, T., Herget, T., Förstermann, U., Kleinert, H. (1998) Activation of protein kinase C alpha and/or epsilon enhances transcription of the human endothelial nitric oxide synthase gene. *Mol. Pharmacol.* **53**: 630-637

Lott, J. A. & Stang, J. (1980) Serum enzymes and isoenzymes in the diagnosis and differential diagnosis of myocardial ischemia and necrosis. *Clin. Chem.* **26**: 1241-1250

Lowry, O. H., Rosebrough, N., Farr, A. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275

Lu, D., Maulik, N., Moraru, I., Kreutzer, D. L. & Das, K. (1993) Molecular adaptation of vascular endothelial cells to oxidative stress. *Am. J. Physiol.* **264**: C715-C722

Ma, X.-L., Tsao, P. S. & Lefer, A. M. (1991) Antibody to CD-18 exerts endothelial and cardioprotective effects in myocardial ischemia and reperfusion. *J. Clin. Invest.* **88**: 1237-1243

Ma, X.-L., Weyrich, A., Lefer, D. J. & Lefer, A. M. (1993) Diminished basal nitric oxide release after myocardial ischemia and reperfusion promotes neutrophil adherence to coronary endothelium. *Circ. Res.* **72**: 403-412

Maekawa, N., Wada, H., Kanda, T., Niwa, T., Yamada, Y., Saito, K., Fujiwara, H., Sekikawa, K. & Seishima, M. (2002) Improved myocardial ischemia/reperfusion injury in mice lacking tumor necrosis factor-alpha. *J. Am. Coll. Cardiol.* **39**:1229-1235

Martorana, P. A., Mogilev, A., Kettenbach, B., & Nitz, R. (1983) Effect of molsidomine on spontaneous ventricular fibrillation following myocardial ischemia and reperfusion in the dog. *Adv. Myocardiol.* **4**: 605-613

Massberg, S., Enders, G., Leiderer, R., Eisenmenger, S., Vestweger, D., Krombach, F. & Messmer, K. (1998) Platelet-endothelial cell interactions during ischemia/reperfusion: role of P-selectin. *Blood* **92**: 507-515

Matsumori, A. (1996) Cytokines in myocarditis and cardiomyopathies. *Curr. Opin. Cardiol.* **11**: 302-309

Maxwell, S. R. & Lip, G. Y. (1997) Reperfusion injury: a review of the pathology, clinical manifestations and therapeutic options. *Internat. J. Cardiol.* **58**: 95-117

McCord, J. M. (1987) Oxygen-derived radicals: a link between reperfusion injury and inflammation. *Federation Proc.* **46**: 2402-2406

Mehta, J., Dinerman, J., Mehta, P., Saldeen, T., Lawson, D., Donnelly, W. & Wallin, R. (1989) Neutrophil function in ischemic heart disease. *Circulation* **79**: 549-556

De Meyer, G., Bult, H., Kockx, M. & Herman, A. (1997) The effect of chronic treatment with NO donors during intimal thickening and fatty streak formation. *Biofactors* **6**: 209-215

Miwa, K., Igawa, A., Nakagawa, K., Hirai, T. & Inoue, H. (1999) Consumption of vitamin E in coronary circulation in patients with variant angina. *Cardiovasc. Res.* **41**: 291-298

Moncada, S., Palmer, R. M. & Higgs, E. A. (1991) Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* **43**: 109-142

Moncada, S. & Higgs, A. (1993) The L-arginine-nitric oxide pathway. *N. Engl. J. Med.* **329**: 2002-2012

Moroi, M., Zhang, L., Yasuda, T., Virmani, R., Gold, H. Fishman, M. & Huang, P. (1998) Interaction of genetic deficiency of endothelial nitric oxide, gender and pregnancy in vascular response to injury in mice. *J. Clin. Invest.* **101**: 1225-1232

