

**Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I  
der Universität Würzburg**

**Direktor: Professor Dr. med. Georg Ertl**

**Untersuchungen über die vorteilhaften und nachteiligen  
Effekte einer späten Reperfusion auf das Remodeling im  
Restmyokard nach Koronarocclusion bei der Ratte**

**Inaugural–Dissertation**

**Zur Erlangung der Doktorwürde der**

**Medizinischen Fakultät**

**der**

**Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg**

**vorgelegt von**

**Bernd Josef Meyer**

**aus Ramsberg am großen Brombachsee**

**Würzburg, Juli 2005**

**Referent: Prof. Dr. med. Georg Ertl**

**Koreferent: Priv.-Doz. Jörg Strotmann**

**Dekan: Prof. Dr. med. Georg Ertl**

**Tag der mündlichen Prüfung: 04.04.2006**

**Der Promovend ist Arzt**

**In Erinnerung an Lara Maria gewidmet**

# **Inhaltverzeichnis**

## **1. Einleitung und Fragestellung**

### **1.1. Hintergrunddaten der kardiovaskulären Erkrankungen**

#### **1.1.1. Epidemiologische Daten**

#### **1.1.2. Infarktentsstehung**

#### **1.1.3. Risikofaktoren**

### **1.2. Ablauf des Infarktgeschehens**

#### **1.2.1. Phase der frühen Ischämie**

#### **1.2.2. Stadium der Nekrose**

#### **1.2.3. Stadium der Vernarbung**

#### **1.2.4. Ventrikuläres Remodelling**

### **1.3. Therapeutische Ansätze**

#### **1.3.1. Konservative Pharmakotherapie und Thrombolyse**

#### **1.3.2. Besonderheiten interventioneller Therapieformen**

#### **1.3.3. Reperfusionsschäden**

#### **1.3.4. Vergleich der Therapieregime**

### **1.4. Zelluläre Grundlagen**

#### **1.4.1. Extrazellulärer Raum**

#### **1.4.2. Kollagen**

#### **1.4.3. Stoffwechsel der extrazellulären Matrix**

### **1.5. Intention**

## **2. Material und Methodik**

### **2.1. Tierexperimenteller Teil**

#### **2.1.1. Tiere und Gruppeneinteilung**

#### **2.1.2. Experimentelle Provokation eines Myokardinfarkt**

#### **2.1.3. Operative Reperfusion**

- 2.1.4. Hämodynamische Messung**
- 2.2. Histologische Gewebeuntersuchung**
  - 2.2.1. Gewebepräparation und Färbung**
  - 2.2.2. Histomorphologische Untersuchung der Gewebe**
- 2.3. Auswertung der ermittelten Messwerte**
  - 2.3.1. Einheiten der Messwerte und Berechnung der abgeleiteten Größen**
  - 2.3.2. Statistische Auswertung**
- 2.4. Biochemische Gewebeanalyse des linken Ventrikels**
  - 2.4.1. Gewebeaufbereitung und Präparation**
  - 2.4.2. Proteincharakterisierung mittels Gelelektrophorese (Western Blot)**
  - 2.4.3. Transfer der Proteine auf PMDF-Membran**
  - 2.4.4. Proteinnachweis durch Immunoblot**
  - 2.4.5. Auswertung Proteincharakterisierung**
- 2.5. Enzymhistochemische Gewebeuntersuchung**
  - 2.5.1. Fixierung und Präparation der Gewebe**
  - 2.5.2. Immunologischer Proteinnachweis**
  - 2.5.3. Polarisationsmikroskopische Auswertung**

### **3. Ergebnisse**

- 3.1. Ergebnisse der Hämodynamik**
  - 3.1.1. Infarktgröße, Körper- und Herzgewichte**
  - 3.1.2. Strukturelles Remodeling nach Myokardinfarkt und Reperfusion**
  - 3.1.3. Hämodynamische Veränderungen nach Myokardinfarkt**
  - 3.1.4. Arbeitsvolumen**
  - 3.1.5. Passive Volumenkurve**
- 3.2. Biochemische Ergebnisse und Regressionsanalyse**
  - 3.2.1. Ergebnisse für Timp-1**
  - 3.2.2. Ergebnisse für MMP-1 im Pellet**
  - 3.2.3. Ergebnisse für MMP-1 in Lösung**
  - 3.2.4. Ergebnisse für MMP-2 im Pellet**

**3.2.5. Ergebnisse von Fibronectin im Pellet**

**3.3. Ergebnisse der Immunlokalisierung von MMP-2, FN, Collagen 1 und 3**

## **4. Diskussion**

**4.1. Auswirkungen einer späten Reperfusion auf Hämodynamik und Morphologie**

**4.2. Biochemische Veränderungen und ihre Bedeutung**

**4.3. Einfluss der Reperfusion auf die Enzymlokalisierung**

## **5. Zusammenfassung**

## **6. Literaturverzeichnis**

# 1. Einleitung

## 1.1 Hintergrunddaten der kardiovaskulären Erkrankungen

Über die Anatomie und Funktionsweise des Herzens gab es im Altertum nur vage Vorstellungen und in vielen Kulturen wurde im Herz der Sitz der Seele vermutet. Mit der Entdeckung des großen Blutkreislaufes und der Funktion des Herzens als dessen Antriebspumpe im Jahr 1628 schuf William Harvey die Grundlage für das Verständnis des kardiovaskulären Systems [1]. Das Wissen über die Physiologie und Pathologie des Herz-Kreislaufsystems hat seit dieser Zeit immens zugenommen und ist gegenwärtig Objekt intensiver Forschung. So sollen mit dieser Arbeit die komplexen Umbau- und Adaptationsvorgänge des Herzens nach einem Myokardinfarkt näher beleuchtet werden. Dabei ist besonderes Augenmerk auf die hämodynamischen, morphologischen und biochemischen Veränderungen gerichtet worden, die bei einer späten Reperfusion, d.h. beim Wiedereröffnen eines verschlossenen Herzkranzgefäßes auftreten.

Aufgrund der momentan unklaren Datenlage, ob eine sehr späte Reperfusion einen eindeutigen Benefit gegenüber einem nicht revaskularisiertem Gefäß bringt und zum Studium der dabei auftretenden Veränderungen und deren Pathomechanismen war es notwendig sich eines etablierten Tiermodells zu bedienen. Besonderes Interesse galt dabei der Interaktion von Hämodynamik, Morphologie und Extrazellulärmatrix. Bei letzterer sollte die Auswirkung von Matrixmetalloproteinasen, kurz MMP, auf das strukturelle Remodeling im Herzen, sowie deren Regulation durch die tissue inhibitor of metalloproteinase, kurz TIMP, untersucht werden. Die Bedeutung und die Zusammenhänge dieser Enzyme wird an anderer Stelle näher erläutert. Die Wichtigkeit dieser Arbeit zeigt sich aus den Fakten, die im folgenden beschrieben werden sollen.

### 1.1.1 Epidemiologische Daten

In den westlichen Industrieländern sind Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems bis heute die häufigste Todesursache, wobei in dieser Gruppe Myokardinfarkt und Herzinsuffizienz an erster Stelle stehen [2]. Mit dem klinischen Syndrom der Herzinsuffizienz wird ein Zustand beschrieben, bei dem das Herz aufgrund von Störungen nicht mehr in der Lage ist, Blut in ausreichender Menge oder Geschwindigkeit durch den Körper zu pumpen, um so die Energie- und Stoffwechselbedürfnisse der Organe und der Körpergewebe zu befriedigen [3].

Die durch diese Erkrankung verursachten Kosten sind beträchtlich. So müssen in der Bundesrepublik jährlich durch die 200 000 Neuerkrankungen ca. 2% des Gesundheitsbudgets alleine für Diagnosestellung, Behandlung und Prävention der Herzinsuffizienz aufgebracht werden [4]. Aber nicht nur die Erkrankung an sich verursacht Kosten, sondern der morbiditätsbedingte Produktionsausfall ist ein weiterer Punkt, der die volkswirtschaftliche Bedeutung der Herzinsuffizienz zeigt.

Durch neue Behandlungsmöglichkeiten sinkt zwar die Mortalität kardiovaskulärer Erkrankungen in den entwickelten Industrieländern, allerdings nehmen Inzidenz und Prävalenz der Herzinsuffizienz ständig zu [5]. So wird die Prävalenz der Herzinsuffizienz in der Population der Framingham-Studie in der Altersgruppe von 60 bis 69 mit 2,3% beziffert, im Alterskollektiv von 70 bis 79 steigt die Prävalenz sogar auf 4,9% [6]. Allein für die USA gibt die American Heart Association 2,3-3,0 Millionen bekannte Fälle an [7]. Die Inzidenz der Herzinsuffizienz wird häufig unterschätzt. So liegt sie in Großbritannien mit 3 pro 1000 Neuerkrankungen über derjenigen von Brustkrebs (0.54/1000) oder Zervixtumoren (0.24/1000) [8].

Auch die Prognose unter herkömmlicher Therapie ist seit Jahren gleich schlecht, die Fünf-Jahres-Überlebensrate liegt niedriger als bei vielen malignen Tumoren. Zwei Jahre nach Diagnosestellung versterben 37% der Männer und 38% der Frauen, nach 5 Jahren beträgt die Mortalität sogar über 50% [9].