Müller-Werdan, U., Engelmann, H. & Werdan, K. (1998) Cardiodepression by tumor necrosis factor-alpha. *Eur. Cytokine Netw.* **9**: 689-691

Munzel, T., Kurz, S., Heitzer, T. & Harrison, D. (1996) New insights into mechanisms underlying nitrate tolerance. *Am. J. Cardiol.* **77**: C24-C30

Murad, F. (1994) Regulation of cytosolic guanylyl cyclase by nitric oxide: the NO-cyclic GMP signal transduction system. *Adv. Pharmacol.* **26**: 19-33

Murry, C., Jennings, R. & Reimer, K. (1986) Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* **74**: 1124-1136

Nakanishi, K., Vinten-Johansen, J., Lefer, D. J., Zhao, Z., Fowler, W. C., McGee, D. S. & Johnston, W. E. (1992) Intracoronary L-arginine during reperfusion improves endothelial function and reduces infarct size. *Am. J. Physiol.* **263**: H1650-H1658

Napoli, C., Nigris, F. & Palinski, W. (2001) Multiple role of reactive oxygen species in the arterial wall. *J. Cell. Biochem. J. Biol. Chem.* **852**: 674-682

Nelson, C., Wei, E., Povlishock, J., Kontos, H. & Moskowitz, M. (1992) Oxygen radicals in cerebral ischemia. *Am. J. Physiol.* **263**: 1356-1362

Neumann, F., Ott, I., Wilhelm, A., Katus, H., Tillmanns, H. & Schömig, A. (1994) Release of chemoattractants and neutrophil activation in acute myocardial infarction immediately after successful recanalization of the infarct-related vessel by angioplasty. *Eur. Heart J.* **15**: 171-178

Ohara, Y., Peterson, T. E. & Harrison, D. G. (1993) Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide anion production. *J. Clin. Invest.* **91**: 2546-2551

Ohnishi, M., Yamada, K., Morooka, S. & Tojo, S. (1999) Inhibition of P-selectin attenuates neutrophil-mediated myocardial dysfunction in isolated rat heart. *Eur. J. Pharmacol.* **366**: 271-279

Oliver, T. A. (1955) A spectrophotometric method for the determination of creatine phosphokinase and myokinase. *Biochem. J.* **61**: 116-122

Oral, H., Dorn, G. W. & Mann, D. L. (1997) Sphingosine mediates the immediate negative inotropic effects of tumor necrosis factor- α in the adult mammalian cardiac myocyte. *Biol. Chem.* **272**: 4836-4842

Ott, I., Neumann, F., Gawaz, M., Schmitt, M. & Schömig, A. (1996) Increased neutrophil-platelet adhesion in patients with unstable angina. *Circulation* **94**: 1239-1246

Pabla, R., Buda, A., Flynn, D., Salzberg, D. & Lefer, D. J. (1995) Intracoronary nitric oxide improves postischemic coronary blood flow and myocardial contractile function. *Am. J. Physiol.* **269**: H1113-H1121

Pagani, F., Baker, L. S., Knox, M., Fink, M. & Visner, M. (1992) Left ventricular systolic and diastolic dysfunction after infusion of tumor-necrosis factor α in conscious dogs. *J. Clin. Invest.* **90**: 389-398

Palazzo, A., Jones, S., Girod, W., Anderson, D., Granger, N. & Lefer, D. (1998) Myocardial ischemia-reperfusion injury in CD18- and ICAM-1-deficient mice. *Am. J. Physiol.* **275**: H2300-H2307

Palluy, O., Morliere, L., Gris, J. C., Bonne, C. & Modat, G. (1992) Hypoxia/reoxygenation stimulates endothelium to promote neutrophil adhesion. *Free Rad. Biol. Med.* **13**: 21-30

Palmer, R. M., Ferrige, A. G. & Moncada, S. (1987) Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* **327**: 524-526

Park, J. L. & Lucchesi B. R. (1999) Mechanisms of myocardial reperfusion injury. *Ann. Thorac. Surgery* **68**: 1905-1912

Petrone, W., English, D. & Wong, K. (1980) Free radicals and inflammation: superoxide-dependent activation of a neutrophil chemotactic factor in plasma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **77**: 1159-1163

Proctor, P. H. (1989) Endothelium-derived relaxing factor and minoxidil: active mechanisms in hair growth. *Arch. Dermatol.* **125**: 1146

Pruefer, D., Scalia, R. & Lefer, A. M. (1999) Simvastatin inhibits leukocyte-endothelial cell interactions and protects against inflammatory processes in normo-cholesterolemic rats. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **19**:2894-2900

Rapoport R. M., Draznin, M. & Murad, F. (1983) Endothelium-dependent relaxation in rat aorta may be mediated through cyclic GMP-dependent protein phosphorylation. *Nature* **306**: 174-176

Raschke, P., Becker, B. F., Leipert, B., Schwartz, L., Zahler, S. & Gehrlach, E. (1993) Postischemic dysfunction of the heart induced by small numbers of neutrophils via formation of hypochlorous acid. *Basic Res. Cardiol.* **88**: 321-339

Rees, D. D., Palmer, R., Schulz, R., Hodson, H. & Moncada, S. (1990) Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo. *Br. J. Pharmacol.* **101**: 746-752

Ridker, P., Rifai, N. & Pfeffer, M. (2000) Elevation of tumor necrosis factor-alpha and increased risk of recurrent coronary events after myocardial infarction. *Circulation* **101**: 1767-1772

Ridker, P., Rifai, N. & Lowenthal, S. (2001) Rapid reduction in C-reactive protein with cerivastatin among 785 patients with primary hypercholesterolemia. *Circulation* **103**: 1191-1193

Ross, R. & Glomset, J. (1973) Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell: Proliferation of smooth muscle is a key event in the genesis of the lesions of atherosclerosis. *Science* **180**: 1332-1339

Rothlein, R., Dustin, M. L., Marlin, S. & Springer, T. (1986) A human intercellular adhesion molecule (ICAM-1) distinct from LFA-1. *J. Immunol.* **137**:1270-1274

Royston, D. (1997) The inflammatory response and extracorporeal circulation. *J. Cardiothorac. Vasc. Anesth.* **3**: 341-354

Rubanyi, G. (1993) The role of endothelium in cardiovascular homeostasis and disease. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **22**: 1-14

Sabia, P., Powers, E., Ragosta, M., Sarembock, I., Burwell, L. & Kaul, S. (1992) An association between collateral flow and myocardial viability in patients with recent myocardial infarction. *N. Engl. J. Med.* **327**: 1825-1831

Sacks, F., Pfeffer, M., Moye, L., Rouleau, J., Rutherford, J., Cole, T. & Brown, I. (1996) The effect of pravastatin on coronary events after myocardial infarction in patients with average cholesterol levels: Cholesterol and Recurrent Events Trial investigators. *N. Engl. J. Med.* **335**: 1001-1009

Sandritter, W. & Jestädt, R. (1958) Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC) als Reduktionsindikator zur makroskopischen Diagnose des frischen Herzinfarkts. *Verh. dtsh. Ges. Pathol.* **41**: 165-170

Scalia, R., Murohara, T., Delyani, J., Nossuli, T. O. & Lefer, A. M. (1996) Myocardial protection by N,N,N-trimethylsphingosine in ischemia reperfusion injury is mediated by inhibition of P-selectin. *J. Leukoc. Biol.* **59**: 317-324

Scalia, R., Gooszen, M. & Jones, S. (2001) Simvastatin exerts both anti-inflammatory and cardioprotective effects in ApoE deficient mice. *Circulation* **103**: 2598-2603