Die Ätiologie der akuten und chronischen Herzinsuffizienz ist vielförmig. Als Ursache spielen neben entzündlichen Prozessen, Druckbelastungen oder Klappenvitien die ischämisch bedingten Herzerkrankungen eine besondere Rolle, allen voran der Myokardinfarkt [3]. Da der Herzinfarkt eine der häufigsten Ursachen für die Entstehung einer chronischen linksventrikulären Dysfunktion des Herzens ist, soll im Folgenden kurz ein Überblick über den Pathomechanismus und die Risikofaktoren gegeben werden [10].

### **1.1.2 Infarktentstehung**

Als Ursache des ischämischen Myokardinfarktes findet sich meist eine hochgradige Stenose oder ein kompletter thrombembolischer Verschluss einer Koronararterie. Meist gehen einem solchen Geschehen atherosklerotische Veränderungen der Koronararterien voraus. Hierbei kommt es durch subendotheliale Ablagerungsprozesse zur Bildung von atherosklerotischen Plaques, die das Gefäßlumen einengen. Reißt an einer solchen Stelle das Endothel auf, kommt es durch freigelegte Strukturen der Extrazellulärmatrix zur Aktivierung der Blutgerinnung und es bildet sich ein Thrombus. Dieser verschließt das Gefäß, oder engt es soweit ein, dass die Blutversorgung des nachfolgenden Myokards nicht mehr gewährleistet ist [11]. Es kommt zum irreversiblen Zelluntergang oder Myokardinfarkt, der sich rasch von einem meist zunächst subendokardialen Infarkt innerhalb weniger Stunden zu einem transmuralen Infarkt ausbildet, falls eine hochgradige Ischämie persistiert. Die Ausdehnung des Infarkts hängt von den anatomischen Gegebenheiten ab, also dem Versorgungsgebiet des infarktassozierten Gefäßes und einer möglichen Kollateralversorgung sowie der Dauer des Koronarverschlusses. Bei sehr ausgedehnten Infarkten kann es unmittelbar zum Linksherzversagen mit konsekutivem kardiogenem Schock und sehr ungünstiger akuter Prognose kommen [12].

### **1.1.3 Risikofaktoren**

Als allgemein anerkannte Risikofaktoren zählen das Alter, Geschlecht, Hyperlipid- bzw. Hypercholesterinämie, HDL-LDL Quotient, Rauchen, Hypertonus, Diabetes mellitus, Adipositas, Familiengeschichte und eine bereits vorhandene Herz-Kreislauf-Erkrankung [11]. Nicht jeder Faktor hat für unterschiedliche Individuen das gleiche Risikopotential und meist finden sich mehrere Faktoren gleichzeitig. Als Risikofaktoren zur Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen sind all diese Parameter gesichert und sollten zu einer genauen Einschätzung des individuellen Risikos zur Entwicklung einer kardiovaskulären Erkrankung erfasst werden [13].

## **1.2 Ablauf des Infarktgeschehens**

Über die Entstehung des Myokardinfarktes wurde bereits näher eingegangen. Im folgenden soll der zeitliche Ablauf näher beleuchtet werden, der für das Verständnis der vorliegenden Arbeit wichtig ist. Dabei sollen weniger die klinischen Symptome im Vordergrund stehen, als vielmehr die strukturellen und zellulären Geschehnisse.

### **1.2.1 Phase der frühen Ischämie**

Die Frühphase des Myokardinfarktes ist von einem intrazellulären Energiedefizit und der Anhäufung von Endprodukten des anaeroben Stoffwechsels (Laktat, NADH/H<sup>+</sup> und Protonen) geprägt, der sich aus einer Unterversorgung des Myokards mit Sauerstoff und Nährstoffen ergibt. Daraus resultieren Störungen des Elektrolytmilieus der Kardiomyozyten, insbesondere eine Kaliumverarmung. Die damit verbundene Änderung des Membranpotentials bewirkt die Infarktspezifische ST-Veränderung im EKG und kann schwerwiegende

elektrophysiologische Konsequenzen wie ventrikuläre Ektopien oder Kammerflimmern haben.

Gleichzeitig häuft sich zytosolisches Kalzium an, was zu verzögerten Nachdepolarisationen führt und die Entstehung ventrikulärer Arrhythmien fördert. Darüber hinaus führt die zytosolische Kalziumanhäufung zur Einschränkung der Kontraktionsfähigkeit [14].

### **1.2.2 Stadium der Nekrose**

Durch Ausfall der Na/K-ATPase mit entsprechender intrazellulärer Natriumanhäufung entwickelt sich nach ca. 1-4 h ein intrazelluläres Ödem mit konsekutiver Ruptur des Sarkolemms. Durch freigesetzte Enzyme, freie Fettsäuren, kalziumaktivierte Phospholipasen und freie Radikale werden zelluläre Strukturen irreversibel geschädigt. Es kommt zur Entstehung einer Nekrose, die makroskopisch und lichtmikroskopisch erst ab einem Infarktalter von ca. 4 h durch zunehmende Zelleosinophilie, nukleäre Pyknose und beginnender Zelldegeneration sichtbar ist.

### **1.2.3 Vernarbung**

Die Reparation des irreversibel geschädigten Myokards wird durch die Einwanderung von neutrophilen Granulozyten eingeleitet, die lichtmikroskopisch 12-24 h nach Infarktbeginn sichtbar wird und nach 2-4 Tagen ihre maximale Konzentration erreichen. Diese verursachen eine lokale Inflammation, mit Ausschüttung von Entzündungsmediatoren. Durch diese angelockt, folgen nach 5-7 Tagen Makrophagen, die für das Abräumen des nekrotischen Gewebes verantwortlich sind. Nach 11-14 Tagen beginnt an den Infarktträndern die Einsprossung von Granulationsgewebe. Dieses besteht u.a. aus Angioblasten, sowie reichlich Fibroblasten die nach ca. 14-30 Tagen extrazelluläres Kollagen bilden. Im Laufe der Zeit bildet sich reifes Narbengewebe mit dichtem Kollagen und fortschreitender Zellverarmung. Diese Narbe ist zwar belastungsstabil, kann

aber die Funktion des verlorengegangenen Myokards nicht kompensieren. So kommt es im Verlauf zu tiefgreifenden Umbauprozessen, die mit dem Schlagwort „Remodeling“ bezeichnet werden.

#### **1.2.4 Ventrikuläres Remodeling**

Unter Remodeling versteht man einen Prozess, bei dem die Größe, die Form, und die Funktion des Ventrikels durch mechanische, neurohumorale und genetische Faktoren reguliert wird. Dabei ist Remodeling ein Zeichen physiologischer Anpassung während des normalen Wachstums oder spielt sich pathologisch z.B. nach Infarkt ab [15].

Bereits in der Frühphase des Infarkts und in den nachfolgenden Monaten kommt es zu Umbauvorgängen des gesamten linken Ventrikels. Neben der frühzeitigen Abnahme der Wandstärke und Ausdehnung des infarzierten Bezirkes kann es zu einer fortschreitenden Dilatation des linken Ventrikels unter Einbeziehung nichtinfarzierter Regionen kommen. Die infarktbedingte Zunahme des ventrikulären Umfangs und die Änderung der Ventrikelgeometrie führt zu einer Zunahme der diastolischen Wandspannung. Mittel- bis langfristig entsteht kompensatorisch eine inadäquate Hypertrophie des nichtinfarzierten Myokards, die zu einer systolischen Funktionseinschränkung und einer weiteren Zunahme der Füllungsdrücke führt. Die Folge davon ist ein weiteres Fortschreiten der linksventrikulären Dilatation sowie ein Anstieg des myokardialen Sauerstoffverbrauchs [16]. Da dieser Begriff für das weitere Verständnis der Arbeit so wichtig ist, lohnt es sich etwas näher auf die Details einzugehen.

Die Nekrose von Myozyten nach Infarkt und der daraus resultierende Anstieg der Ventrikelfüllung löst eine Kaskade von intrazellulären Signalprozessen aus, die wiederum die Reparaturvorgänge initiieren und modulieren. Diese Veränderungen beinhalten eine Dilatation des Ventrikels, eine Hypertrophie des Restmyokards sowie die Bildung einer Narbe aus Kollagen im ischämischen Areal. Das Remodeling nach Infarkt kann in 2 Phasen unterteilt werden; eine frühe Phase (bis 72 h) und eine späte Phase (ab 72 h).

Die frühe Phase zeichnet sich aus durch eine Ausdehnung der Infarktzone. Diese resultiert aus einem Abbau von Kollagen durch Serinproteasen und Metalloproteinasen (MMPs), die von neutrophilen Granulozyten freigesetzt werden. Die Infarktausdehnung bewirkt eine Reduktion der Wanddicke und eine ventrikuläre Dilatation und ist verantwortlich für einen Anstieg des Wandstress, der wiederum ein starker Stimulus für eine Hypertrophie der Myozyten ist. Hämodynamische Störungen stimulieren in der frühen Phase das sympathisch adrenerge System zur Synthese von Katecholaminen, aktivieren das Renin-Angiotensin-Aldosteron System und stimulieren die Bildung von natriuretischen Peptiden (ANP, BNP).

Diese Peptide reduzieren das Gefäßvolumen, den systemischen Gefäßwiderstand, sie normalisieren das ventrikuläre Füllungsvolumen und verbessern die Pumpfunktion.

Das späte Remodeling bezieht dann den ganzen Ventrikel mit ein und steht in Verbindung mit der „Zeit-abhängigen“ Dilatation, der Änderung der Ventrikelkontur und der Wandhypertrophie. Die Unfähigkeit den angestiegenen Wandstress zu normalisieren führt zur progressiven Dilatation [17].