Schächinger, V., Martina, M., Britten, B. & Zeiher, A. (2000) Prognostic impact of coronary vasodilator dysfunction on adverse long-term outcome of coronary heart disease. *Circulation* **101**: 1899-1906

Schaper, W. (1992) Molecular mechanisms in "stunned" myocardium. Opie L. D. Stunning, hibernating, and calcium in myocardial ischemia and reperfusion. *Kluwer Academic Publishers, Dordrecht*: 140-153

Schmidt, F., MacDonald, M., Murphy, C., Brown, W., Gott, J. & Guyton, R. (1996) Leukocyte depletion of blood cardioplegia attenuates reperfusion injury. *Ann. Thorac. Surg.* **62**: 1691-1697

Schmid-Schoenbein, G. W. (1987) Capillary plugging by granulocytes and the no-reflow phenomenon in the microcirculation. *Frd. Proc.* **46**: 2397-2401

Schneeberger, H., Illner, W. D., Abendroth, D., Bulkley, G., Rutili, F., Williams, M., Thiel, M. & Land, W. (1989) First clinical experiences with superoxide dismutase in kidney transplantation - results of a double-blind randomized study. *Transplant. Proc.* **21**: 1245-1246

Schoebel, F., Leschke, M., Heintzen, M. & Strauer, B. (1997) Konservative Behandlungskonzepte für die stabile Angina pectoris bei koronarer Herzkrankheit. *Med. Klinik* **91**: 458-465

Shandelya, S. M., Kuppusamy, P., Weisfeldt, M. & Zweier, J. (1993) Evaluation of the role of polymorphonuclear leukocytes on contractile function in myocardial reperfusion injury. *Circulation* **87**: 536

Shatos, M. A., Doherty, J. & Hoak, J. (1991) Alterations in human vascular endothelial cell function by oxygen free radicals. Platelet adherence and prostacyclin release. *Arterioscl. Thromb.* **11**: 594-601

Shattock, M. J. (1998) The last word... myocardial stunning. *Basic Res. Cardiol.* **93**: 163

Siegfried, M., Carey, C., Ma, X.-L. & Lefer, A. M. (1992a) Beneficial effects of SPM-5185, a cysteine-containing NO donor in myocardial ischemia-reperfusion. *Am. J. Physiol.* **263**: H771-H777

Siegfried, M. R., Erhardt, J. & Rider, T. (1992b) Cardioprotection and attenuation of endothelial dysfunction by organic nitric oxide donors in myocardial ischemia-reperfusion. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **260**: 668-675

Simpson, P., Fantone, J., Mickelson, J., Gallagher, K. & Lucchesi, B. (1988a) Identification of a time window for therapy to reduce experimental canine myocardial injury: suppression of neutrophil activation during 72 hours of reperfusion. *Circ. Res.* **63**: 1070-1079

Simpson, P., Todd, R., Fantone, J., Mickelson, J., Griffin, J. & Lucchesi, B. (1988b) Reduction of experimental canine myocardial reperfusion injury by a monoclonal antibody (Anti-MO1, Anti-CD 116) that inhibits leukocyte adhesion. *J. Clin. Invest.* **81**: 624-629

Solis, R. & Downing, S. (1966) Effects of E. coli endotoxemia on ventricular performance. *Am. J. Physiol.* **211**: 307-313

Southard, J. H., van Gulik, T., Ametani, M. S., Vreugdenhil, P., Lindell, S. & Belzer, F. (1990) Important components of the UW solution. *Transpl.* **49**: 25-257

Springer, T. A. (1990) Adhesion receptors of the immune system. *Nature* **346**: 425-434

Stary, H. (1989) Evolution and progression of atherosclerotic lesions in coronary arteries of children and young adults. *Arterioscler.* **9** (Suppl.): 19-32

Stein, B., Frank, P., Schmitz, W., Scholz, H. & Thones, M. (1996) Endotoxin and cytokines induce direct cardiodepressive effects in mammalian cardiomyocytes via induction of nitric oxide synthase. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **28**: 16631-16639

Steinbeck, M., Khan, A. & Karnovsky, M. (1992) Intracellular singlet oxygen generation by phagocytosing neutrophils in response to particles coated with a chemical trap. *J Biol. Chem.* **267**:13425-13433

Strandberg, T., Vanhanene, H. & Tikkanen, M. (1999) Effects of statins on C-reactive proteins in patients with coronary artery disease. *Lancet* **353**: 118-119

Strasser, R., Braun-Dullaeus, R., Walendzik, H. & Marquetant, R. (1992) Alpha 1-receptor-independent activation of protein kinase C in acute myocardial ischemia. Mechanisms for sensitization of the adenylyl cyclase system. *Circ. Res.* **70**: 1304-1312

Sumeray, M., Rees, D. & Yellon, D. (2000) Infarct size and nitric oxide synthase in murine myocardium. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **32**: 35-42

Sutherland, F. & Hearse, D. (2000) The isolated blood and perfusion fluid perfused heart. *Pharmacol. Res.* **41**: 613-627

Szasz, G., Gruber, W. & Bernt, E. (1976) Creatine kinase in serum: 1. Determination of optimum reaction conditions. *Clin. Chem.* **22**: 650-656

Takahashi, S., Suzuki, S., Takeuchi, K., Hatanaka, R., Narita, J., Iwabuchi, S., Yamada, Y., Fukui, K., Koyama, K., Takaya, S. & Koie, H. (1993) Role of endothelium for tissue damage by active oxygen radicals in heart-lung-transplantation. *Transpl. Proc.* **25**: 1676-1677

Takai, Y., Kaibuchi, K., Matsubara, T. & Nishizuka, Y. (1981) Inhibitory action of guanosine 3'5'-monophosphatidylinositol turnover and protein phosphorylation in human platelets. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **101**: 61-67

Takemoto, M. & Liao, J. (2001) Pleiotropic effects of 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl coenzyme a reductase inhibitors. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **21**: 1712-1719

Tamai, O., Matsuoka, H., Itabe, H., Wada, Y., Kohno, K. & Imaizumi, T. (1997) Single LDL apheresis improves endothelium-dependent vasodilatation in hypercholesterolemic humans. *Circulation* **95**: 76-82

Tanaka, M., Brooks, S. E. & Richard, V. (1993) Effect of anti-CD18 antibody on myocardial neutrophil accumulation and infarct size after ischemia and reperfusion in dogs. *Circulation* **87**: 526-535

Tennant, R. & Wiggers, C. J. (1935) The effect of coronary occlusion on myocardial contraction. *Am. J. Physiol.* **112**: 351-361

Teupser, D., Bruegel, M., Stein, O., Stein, Y. & Thiery, J. (2001) HMG-CoA reductase inhibitors reduce adhesion of human monocytes to endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **289**: 838-844

Torre-Amione, G., Kapadia, S., Lee, J., Durand, J., Ries, R., Young, J. & Mann, D. (1993) Tumor necrosis factor-alpha and tumor necrosis factors in the failing human heart. *Circulation* **4**: 704-711

Torzewski, J., Torzewski, M., Bowyer, D., Frohlich, M., Koenig, W., Waltenberger, J., Fitzsimmons, C. & Hombach, V. (1998) C-reactive protein frequently colocalizes with the terminal complement complex in the intima of early atherosclerotic lesions of human coronary arteries. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **18**:1386-1392

Tsao, P. & Lefer, A. M. (1990) Time course and mechanism of endothelial dysfunction in isolated ischemic- and hypoxic-perfused rat hearts. *Am. J. Physiol.* **259**: H1660-H1666

Tsao, P., Aoki, N., Lefer, D. J., Johnson, G. & Lefer, A. M. (1990) Time course of endothelial dysfunction and myocardial injury during myocardial ischemia and reperfusion in the cat. *Circulation* **82**: 1402-1412