### **1.3 Therapeutische Ansätze**

Im folgenden Abschnitt soll kurz auf die Therapiemöglichkeiten des Myokardinfarktes eingegangen werden. Eine tragende Rolle spielt hierbei die medikamentöse Therapie, mit der die Frühmortalität gesenkt werden kann und welche die Entwicklung zur Herzinsuffizienz günstig beeinflussen soll. Leider ist trotz des enormen Fortschrittes und der Verbesserung der Therapiemöglichkeiten der Herzinfarkt und die sich oft anschließende Herzinsuffizienz mit einer hohen Mortalität belastet.

### 1.3.1 Konservative Pharmakotherapie und Thrombolyse

Die Pharmakotherapie spielt bei der Behandlung des Herzinfarktes eine entscheidende Rolle. Es soll hier aber nur ein kurzer Überblick über die Standardtherapie der akuten und chronischen Herzinsuffizienz, wie sie nach Myokardinfarkt auftritt gegeben werden. Zu unterscheiden sind dabei eine Akuttherapie und eine Langzeittherapie, die beide zum Ziel haben, die Überlebenschancen der Patienten zu erhöhen. Die Akuttherapie zielt darauf ab, die Kreislaufsituation zu stabilisieren um einen schnellstmöglichen Transport in eine entsprechende Klinik zu ermöglichen, da nur unter intensivmedizinischer Überwachung die in einem hohen Prozentsatz auftretenden Rhythmusstörungen schnell genug erkannt und behandelt werden können. Im Vordergrund steht die maximale Schonung des Herzens zur Senkung des Sauerstoffverbrauchs. Diese wird durch eine ausreichende Sedierung mit Benzodiazepinen (Diazepam 5-10 mg i.v.) und Analgesierung mit Opiaten (Morphin 10-20 mg i.v.) erreicht. Die Gabe eines kurzwirksamen  $\beta$ -Blockers hat sich ebenfalls als wirksam herausgestellt. Des Weiteren hat sich die Anwendung von Glyceryltrinitrat zur Sofortmaßnahme bewährt. Einerseits entlastet eine leichte Vasodilatation das Herz, der Sauerstoffbedarf des Myokards sinkt, andererseits konnte experimentell nachgewiesen werden, dass Nitrate intravenös appliziert die Infarktgröße, Infarktausdehnung und die Mortalität senken [18]. Als zweite wichtige Maßnahme sollte die später genauer beschriebene Lysetherapie und eine Antikoagulation mit ASS und Heparin Anwendung finden [19]. Beim Auftreten von Tachykardien werden  $\beta$ -Blocker eingesetzt, eventuelle Arrhythmien mit Ajmalin 50 mg i.v. als Kurzinfusion, oder Lidocain 0,5-3,5 mg/min als Infusion behandelt.

Wird das Akutereignis überlebt, zielt die weitere Therapie darauf ab, das Risiko für einen Folgeinfarkt zu verringern und einer Herzinsuffizienz entgegenzuwirken. Als Ursache eines Reinfarktes gelten die selben oben beschriebenen Risikofaktoren, die entsprechend behandelt werden müssen. Die Therapie der Herzinsuffizienz richtet sich nach der Leistungsfähigkeit und dem

Schweregrad der Beeinträchtigung, die von keinen subjektiven Beschwerden, bis Beschwerden in Ruhe reichen. Hierbei hat sich eine Einteilung in NYHA I-IV bewährt [20]. Entsprechend der Stufe der NYHA-Einteilung richtet sich die Therapie, die an die jeweiligen Symptome der Patienten angepasst wird. Zur Anwendung kommen diesem Schema folgend je nach Stadium bis zu fünf Medikamente (ACE-Hemmer, bzw. AT1-Blocker, Diuretika,  $\beta$ -Blocker, Herzglykoside und Aldosteron-Antagonisten) [21]. Diese Behandlung zielt darauf ab, die Leistungsfähigkeit, Prognose und Lebenserwartung zu optimieren. Eine weitere pharmakologische Behandlungsmöglichkeit mit völlig anderem Ansatzpunkt ist die Lysetherapie zur Wiedereröffnung des verschlossenen Gefäßes. Zur Anwendung kommen hier Präparate wie Streptokinase, Urokinase und tPA, die intravenös verabreicht werden. Diese Enzympräparate bewirken einen proteolytischen Abbau des Gefäßthrombus und führt so zu einer Revaskularisierung. Leider kommt es bei dieser Interventionsform auch zu Komplikationen, wie Blutungen, allergische Reaktionen oder akut einsetzende Arrhythmien. Deshalb soll im folgenden Abschnitt näher auf die Besonderheiten der Reperfusionstherapie eingegangen werden.

### **1.3.2 Besonderheiten interventioneller Therapieformen**

Entscheidend bei der Wiedereröffnung eines okkludierten Gefäßes ist der Zeitpunkt der Rekanalisation. Reimer et al. zeigte schon 1977 an Hundeherzen, dass die Infarktgröße von der Dauer der Koronarokklusion abhängt [22]. Dies zeigt sich auch bei der Reperfusion. So bewirkt eine frühe Eröffnung der verschlossenen Arterie eine unmittelbare Rettung von Myokard mit daraus folgenden kleinerem Infarktgebiet und verbesserter linksventrikulärer Funktion sowie verringerter Mortalität [23]. Bei der späten Reperfusion ist hingegen keine Rettung von Myokard mehr möglich, sie hat aber dennoch Auswirkungen auf die linksventrikuläre Funktion und das Überleben [16]. Michael et al. konnte an Mäusen zeigen, dass bei einer Reperfusion nach 2 Stunden keine Rettung von Myokard mehr möglich ist. Er bezeichnet deshalb eine Reperfusion bis 2 Stunden

nach Infarkt als frühe Reperfusion und eine Reperfusion ab 2 Stunden oder später nach Infarkt als späte Reperfusion [17]. Diese Einteilung wurde auch für die vorliegende Arbeit übernommen, so dass mit der Reperfusion nach 2 Stunden und 3 Tagen nur der Effekt der späten Reperfusion untersucht wird.

Das für das Tiermodell gesagte lässt sich aber nicht ohne weiteres auf den Menschen übertragen. So ist beim Menschen außer dem Reperfuptionszeitpunkt auch die Qualität der Kollateralblutversorgung entscheidend, die es im Tiermodell so ausgeprägt nicht gibt. Milavetz et al. hat gezeigt, dass ein hoher Myokard-Rettungs-Index und damit eine deutlich verringerte Infarktausdehnung, sowie verbesserte Heilung auch nach mehr als zwei Stunden nach Infarkt zu erreichen sind, wenn eine ausreichende Kollateralblutversorgung besteht [24]. Eine Erklärung hierfür ist, dass die Kardiomyozyten in diesem Gebiet wesentlich länger überleben können. Ihre Fähigkeit sich zu erholen ist zwar deutlich vermindert, was auch als „Stunning“ bezeichnet wird [25], jedoch ist es möglich dieses sich „im Winterschlaf befindliche“ (hibernating) Myokard nach erfolgreicher Reperfusion wieder zu aktivieren, wodurch sich stellenweise die Wandbeweglichkeit [26], sowie die regionale Myokardfunktion [27] verbessert. Es kann also auch durch späte Revaskularisierung Myokard gerettet oder reaktiviert werden, solange es vorher durch kollaterale Gefäße mit einem Restblutfluss am Leben gehalten wurde [16].

Generell gilt aber, dass eine frühe Intervention die Rettung von Myokard wie auch die Überlebenschancen maximiert. Ist dies nicht möglich, spielt die späte Reperfusion dennoch eine wichtige Rolle.

So lässt sich beim Vorhandensein von Kollateralen durch den oben erklärten Mechanismus die Infarktausdehnung auch noch später als zwei Stunden nach Myokardinfarkt verringern und eine späte Wiedereröffnung des Gefäßes verbessert auch die Heilung des Gewebes [28]. Ein weiterer entscheidender Vorteil einer Spätreperfusion ist eine niedrigere Mortalität. Dies ist für Thrombolyse noch bis zu 12, für eine Rekanalisation mit PTCA noch über 24 Stunden nach Infarkt belegt [29]. Auch wenn keine Rettung von Myokard mehr erfolgt führt die späte Behandlung zu einer Abnahme des ventrikulären



Remodeling, weniger Arrhythmien und einer höheren Überlebenschance [16]. Leider ist die Reperfusion nicht die Behandlungsmöglichkeit schlechthin, die kritiklos angewandt werden kann. So gibt es nach wie vor Unsicherheit darüber bis zu welchem Zeitpunkt diese Behandlung sinnvoll und nützlich, oder aber sogar nachteilig ist. Die momentane Datenlage zeigt, dass bei dem aktuell gültigen Zeitfenster von 12 Stunden für eine Reperfusion mehr als 50 % keine Intervention erhalten und allein konservativ behandelt werden [30, 31]. Von Beobachtungen her und aus Daten von Patienten, die eine sehr späte Revaskularisation erhalten haben, ist aber bekannt, dass trotz des späten Zeitpunktes das Risiko und die Mortalität nicht ansteigen [32]. Bislang gibt es keine kontrollierte, prospektive Kohortenstudie mit Patienten, die ein genaues Zeitfenster für die Reperfusion von okkludierten Gefäßen festlegt.

Auch in Tiermodellen (Ratten oder Mäuse) mit chronischem Infarkt wurden die positiven Effekte einer späten Reperfusion auf die Infarktausdehnung und das Remodeling nur in einem Zeitintervall von bis zu 16 Stunden untersucht [33, 34]. Da eine Revaskularisierung eben nicht gänzlich ohne Nachteile ist, sondern im Gewebe auch Schäden hinterlässt, werden diese im nächsten Abschnitt kurz erklärt.

### **1.3.3 Reperfusionsschäden**

Bei der Reperfusion eines ischämischen Gewebebezirks besteht für das Gewebe in der Infarktzone, das die Hypoxie überlebt hat, nochmals die Gefahr, Schaden zu erleiden, obwohl das Gebiet wieder mit Sauerstoff versorgt wird. Grund dafür ist die während der Reperfusion eintretende Reaktion des Enzyms Xanthin Oxidase mit dem Hypoxanthin als Substrat in der Gegenwart von Sauerstoff. Beide, Enzym und Substrat, sind im ischämischen Gewebe entstanden. Bei der Reaktion kommt es zur Bildung von Hydroxylradikalen. Die Hydroxylradikale haben eine zweifache Wirkung: 1. Sie schädigen die Zellmembran direkt und 2. sie sind chemotaktisch wirksam für neutrophile Granulozyten. Die so rekrutierten

Granulozyten adhären an die Endothelzellen und führen so zu einer Flussverlangsamung. Neuerdings wird versucht, diese Reperfusionsschäden durch den Einsatz von Antiadhäsions-Antikörpern bzw. anti-inflammatorische Agentien (Xigris®, Ethyl Pyruvat u.a.) zu reduzieren. Verwendet werden Antikörper gegen CD18 bei Myokardinfarkt, ICAM 1, GPIIb/IIIa bei Hirninfarkt [35].

### **1.3.4 Vergleich der Therapieregime**

Die möglichen Strategien des Managements des akuten Herzinfarkts bei Patienten mit ST-Strecken Hebung im EKG reicht von der Lyse mit pharmakologischen Kombinationstherapien, bestehend aus 50% Lytikum mit niedermolekularem Heparin und/oder GPIIb/IIIa Blockern, bis hin zur Intervention mittels PTCA und Stentimplantation.

Aufgrund der derzeitigen Datenlage ist beim akuten Herzinfarkt die Intervention mit Stent und intensiver Thrombozyteninhibition (GPIIb/IIIa-Blocker) plus ADP-Rezeptorantagonisten (Clopidogrel®) der Lyse mit einem modernen Fibrinolytikum (meist Bolus Applikation) klar überlegen [36, 37]. Die beste pharmakologische Reperfusion erzielt heute eine durchschnittliche Öffnungsrate im Infarktgefäß von etwa 70%. Eine Lyse innerhalb der ersten 2 Stunden ist sogar mit den Öffnungsraten interventioneller Verfahren, die bei etwa 90-95% liegen, vergleichbar [38].

Für die primäre PTCA gilt nach den ESC-Guidelines 2002: Es ist die bevorzugte Therapie beim Schock, sie ist indiziert bei einer Kontraindikation für die Lyse und sie gilt als Routinetherapie, wenn sie innerhalb von 60 Minuten nach Klinikaufnahme („door-to-balloon-time“) von einem erfahrenen Team durchgeführt werden kann [39]. Hierzu benötigt man allerdings ein Herzkatheterlabor und eine gut organisierte Infrastruktur. Deshalb kann diese optimale Reperusionsstrategie nur bei einem geringen Prozentsatz der Patienten durchgeführt werden.

Angesichts dieser Tatsache rückt die zweitbeste Reperusionsstrategie, eine möglichst frühzeitige pharmakologische Reperfusion, in den Vordergrund. Es soll

versucht werden die Zeitspanne zwischen Schmerzbeginn und Verabreichung des Thrombolytikums („door-to-needle-time“) so gering wie möglich zu halten (kritisches Zeitfenster bis 2 h nach Symptombeginn, s.o.), eventuell auch durch eine Prähospitallyse.

Es wird aber auch über eine Kombination beider Wege nachgedacht. Es besteht die Hypothese, dass die Wiedererstellung eines antegraden Flusses in einem verschlossenen Infarktgefäß durch Lyse, GPIIb/IIIa-Blocker und Clopidrogrel® das Ergebnis einer anschließenden mechanischen Intervention verbessert. Dies wird gerade in großen Studien (FINESSE II) untersucht [40].

#### **1.4 Zelluläre Grundlagen**

Die Veränderungen nach Myokardinfarkt, wie sie makro- und mikroskopisch gefunden werden haben ihre Korrelation auf zellulärer und biochemischer Ebene. Eine entscheidende Rolle kommt dabei der Extrazellulärmatrix zu. So hat das Herz die Fähigkeit auf mechanische und chemische Stimuli mit strukturellem Umbau der Extrazellulärmatrix zu antworten, was sich wiederum in einem signifikanten Einfluss auf die Herzfunktion zeigt [41]. Besonders interessant ist hierbei die Rolle der Matrixproteine, insbesondere der Kollagenabbau durch die Matrixmetalloproteinasen (MMPs) und deren Regulation durch die tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMPs). Zahlreiche Studien, gerade der letzten Jahre zeigten den Zusammenhang von Tumorausbreitung, Metastasierung oder Arthritis und einer erhöhten Aktivität der MMPs [42]. Es wurde in letzter Zeit aber auch immer mehr klar, dass die MMPs durch den Abbau von Extrazellulärmatrix an der Pathogenese kardiovaskulärer Erkrankungen beteiligt sind [43]. So konnte gezeigt werden, dass diese direkt an der Fibrosierung und dem Remodeling des Herzens mitwirken [44, 45]. Für diese Arbeit war vor allem von Interesse, wie sich eine Spätperfusion auf das Remodeling des Herzens unter biochemischen Gesichtspunkten auswirkt. Es wurde hierbei besonderes Augenmerk auf das Zusammenspiel der Extrazellulärmatrix, der Morphologie und der Hämodynamik des Herzens gelegt. Im folgenden Abschnitt soll nun zum

besseren Verständnis ein kurzer Überblick über die Zusammensetzung und Funktion des Extrazellulärraumes gegeben werden.

#### **1.4.1 Extrazellulärer Raum**

Der extrazelluläre Raum kann unterteilt werden in die extrazelluläre Matrix (ECM) und in die Basalmembranen. Die ECM ist ein stabiler Komplex von selbstaggregierenden Makromolekülen. Sie gleicht einerseits einer Art Baugerüst aus vorfabrizierten Fertigelementen mit Stützfunktion, andererseits einer wichtigen Informationszentrale für Wachstum, Differenzierung und Migration der Zellen. Sie besteht im wesentlichen aus Fasern (Kollagene, Elastin), Glykoproteinen (Fibronektin, Tenascin) sowie aus der Zwischensubstanz (Proteoglykane und Hyaluronsäure) [13].

#### **1.4.2 Kollagen**

Den mengenmäßig größten Anteil an der ECM hat das Kollagen mit seinen verschiedenen Untergruppen. Gegenwärtig sind 19 verschiedene Arten von Kollagen bekannt, von denen jedes aufgrund seiner unterschiedlichen Aminosäuresequenz spezielle biomechanische Eigenschaften aufweist [46]. Es gewährleistet sowohl Stabilität, als auch Flexibilität. Es strukturiert den Zellverband und ermöglicht so die Funktion des Herzens. Die Bildung von Kollagen hat aber auch entscheidende Bedeutung bei reparativen Prozessen. Diese Heilung nach Myokardinfarkt verläuft sehr dynamisch, mit einem Nebeneinander von Abbau und Aufbau von ECM. Einerseits kommt es im Wundgebiet zu einer Entzündungsreaktion mit nachfolgendem Einstrom von Leukozyten, wodurch das nekrotische Gewebe resorbiert und Kollagen abgebaut wird. Andererseits wandern Fibroblasten in das Gebiet ein und bilden neue Extrazellulärmatrix, die dann als Narbe den Platz der abgestorbenen Myozyten einnimmt [47, 48].

### 1.4.3 Kollagenabbau

Die Tripelhelix-Struktur des Kollagens erweist sich als äußerst resistent gegen proteolytischen Abbau. Ausgenommen sind Matrix Metallproteinase (MMPs), welche als Proenzyme in latenter Form in die extrazelluläre Matrix (ECM) freigesetzt werden. Sie werden erst durch eine proteolytische Entfernung einer Propeptid-Sequenz aktiviert. MMP-1 teilt Kollagen in  $\frac{3}{4}$  und  $\frac{1}{4}$  Fragmente, die wiederum von MMP-2, MMP-9 und MMP-3 entfaltet und weiter abgebaut werden [49].

Der Kollagenabbau beginnt innerhalb von 3 Stunden nach Infarkt und wird durch Serinproteasen, wie z.B. Plasmin, und durch die Freisetzung von MMP-8 durch neutrophile Granulozyten induziert. Danach zeigt sich ein stetiger Anstieg der Aktivität zwischen dem 2. und 7. Tag und ein Rückgang der Aktivität bis 28 Tage nach Infarkt [50].

Der Abbau von Kollagen wird durch tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMPs) auf die geschädigte Zone beschränkt. Diese niedermolekularen Proteine formen Komplexe mit hoher Affinität zu aktivierten MMPs und neutralisieren den Kollagenabbau durch eine Blockade der katalytischen Domäne [49]. TIMPs werden in der Infarktzone innerhalb von 6 Stunden gebildet, erreichen ihren Höhepunkt am Tag 2 und kehren bis zum 14. Tag auf ihren Ausgangslevel zurück [50]. Die Synthese von TIMPs wird durch den Level der aktivierten MMPs moduliert, so dass der Kollagenabbau das Ungleichgewicht zwischen MMPs und TIMPs widerspiegelt [13]. Die untenstehende Abbildung soll einen Überblick über die dynamischen Vorgänge des Abbaus der Extrazellulärmatrix geben.