Tsao, P., Ma, X.-L. & Lefer, A. M. (1992) Activated neutrophils aggravate endothelial dysfunction after reperfusion of the ischemic feline myocardium. *Am. Heart J.* **123**: 1464-1471

Vaage, J. & Valen, G. (1993) Pathophysiology and mediators of ischemia-reperfusion injury with special reference to cardiac surgery. A review. *Scand. J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **41** (Suppl.): 1-18

Van Aelst, L. & D'Souza-Schorey, C. (1997) Rho GTPases and signaling networks. *Genes Dev.* **11**: 2295-2322

Vedder, N. & Harlan, J. (1988) Increased surface expression of CD11b/CD18 (Mac-1) is not required for stimulated neutrophil adherence to cultured endothelium. *J. Clin. Invest.* **81**: 676-682

Verrier, E. D. & Shen, I. (1993) Potential role of neutrophil anti-adhesion therapy in myocardial stunning, myocardial infarction, and organ dysfunction after cardiopulmonary bypass. *J. Card. Surg.* **8**: 309-312

Viau, S., Fontaine, E., Veronneau, M., Jasmin, G. & Dumont, L. (1997) Myocardial reactive hyperemia in experimental chronic heart failure: evidence for the role of K⁺ adenosine triphosphate-dependent channels and cyclooxygenase activity. *J. Cardiac. Fail.* **3**: 207-215

Vinten-Johansen, J. & Thourani, V. (2000) Myocardial protection: an overview. *J. Extra. Corpor. Technol.* **32**: 38-48

Wainwright, C. L. & Parratt, J. (1993) Effects of R-PIA, a selective A1 adenosine agonist, on haemodynamics and ischaemic arrhythmias in pigs. *Cardiovasc. Res.* **27**: 84-89

Wan, S., LeClerc, J. & Vincent, J. (1997) Inflammatory response to cardiopulmonary bypass: mechanisms involved and possible therapeutic strategies. *Chest* **112**: 676-692

Ward, P. & Mulligan, M. (1992) Leukocyte oxygen products and tissue damage. Jesaitis, A. J., Dratz, E. A. The molecular basis of oxidative damage by leukocytes. *CRC-Press, Boca Raton. Ann. Arbor. London, Tokyo*: 139-147

Weisensee, D., Bereiter-Hahn, J., Schoeppe, W. & Friedrich, L. W. (1993) Effects of cytokines on the contractility of cultured cardiac myocytes. *Int. J. Immunopharmacol.* **15**: 581-587

Weyrich, A. S., Ma, X.-L. & Lefer, A. M. (1992) The role of L-arginine in ameliorating reperfusion injury after myocardial ischemia in the cat. *Circulation* **86**: 279-288

Wilkins, G. & Leake, D. (1990) Free radicals and low-density lipoprotein oxidation by macrophages. *Biochem. Soc. Trans.* **18**:1170-1171

Winqvist, R. & Hintze, T. (1990) An anti-CD18 Mab limits infarct size in primates following ischemia and reperfusion. *Circulation* **82** (Suppl.): 703-710

Wohlfart, P., Dedio, J., Wirth, K., Schoelkens, B. A. & Wiemer, G. (1997) Different B1 kinin receptor expression and pharmacology in endothelial cells of different origins and species. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **280**:1109-1116

Wohlfart, P., Strobel, H., Suzuki, T., Dharanipragada, H., Foerstermann, U. & Ruetten, H. (2003) A novel endothelial nitric oxide synthase expression enhancer reduces atherosclerosis in apoE-deficient mice. *Z. Kardiol.* **92**: (Suppl. 1): 312

Woo, Y. J., Zhang, J. C. & Vijayasarathy, C. (1998) Recombinant adenovirus-mediated cardiac gene transfer of superoxide dismutase and catalase attenuates postischemic contractile dysfunction. *Circulation* **98**: 255-260