**Abbildung 1:**

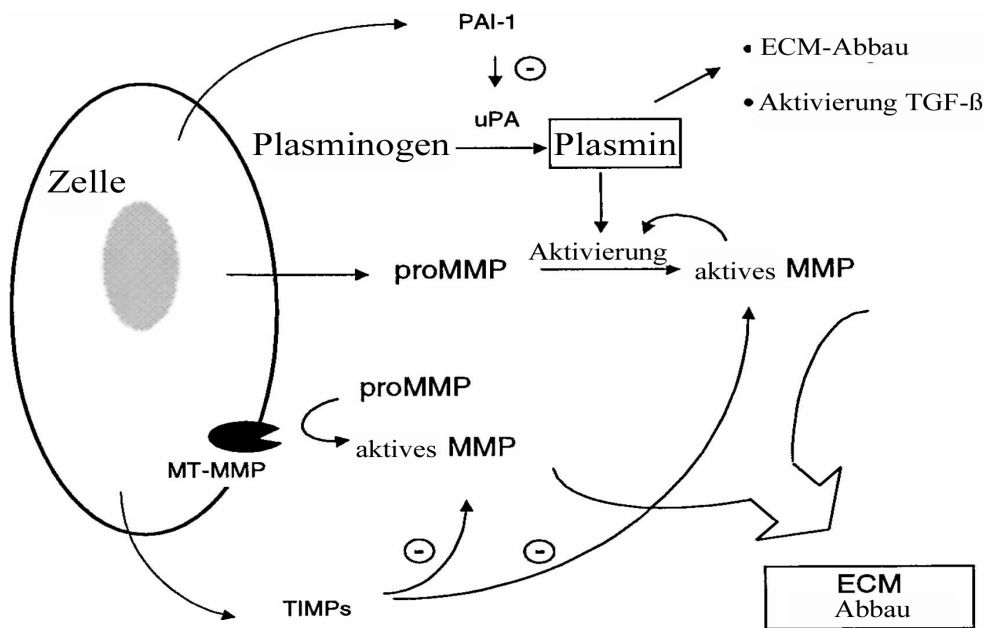


Abbildung 1 nach Creemers et al.[42]: Schematische Darstellung der Aktivierung und Deaktivierung von MMPs im Extrazellulärraum.

Der anfängliche Abbau von Bindegewebe in den ersten Tagen nach Infarkt, noch bevor es zur Neubildung von Kollagen kommt, reduziert die Reißfestigkeit der nekrotischen Zone und führt so zu einer relativen Verwundbarkeit in dieser Phase. Eine Reperfusion hingegen beschleunigt die Heilung und macht die Infarktzone dadurch in der frühen Phase weniger verletzlich. Dies geschieht zum einen dadurch, dass eine späte Reperfusion die frühe Aktivierung aller MMP-Isoformen signifikant verzögert, und somit den frühen Kollagenabbau verlangsamt, und gleichzeitig beschleunigt es die Reparaturvorgänge durch eine Stimulation zur Bildung von Fibronectin. Dieses spielt nämlich selbst eine kritische Rolle bei den Umbauvorgängen von Gewebe.

**Tabelle 1, Übersicht der einzelnen MMPs und ihrer Substrate**

Enzyme	MMP Klassifikation	Substrate
<b>Kollagenasen</b>		
Interstitielle Kollagenase	MMP-1	Kollagen I, II, III, VII und X, Gelantin, Entactin, Aggrecan
Neutrophilen Kollagenase	MMP-8	Kollagen I, II und III, Aggrecan
Kollagenase-3	MMP-13	Kollagen I, II und III, Gelantin, Fibronectin, Laminin, Tenascin
Kollagenase-4	MMP-18	Unbekannt
<b>Gelatinasen</b>		
Gelatinase A	MMP-2	Gelatin, Kollagene I, IV, V, VII und X, Fibronectin, Laminin, Aggrecan, Tenascin-C, Vitronectin
Gelatinase B	MMP-9	Gelatin, Kollagene IV, V und XIV, Aggrecan, Elastin, Entactin, Vitronectin
<b>Stromelysin</b>		
Stromelysin 1	MMP-3	Gelatin, Fibronectin, Laminin, Kollagen III, IV, IX und X Tenascin-C, Vitronectin
Stromelysin 2	MMP-10	Kollagen IV, Fibronectin, Aggrecan
Stromelysin 3	MMP-11	Fibronectin, Gelatin, Laminin, Kollagen IV, Aggrecan
<b>Membranständige MMPs</b>		
MT1-MMP	MMP-14	Kollagen I, II und III, Fibronectin, Laminin, Vitronectin, Proteoglycane, aktiviert proMMP-2 und proMMP-13
MT2-MMP	MMP-15	aktiviert proMMP-2
MT3-MMP	MMP-16	aktiviert proMMP-2
MT4-MMP	MMP-17	unbekannt
MT5-MMP	MMP-24	aktiviert proMMP-2
MT6-MMP	MMP25	
<b>Andere</b>		
Matrilysin	MMP-7	Gelatin, Fibronectin, Laminin, Kollagen IV, Vitronectin, Tenascin-C, Elastin, Aggrecan
Metalloelastase	MMP-12	Elastin
Unbenannt	MMP-19	unbekannt
Enamelysin	MMP-20	Aggrecan
	MMP-23	
Endometase	MMP-26	

Tabelle 1 nach Creemers et al. [42]: Übersicht der verschiedenen Proteasen mit ihren Substraten.

Es dient zum einen als Anker für das Anfügen von Kollagen an Zellen und kann zum anderen die MMP Expression, je nachdem ob es intakt oder proteolysiert vorliegt, entweder induzieren oder unterdrücken [51]. In der obenstehenden Tabelle 1 sind die einzelnen Bestandteile der am Umbau der Extrazellulärmatrix beteiligten Proteine zusammengestellt.

## **1.5 Intention**

In der Literatur finden sich viele Beweise für den Benefit einer Reperfusion nach Myokardinfarkt, auch noch mehr als zwei Stunden nach Symptombeginn. Auch die Veränderungen, die sich im Extrazellulärraum nach einem Infarkt abspielen sind im Ansatz schon bekannt. Diese Arbeit soll nun klären, ob eine Wiedereröffnung eines verschlossenen Gefäßes auch noch nach drei Tagen sinnvoll ist und wie sich hierbei die morphologischen und hämodynamischen Parameter verändern. Weiterhin soll ein Einblick darin gegeben werden, wie die biochemischen Prozesse der Extrazellulärmatrix nach einem Myokardinfarkt ablaufen und sich bei einer Spätreperfusion ändern. Die Zusammenschau der Ergebnisse soll zeigen, ob die hämodynamischen und morphologischen Veränderungen mit den Änderungen der Biochemie in Zusammenhang gebracht werden können und sich eine Korrelation findet. In Anbetracht der schlechten Prognose für Herzinfarktpatienten ist es notwendig die Grundlage für neue Behandlungsstrategien zu schaffen, welche die hohe Mortalität und Morbidität der Herzinsuffizienz reduziert. Hierzu ist es wichtig zu untersuchen, ob eine Reperfusion nach drei Tagen einen Vorteil bringt, um zusätzlich zur standardisierten Pharmakotherapie eine weitere Therapieoption für Patienten mit Myokardinfarkt zur Verfügung zu haben.



## **2. Material und Methodik**

### **2.1 Tierexperimenteller Teil**

In den folgenden Absätzen wird die Methodik der Infarktprovokation und Reperfusion am Tiermodell, der hämodynamischen Messung und deren Auswertung dargestellt. Weiterhin sollen die verwendeten Geräte und Instrumentarien beschrieben werden.

#### **2.1.1 Tiere und Gruppeneinteilung**

Die Studie wurde mit weiblichen Wistar-Ratten durchgeführt, deren Alter zu Beginn der Untersuchungen zwischen 4 und 8 Wochen lag; ihr Gewicht betrug zwischen 220 und 240 g, im Mittel 229 g. Die Tiere erhielten Trockenfutter sowie Wasser in beliebiger Menge und waren zu je 5 Tieren in Plexiglaskäfigen mit Gitterrostoberseite untergebracht. Die Einstreu aus grobem Holz – und Strohmehl wie auch das Trinkwasser wurden täglich gewechselt. Mit ihrem Käfig standen die Tiere in einem gut klimatisierten Tierstall mit 12 h Tag-Nacht-Rhythmus Beleuchtung.

Die Versuchstiere wurden aufgrund der Infarkttechnik in 3 Hauptgruppen unterteilt:

1. Sham-operierte Tiere
2. Permanent-infarzierte Tiere
3. Infarzierte Tiere mit anschließender Reperfusion

Die Reperfusion der dritten Gruppe erfolgte zwei Stunden, bzw. drei Tage nach Infarkt. Bei allen Infarkt-, bzw. Sham-operierten Tieren erfolgte die hämodynamische Messung eine Woche nach Operation. Die Techniken der Infarzierung und Reperfusion sollen im nächsten Abschnitt erläutert werden.

### **2.1.2 Experimentelle Provokation eines Myokardinfarktes**

Der Myokardinfarkt wurde durch Ligatur des Ramus interventricularis anterior der linken Koronararterie nach der etablierten Methode von Pfeffer [52] und Mitarbeitern induziert.

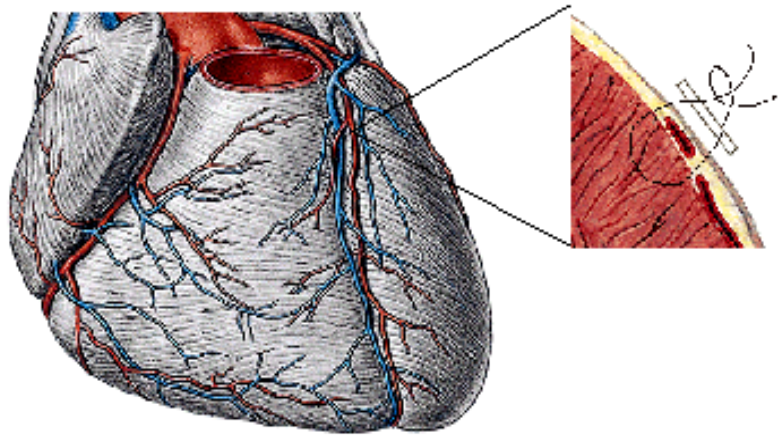
Nach Einleitung der Narkose mit Äther und Erreichen des Toleranzstadiums wurde die Ratte gewogen und mit einer Plastikkanüle intubiert (PE 200, Portex, England). Sofort nach der Intubation erfolgte der Anschluss an ein Beatmungsgerät (Rodent Ventilator Typ UB 7025, Fa. Hufo Sachs Elektronik, D-March). Die Tiere wurden mit einer Frequenz von 90/min und einem Atemzugvolumen von 2,5 ml beatmet. Im Nebenschluss war ein Isoflurantopf zur Aufrechterhaltung der Narkose geschaltet.

Nach Rasur und Desinfektion des Thorax wurde die Haut und der M. pectoralis mit einer Schere durchtrennt. Mit einem Spreizer wurde dann die Thoraxhöhle gedehnt und dadurch offen gehalten, anschließend das Herz mit Perikardsack aus dem Thorax luxiert. Nach Eröffnung des Perikards mit einer Schere erfolgte die Umstechung des Ramus interventricularis anterior an proximaler Stelle mittels eines Fadens (Prolene 5/0 RB-1, Ethicon, Norderstedt, Deutschland). Zum leichteren Lösen der Ligatur bei der Reperfusion wurde der Doppelknoten auf einem Soft Pledged (Soft Pledged „C“, Polytetrafluoroethylen, Firma Ethicon) geknüpft. Die eben beschriebene Technik soll in Abbildung 2 verdeutlicht werden. Anschließend wurde das Herz wieder in die Thoraxhöhle zurückgedrängt, der Thorax vernäht (2-0 Perma-Hand Seide, Ethicon, D-Norderstedt), die Hautnaht mit Metallclips (Michel Klips, D-Tübingen) verschlossen und anschließend erneut desinfiziert.

## Abbildung 2:

### Experimentelle Myokardinfarktprovokation:

Ligatur des Ramus intraventrikularis anterior



Modifizierte Methode nach Pfeffer MA 1979, 1991 und Gaudron P. 1994

Abbildung 2, nach Schettler G. [3]: Schematische Darstellung zur Durchführung einer Koronarligatur am Ramus interventrikularis anterior (RIVA).

Direkt nach der Operation wurde die Ätherzufuhr gestoppt und ein EKG zur Bestätigung des Infarktes geschrieben.

Sobald die Tiere spontan atmeten, extubierten sie sich nach Wiedererlangen des Bewusstseins selbst. Postoperativ wurden die Ratten fünf Stunden überwacht und bei auftretenden Herzrhythmusstörungen mechanisch reanimiert.

### 2.1.3 Operative Reperfusion

Die Reperfusion des infarzierten Myokardareals wurde bei einer Gruppe der Tiere nach 2 Stunden, bei der zweiten Gruppe nach 3 Tagen durchgeführt. Dabei wurde, wie bereits oben beschrieben, das Tier narkotisiert, intubiert, der Thorax nach

Entfernung der Metallclips erneut eröffnet, das Herz mittels leichtem Druck aus dem Thorax herausluxiert, der vorher eingebrachte Faden über dem Soft-Pledged durchtrennt und beides entfernt. Dies erfolgte teilweise unter EKG Kontrolle. Danach wurde der Thorax erneut mit Tabaksbeutelnaht und Metallclips verschlossen. Die Hautareale wurden dabei jeweils vor und nach der Eröffnung mit einem Hautantiseptikum desinfiziert.

Zur Erlangung einer ausreichenden Sham-Kontrollgruppe wurden neben der Rekrutierung von frustran coronarligierten Tieren auch speziell operierte Tiere herangezogen. Hierbei wurde ein gleichartiges OP-Procedere mit Ausnahme einer Verknüpfung des ebenfalls im Myokard eingebrachten Monofilfadens durchgeführt.

#### **2.1.4 Hämodynamische Messung**

Bei den Tieren wurden im Rahmen einer Operation 7 Tage nach Infarkt die aktiven hämodynamischen Parameter des Herzens als Basis- und Maximalwerte (unter Volumen- und Druckbelastung), sowie die passiven Druck-Volumen-Beziehungen des linken Ventrikels nach der von Pfeffer et al. [52] beschriebenen Methodik bestimmt. Hierzu wurden die Tiere nach dem oben beschriebenen Verfahren zur Einleitung der Narkose zunächst mit Äther betäubt. Nach vorheriger Messung des Körpergewichtes wurden die Tiere auf eine Wärmematte (Thermotex, Breuer) des OP-Tisches gelegt, fixiert und sofort tracheotomiert. Nach Einlegen eines 3-4 cm langen Plastikkatheters in die Luftröhre, sowie dessen doppelter Fixierung, wurden die Tiere wiederum an das Beatmungsgerät angeschlossen und mit einer Frequenz von 90/min und einem Atemzugvolumen von 2.5 ml beatmet. Die weitere Unterhaltung der Narkose konnte durch einen mit dem Beatmungsgerät in Serie verbundenen Anästhetikum-Tropf-Apparat gesteuert werden und erfolgte durch tropfenweise Äthergabe nach Bedarf. Hierbei konnte die jeweilige Narkosetiefe mittels Kontrolle des Muskeltonus eingeschätzt werden.

Nun wurde lateral der Trachea die A. carotis communis einer Seite von der lateralen Halsmuskulatur freipräpariert. Nach Abdrücken des Gefäßes proximal, sowie Perforation der Gefäßwand mittels einer Mikroschere, wurde ein Katheter (PE 50, Portex, England) in das Gefäß eingebracht und fixiert (4-0 Permaseide, Ethicon, Deutschland). Dieser wurde luftleer mit dem arteriellen Druckmesser (Millar Tip-Catheter Pressure Transducer SPC 350, Millar instr. Inc., USA) verbunden. Danach wurde nach ähnlichem Procedere auch die V. jugularis katheterisiert und ein venöses Drucksystem (Statham P23, Gould Inc., USA) angeschlossen. Nun wurde der Karotiskatheter in den linken Ventrikel vorgeschoben, die Jugularissonde in den rechten Vorhof. Nach Überprüfung der Signale (Modulares Biosystem, ZAK, Deutschland) sowie der Nulllinienkontrolle und Eichung (Graphtec Linearcorder Mark VII WR–Achtkanalschreiber, ZAK, Deutschland) erfolgte die vorübergehende Trennung vom Beatmungsgerät, so dass unter sehr flacher Narkose sowie spontaner Atmung die mittleren und phasischen Werte der ventrikulären bzw. atrialen Druck-Parameter aufgezeichnet werden konnten. Danach wurden die Katheter in die Gefäße zurückgezogen und die vaskulären Variablen registriert.

Anschließend wurde das Tier wieder in tiefere Narkose versetzt und mittels eines Hitze-Kauters (Erbotom Multiplex, Frank, Deutschland) eine Thorakotomie im Bereich des medianen Sternums durchgeführt. Danach wurde unter ständiger Kontrolle der Druckparameter der aufsteigende Ast der Aorta vorsichtig freipräpariert, mit einem Faden unterschlungen (2-0 Permaseide) und ein elektromagnetisches Flowmeter (Gould Blood Flow Transducer 2.5 mm, Gould-Statham Inc., USA) darauf platziert, so dass eine kontinuierliche Messung der mittleren und phasisch-maximalen, aortalen Blutfluss-Geschwindigkeit möglich war. Nun wurden nach Funktionskontrolle und Eichung dieser Signalwandler-Messsonde alle 2 Minuten die Druck- und Flusswerte in der V. cava superior bzw. Aorta ascendens über eine ca. 10 Minuten andauernde Periode gemessen, bis sich die Variablen wieder annähernd zu den Ausgangswerten vor der Thorakotomie stabilisiert hatten ( ca. 10% Abweichungstoleranz). Die Mittelwerte all dieser

Messungen bildeten schließlich die Basis-Werte nach Thorakotomie (systolischer arterieller Druck (SAP), diastolischer arterieller Druck (DAP), arterieller Mitteldruck (MAP), zentralvenöser Druck (VENP), Herzfrequenz (HR), Herzauswurfleistung (CO), maximale aortale Blutströmungsgeschwindigkeit (PEAKQ). Die genaue Beschreibung zur Berechnung der eben genannten Parameter ist unter Punkt 2.3.1 zusammenfassend beschrieben. Hierbei blieb bei Ableitung des CO aus den Messwerten der mittleren Aorten-Durchblutung der koronare Anteil des Schlagvolumens – methodisch bedingt – unberücksichtigt [53].