Woolfson, R., Patel, V., Neild, G. & Yellon, D. (1995) Inhibition of nitric oxide synthesis reduces infarct size by an adenosine-dependent mechanism. *Circulation* **91**: 1545-1551

Yan, S. & Novak, M. (1999) Diverse effects of neutrophil integrin occupation on respiratory burst activation. *Cell. Immunol.* **195**: 119-126

Yang, H., Issekutz, T. B. & Wright, J. (1995) Prolongation of rat islet allograft survival by treatment with monoclonal antibodies against VLA-4 and LFA-1. *Transplantation* **60**: 71-76

Yokoyama, T., Vaca, L., Rossen, R. D., Durante, W., Hazarika, P. & Mann, D. L. (1993) Cellular basis for the negative inotropic effects of tumor necrosis factor- α in the adult mammalian heart. *J. Clin. Invest.* **92**: 2303-2312

Young, L., Ikeda, Y. & Lefer, A. M. (2001) Protein kinase inhibition exerts cardioprotective effects in myocardial ischemia/reperfusion via inhibition of superoxide release. *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.* **23** (3):107-114

Ytrehus, K. (2000) The ischemic heart – experimental models. *Pharmacol. Res.* **42**: 193-203

Zahler, S., Kupatt, C., Seligmann, C., Kowalski, C., Becker, B. & Gerlach, E. (1997) Retention of leukocytes in reperfused, isolated hearts does not cause haemodynamically relevant permanent capillary plugging. *Pflügers Arch. – Eur. J. Physiol.* **433**: 713-720

Zahler, S., Massoudy, P., Hartl, H., Hähnel, C., Meisner, H. & Becker B. F. (1999) Acute cardiac inflammatory responses to postischemic reperfusion during cardiopulmonary bypass. *Cardiovasc. Res.* **41**: 722-730

Zeiber, A., Drexler, H., Saurbier, B. & Just, H. (1993) Endothelium-mediated coronary blood flow modulation in humans. Effects of age, atherosclerosis, hypercholesterolemia, and hypertension. *J. Clin. Invest.* **92**: 652-662

Zhang, J., Zhang, M., Sugahara, K., Sagara, Y., Spirito, A., Dupre, D. & Kodama, H. (1999) D-cystathionine ketimine and L-cystathionine ketimine enhance superoxide generation by human neutrophils in a different manner. *Arch. Biochem. Biophys.* **363**: 55-59

Zimmerman, G., McIntyre, T. & Prescott, S. (1985) Thrombin stimulates the adherence of neutrophils to human endothelial cells in vitro. *J. Clin. Invest.* **76**: 2235-2246

Zweier, J. L., Flaherty, J. T. & Weisfeldt, M. (1987) Direct measurement of the free radical generation following reperfusion of ischemic myocardium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **84**: 1404-1407

Zweier, J. L., Broderick, R., Kuppusamy, P., Thomson-Gorman, S. & Lutty, G. A. (1994) Determination of the mechanisms of free radical generation in human aortic endothelial cells exposed to anoxia and reoxygenation. *J. Biol. Chem.* **269**: 24156-24162

Veröffentlichungen

Originalveröffentlichungen

Menning, K., Wohlfart, P., Busch, A. E., Strobel, H., Deckert, E. & Rütten, H. A novel endothelial nitric oxide synthase expression enhancer reduces a neutrophil-mediated ischemia-reperfusion injury in isolated perfused rat hearts. *In Arbeit (Brit. J. Pharmacol.)*

Kongressbeiträge

Menning, K., Wohlfart, P. & Rütten, H. (2003) A new endothelial nitric oxide synthase expression enhancer attenuates leukocytes-dependent reperfusion injury in isolated rat hearts. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **367** (Suppl. 1): R101