Nach Registrierung der Kontroll-Druckwerte des linken Ventrikels wurde die Aortenokklusion zum Erhalt der Maximalwerte bei Druckbelastung durchgeführt. Hierbei wurde die Aorta ascendens mittels eines unterschlungenen Fadens für die Zeitdauer von ca. 6-8 Herzschlägen manuell obstruiert und somit – gleichfalls unter Vernachlässigung der koronaren Durchblutung – eine nahezu isovolumetrische Kontraktion provoziert (Häm 1). Zur Auswertung kamen nur Komplexe von unmittelbar und gleichartig erhöhten LVSP-Werten über mindestens 4-5 Schläge ohne initialen Zwischenschlag, sowie gleichmäßig ansteigenden LVEDP-Werten, so dass dieses Procedere im Normalfall mehrfach wiederholt werden musste (DEVpmax, DEVp1b, DEVp1s).

Nach erfolgreicher Aufzeichnung eines maximalen Druckkomplexes wurde nach Rückkehr der hämodynamischen Ventrikelvariablen zu den Ausgangswerten die Kontroll-Druckwerte ein letztes Mal aufgezeichnet. Nun wurde das Procedere der ersten Volumenbelastung mit diesmal intraventrikulär platzierter Druck-Messsonde zur Bestimmung des linksventrikulären-enddiastolischen Druckes bzw. Volumens bei CO<sub>max</sub> wiederholt [54].

Für den Erhalt passiver, mechanophysiologischer Parameter (Druck-Volumen-Eigenschaften, Elastizität, Compliance) des linken Ventrikels wurden im Anschluss an die hämodynamischen Messungen zunächst zur postmortalen Gerinnungshemmung 5000 IE Heparin injiziert, dann das noch schlagende Herz mit ca. 1ml KCL-Lösung in der Diastole arretiert, sowie danach ein

doppellumiger Katheter über die Aorta in den linken Ventrikel eingeführt. Das größere Lumen des Katheters wurde an den Perfusor angeschlossen, das kleinere Lumen mit dem arteriellen Druckmesser verbunden – zur gleichzeitigen Infusion von isotoner NaCl-Lösung und Registrierung der Druckwerte.

Nun wurde das gesamte Herz von seinem Perikardmantel befreit, die beiden Vorhöfe durch Ligatur in der atrio-ventrikulären Ebene vom linken Ventrikel isoliert, sowie der rechte Ventrikel inzidiert, um eine isolierte, alleinige Betrachtung der mechanischen Eigenschaften des linken Ventrikels zu gewährleisten [54].

Das gesamte Ventrikel-Katheter-Druckmesser-System wurde mehrfach mit der Perfusor-Lösung durchspült und letztendlich genauestens auf seine Luftleere sowie Abgeschlossenheit hin überprüft. Nun wurden innerhalb von 10 Minuten nach Herzstillstand, d. h. vor Einsetzen des Rigor mortis, reproduzierbare – also mindestens 2 identische – Druck-Volumen-Kurven in einem Druckbereich von 0-30 mmHg mit einer Infusionsgeschwindigkeit von 13  $\mu\text{l}/\text{sec}$  aufgezeichnet. Schließlich wurde dem Tier das Herz Lungen Paket aus der Thoraxhöhle entnommen und sofort in einer Lösung aus Eiswasser und flüssigem Stickstoff gekühlt. Darin wurden dann zunächst Herz und Lungengewebe getrennt. Danach wurden die Vorhöfe entlang der atrioventrikulären Ebene abpräpariert und rechter und linker Ventrikel nahe des Septumbeginns getrennt. Alles wurde getrennt mittels einer Analysenwaage (Fa. Sartorius, Deutschland) abgewogen. Anschließend wurde aus dem infarzierten Linken Ventrikel ein Ring geschnitten und alles getrennt in flüssigem Stickstoff tiefgefroren.

## **2.2 Histologische Gewebeuntersuchung**

Der nächste Abschnitt beschreibt die Aufbereitung der gewonnenen Gewebeproben aus den linken Ventrikeln, sowie die Färbung der histologischen Schnitte und deren Auswertung.

### **2.2.1 Gewebepräparation und Färbung**

Die tiefgefrorenen Geweberinge wurden in Tissue-Tek (Sakura, Netherlands) gebettet und mit dem Gefriermikrotom (Leica CM 1850) bei  $-23^{\circ}\text{C}$  serienweise in 10 Schnitte mit jeweils  $7\mu\text{m}$  Schichtdicke zerlegt. Die Kryoschnitte wurden auf Objektträgern fixiert und eingefärbt. Hierzu wurden zweierlei Färbungen durchgeführt. Zum einen eine Hämalaun-Eosin Färbung zur Bestimmung der Zellmorphologie, zum anderen eine PSR (Pikro-Sirius-Red) Färbung zur Infarktgrößenbestimmung.

Die Färbungen wurden wie folgt durchgeführt:

#### **Hämalaun-Eosin Färbung**

1. Entparaffinieren des Schnittes in Xylol oder Roticlear, dann in absteigende Alkoholreihe geben, kurz in Aqua dest. Spülen.
2. Für 5 min in Hämalaun Reagenz färben, unter fließendem kalten Wasser 10 min wässern, gegenfärben mit Eosin (ca.10 sec.)
3. Kurz abspülen in Aqua dest. (zweimal tauchen), aufsteigende Alkoholreihe mit jeweils 100% Alkohol tauchen und sofort in Xylol (jeweils 5 min.), mit Entellan oder Eucid eindecken



### **PSR (Pikro-Sirius-Red) Färbung:**

1. Entparaffinieren in Xylol oder Roticlear, dann absteigende Alkoholreihe, kurz in Aqua dest. Spülen.
2. Für 30-45 min in PSR Reagenz, dann kurz in Aqua dest. Spülen, aufsteigende Alkoholreihe und in Xylol, mit Entellan oder Eucid eindecken.

In der unten stehenden Tabelle 2 sind die für die jeweilige Färbung benötigten Reagenzien zusammengefasst.

### **Tabelle 2, Aufstellung der Reagenzien zur Färbung von Gewebeschnitten**

#### **1. Hämalaun nach Mayer:**

6g	Hämatoxylin	(Fa. Roth)
1g	Natriumjodat	(Fa. Merck)
250g	Aluminiumkaliumsulfat	(Fa. Merck)
250g	Chloraldehyd	(Fa. Merck)
5g	Zitronensäure	(Fa. Merck)
auf 5000ml mit Aqua dest. Auffüllen		

## 2. Eosinfärbung

1g Eosin (Fa. Merck)
auf 100ml mit Aqua dest. Auffüllen
(1%ig)

## 3. PSR (Pikro-Sirius-Red) Färbung:

Gesättigte Pikrinsäure, Sirius-Red 1%ig (Fa. Merck)
90ml Pikrinsäure +10ml Sirius-Rot
mindestens 24 Std. vor Gebrauch
ansetzen

### 2.2.2 Histomorphologische Untersuchung der Gewebe

Die so behandelten Schnitte konnten nun mittels eines an einen Rechner gekoppelten Mikroskops untersucht werden. Hierbei kam die Software Sigma Scan Pro 5.0 zum Einsatz. Durch dieses Verfahren ist es möglich, gesundes Myokardgewebe von transmuraler Infarkt Narbe zu differenzieren, sowie die relative Infarktlänge bzw. Infarktfläche jedes einzelnen Schnittes zu errechnen. Der letztendliche relative Anteil des transmuralen Myokardinfarktes an der Gesamtfläche bzw. am Gesamtvolumen der linken Ventrikelwand konnte schließlich aus der Mittelung der einzelnen Schnittergebnisse bestimmt werden. Kriterium für die Einteilung in die verschiedenen Gruppen der Infarkt-Größe war lediglich die relative Infarktfläche der gesamten linken Ventrikelwand.

Anhand der erhobenen Messwerte wurden die Tiere nach Infarktgröße in drei Gruppen eingeteilt um eine Differenzierte Auswertung zu ermöglichen:

1. Kontrolltiere mit einer relativen Infarktgröße von 0-5 %.
2. Tiere mit kleinen Infarkten; Infarktgröße 5-35 %.
3. Tiere mit großen Infarkten; Infarktgröße > 45%.

### **2.3 Auswertung der ermittelten Messwerte**

Im nächsten Abschnitt soll auf die in den Messungen verwendeten Einheiten, die mathematischen Berechnungen verschiedener Indizes und die statistische Auswertung der einzelnen Ergebnisse näher eingegangen werden um so eine einheitliche Diskussionsbasis zu gewährleisten.

#### **2.3.1 Einheiten der Messwerte und Berechnung der abgeleiteten Größen**

Der linksventrikuläre systolische Blutdruck (LVSP), der linksventrikuläre enddiastolische Blutdruck (LVEDP), der rechte Vorhofdruck (RAP), der zentralvenöse Druck (VenP), der systolische, diastolische und mittlere aortale Blutdruck (SAP, DAP, MAP) wurden in mmHg, das Herzminutenvolumen (CO) und die maximale aortale Blutstromgeschwindigkeit (PEAKQ) in ml/min registriert.

Das Schlagvolumen (SV) wurde aus dem Herzminutenvolumen (CO) und der Herzfrequenz (HR) als  $CO/HR$  errechnet.