Vorträge

Menning, K., Wohlfart, P. & Rütten, H. (2003) Transkriptionserhöhung der endothelialen Stickstoffmonoxidsynthase durch S803 reduziert den Neutrophil-induzierten Reperfusionsschaden in isoliert perfundierten Rattenherzen nach Langendorff. *Z. Kardiol.* **92** (Suppl. 1): 72

Menning, K., Wohlfart, P. & Rütten, H. (2003) Simvastatin increases reactive hyperemic response in isolated rat Langendorff hearts by activation of K-ATP channels but not nitric oxide. *Z. Kardiol.* **92** (Suppl. 1): 313

Danksagung

Die vorliegende Dissertation wurde als externe Doktorarbeit in der Abteilung Cardiovascular Diseases von Aventis in Frankfurt am Main unter der Anleitung von Prof. Dr. Andreas Busch angefertigt.

Mein herzlichster Dank gilt:

Dr. Hartmut Rütten für die jederzeit gewährte freundliche Unterstützung und ausdauernde fachliche Betreuung der Doktorarbeit.

Prof. Dr. Andreas Busch für das Bereitstellen des Themas, des wissenschaftlichen Umfeldes sowie für die Betreuung der Arbeit.

Prof. Dr. Dr. Ernst Mutschler von der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main für die freundliche Betreuung und Begutachtung meiner Arbeit, durch die diese Dissertation erst ermöglicht wurde.

Allen Mitgliedern des Labors von Dr. Hartmut Rütten, insbesondere Doris Gehring für die geduldige und freundliche Einarbeitung in die Langendorff-Technik.

Dr. Gabi Biemer-Daub, Dr. Martin Gerl und ihren Mitarbeitern sowie Dr. Paulus Wohlfart, Elke Deckert und Dr. Hartmut Strobel für die angenehme Zusammenarbeit.

Dr. Katrin Rungwerth, Marlene Laux, Dr. Alexander Usselman, Dr. Dorothea Hartmann, Susanne Stamm, Oda Jooss, Thomas Heibel, Dr. Petra Arndt, Dr. Pearly Lee, Dr. Anke Niedernberg und Dr. Constanze Scherer für die hilfsbereite Unterstützung in allen Lebenslagen sowie für interessante Diskussionen und Gespräche.

Allen anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe für das angenehme Arbeitsklima, ihre Hilfsbereitschaft und Unterstützung.

Meiner Familie und meinem Freund Harald Bayer, die mir stets geduldig und liebevoll zur Seite gestanden haben.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Vor- und Zuname	Karen Menning
Wohnort	Frankfurt am Main
Geburtsdatum	14. Juli 1971
Geburtsort	Dunkerque (Frankreich)
Staatsangehörigkeit	deutsch/französisch

Ausbildung

1977 – 1981	Grundschule in Frankfurt/Main
1981 – 1990	Schiller-Gymnasium in Frankfurt/Main, Abitur 1990
1990 – 1992	Zweijähriger Frankreichtaufenthalt in Nancy
1993 – 1999	Studium der Pharmazie an der J. W. Goethe-Universität, Frankfurt/Main
Juni 1999	Approbation zur Apothekerin
Seit September 1999	Anfertigung der vorliegenden Dissertation in der Abteilung Cardiovascular Diseases von Aventis in Frankfurt am Main unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. A. E. Busch und Herrn Prof. Dr. Dr. E. Mutschler

Praktische Tätigkeiten

07.1993 – 08.1993	Famulatur in der Raben Apotheke, Frankfurt/Main
Mai 1998	Praktikum in der Krankenhausapotheke in Neufchâteau, Frankreich
06.1998 – 11.1998	Pharmaziepraktikum bei Hoechst Marion Roussel, Quality Operations Drug Products, Frankfurt/Main
12.1998 – 05.1999	Pharmaziepraktikum in der Struwelpeter-Apotheke, Frankfurt/Main