Die Berechnung des totalen peripheren Widerstandes (TPR) erfolgte nach der Formel  $(MAP-RAP/CO)$ . Er hat die Einheit  $mmHg \cdot min/ml$ . Die Schlagarbeit (SW) wurde nach  $MAP-RAP \cdot SV \cdot 0.0136$  ermittelt, die Einheit ist  $gm/m$ . Die Minutenarbeit erhält man entsprechend durch die Multiplikation von  $SW \cdot HR$  und kann sie in  $gm/m \cdot min$  angeben (34).

Alle Volumenwerte wurden auf 1 kg Körpergewicht umgerechnet, dem Kürzel wird dann ein I für Index zugefügt.

Die linksventrikuläre aktive Druckentwicklung DEVP wurde durch LVSP-LVEDP berechnet. Die linksventrikulären Volumina während der Druck-Volumen-Kurve lassen sich nach folgender Formel bestimmen:  $t \text{ (sec)} * 0.013 \text{ (ml/sec)}$ . Zu diesem Ergebnis muss dann noch das Volumen des eingeführten Katheters als  $[\text{Katheterlänge (mm)} * 0.00285 \text{ ml/mm}]$  addiert werden.

Die Steifigkeitskonstanten für den linearen Kurvenabschnitt der Druck-Volumen-Kurve (PVC) wurden nach der Formel  $\text{Druck} = I + \text{Vol} * S$  bestimmt, wobei I dem Schnittpunkt der berechneten Geraden mit der Y-Achse entspricht und S für die Steigung der Geraden steht. Der Wert S, nach dem aufgelöst wurde, ist die Steifigkeitskonstante für diesen Abschnitt. Im exponentiellen Kurvenabschnitt (3-10 mm, 10-20 mm, 20-30 mm, 2.5-30mm) fand die Formel  $\text{Druck} = I * \text{Exp}(\text{Vol} * S)$  Verwendung; wiederum entspricht S der Steifigkeitskonstanten [54].

### **2.3.2 Statistische Auswertung**

Alle Daten sind als arithmetisches Mittel  $\pm$  Standardfehler (SEM) angegeben. Multiple Vergleiche zwischen den verschiedenen Behandlungsgruppen wurden durch Varianzanalyse ANOVA (SuperANOVA™, Abacus Concepts, Inc., Berkeley, CA, USA) durchgeführt. Um Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen auf Signifikanz zu testen, wurde ein Bonferroni Post Hoc-Test durchgeführt. Bei allen Tests wurde ein Wahrscheinlichkeitswert  $p < 0.05 / n - 1$  für die Nullhypothese als signifikant gewertet mit  $n = \text{Anzahl der verschiedenen Gruppen}$ .

### **2.4 Biochemische Gewebeanalyse des linken Ventrikels**

Die biochemische Untersuchung der Gewebe erfordert eine spezielle Aufbereitung des Myokards, welches dann mit molekularbiologischen Techniken aufgetrennt und quantifiziert werden kann. Die einzelnen angewandten Methoden werden im weiteren Text beschrieben und erklärt.

### 2.4.1 Gewebeaufbereitung und Präparation

Zur Anwendung kommen Gewebeproben des nicht infarzierten Restmyokards des linken Ventrikels. Zu Beginn der Aufarbeitung werden aus den bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagerten Gewebeproben ca. 80-120 mg schwere Stücke in einem Bad aus flüssigem Stickstoff geschnitten. Sie werden gewogen, in einen Glaskolben (Dounce homogenizer) gegeben und auf Eis gelagert. Nun wird eine entsprechend dem Gewebegewicht berechnete Menge an Triton-Puffer, sowie Ocadaic Acid und PMSF, zugefügt. Das Gewebe wird nun im Dounce Glaskolben ca. 1 min. auf Eis homogenisiert, bis optisch keine Gewebestücke mehr sichtbar sind. Anschließend ruht die Lösung 20 min auf Eis.

Das Homogenisat wird nun mit einer Plastikpipette in ein Zentrifugenröhrchen transferiert und bei  $4^{\circ}\text{C}$  10min bei 14000g zentrifugiert. Der Überstand wird anschließend ohne das abgesetzte Pellet zu mobilisieren entfernt und in ein neues Reagenzglas gegeben, zusammen mit der gleichen Menge an 2fach SDS-Sample Puffer. Beides wird vermischt und auf Eis gelagert. Das verbleibende Pellet wird mit ca. 1ml Triton Puffer (einschl. Inhibitoren) gewaschen, dann mit Hilfe einer Injektionsnadel (Blau, 23g) und einer 1ml Insulin-Spritze mobilisiert, zerkleinert, und durch die Scherkräfte beim Einsaugen vollständig gelöst.

Die Lösung wird erneut 10min bei  $4^{\circ}\text{C}$  und 14000g zentrifugiert. Die überstehende Flüssigkeit wird vorsichtig ausgekippt. Nun sollte das Pellet weiß sein, andernfalls muss es erneut gewaschen werden, bevor es im nächsten Schritt in einfach SDS Puffer aufgelöst wird. Dies geschieht wieder durch mehrmaliges Einsaugen in eine 1ml Insulin-Spritze mit einer Injektionsnadel (Blau, 23g). Diese Lösung wird dann noch mit Hilfe eines speziellen Ultraschallgerätes (Ultrasonicator) auf Molekülgröße zerkleinert. Beide Fraktionen werden dann in SDS Puffer gelöst für ca. 5 min. bei  $95^{\circ}\text{C}$  gekocht, anschließend eingefroren und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. In Tabelle 3 sind die Chemikalien mit der jeweils benötigten Menge zur Herstellung von Tris-Triton-Lysis Puffer, sowie von SDS-Sample Puffer zusammengefasst.

**Tabelle 3, Reagenzien zur Herstellung von 2% Tris-Triton-Lysis und SDS-Sample Puffer**

**Tris-Triton-Lysis Puffer**

Triton-X 100	2ml
10mM EGTA	380mg
NaVO <sub>3</sub> (1000fach)	200µl
Tris-HCl (100mM)	1,21g
Mit H <sub>2</sub> O auf	100ml auffüllen.

PH auf 7,4 einstellen und bei 4°C lagern.

**SDS-Sample Puffer mit 2% SDS-Konzentration**

20%SDS:	20 g SDS in 100 ml steriles Wasser
0,2 M Tris Base:	242mg auf 10 ml Wasser
0.02M EDTA:	74mg auf 10 ml Wasser
pH auf 8.0 einstellen.	

**Pipettierschema:**

steriles H <sub>2</sub> O	19 ml
Glycerol	12 ml
20% SDS	4 ml
Tris/EDTA	5 ml
DTT	617 mg
Total	40 ml

Einige Tropfen konzentrierte Pyronin Y Lösung hinzufügen, bis ein Farbumschlag in Pink sichtbar wird. Die Lösung anschließend durch einen sterilen Filter geben und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahren.

#### **2.4.2 Proteincharakterisierung mittels Gelelektrophorese (Western Blot)**

Es werden die Gewebeproben verwendet, deren Aufbereitung unter Punkt 2.4.1 beschrieben ist. Diese werden mittels Gelelektrophorese ihrer Größe nach aufgetrennt und sind so einer genaueren Untersuchung zugänglich. Hierzu wird als erstes ein hochvernetztes Polyacrylamidgel aus Monomeren hergestellt, dessen Porengröße durch den Vernetzungsgrad bestimmt wird. Für die Gelelektrophorese wurde das Gerät SE 600 Ruby der Firma Hoefer verwendet. Alle im Folgenden beschriebenen Teile sind in dem Komplettsset enthalten und werden im Einzelnen nicht mehr gesondert beschrieben.

Zunächst werden die zwei Glasplatten mit Alkohol gereinigt, um mögliche Fremdproteine zu entfernen. Eine der Glasplatten wird auf eine saubere Unterlage gelegt und auf die beiden kürzeren Ränder der Platte werden zwei Platzhalter aus Kunststoff bündig platziert. Hierauf wird die zweite Glasplatte gelegt, so dass alle Bauteile glatt abschließen. Um ein Verrutschen des Sandwichs zu verhindern wird das Ganze durch zwei Klemmen gesichert. Bevor die Schrauben fest angezogen werden, wird nochmals die Lage der Glasplatten kontrolliert und ggf. korrigiert.

Der gummibeschichtete Dichtungsstreifen wird in den Halterungsboden eingelegt und das Sandwich in die Halterung gesteckt und mit zwei Bolzen befestigt. Diese werden nun gedreht und drücken so das Sandwich auf den Dichtungsstreifen wodurch ein Auslaufen des Gels verhindert wird. In den Spalt zwischen den Glasplatten werden 18 ml eines 7,5%igen Polyacrylamidgels blasenfrei eingefüllt.

Anschließend werden auf den Oberrand des Gels einige Tropfen mit Isobutanol gesättigtem Wasser aufgebracht, die, nachdem das Gel festgeworden ist, wieder mit Aqua dest. abgewaschen werden. Um sicherzustellen, dass sich Gel und Staker gut verbinden, wird das restliche Wasser mit Löschpapier entfernt.

In den Spalt zwischen den beiden Glasplatten wird ein Teflonkamm eingesteckt und das Stakergel blasenfrei eingefüllt. Nach 20 min. wird der Teflonkamm vorsichtig herausgezogen und die so entstandenen Taschen zwischen dem Gel werden mit Runningpuffer aufgefüllt.

In Tabelle 4 sind die jeweils benötigten Reagenzien zur Herstellung des Polyacrylamidgels, des Stakergels, sowie des Runningpuffers aufgelistet.

**Tabelle 4, Herstellung des Polyacrylamidgels, des Stakergels und des Runningpuffers**

**Polyacrylamidgel:**

16,0 ml Aqua dest.
11,3 ml 1,5 M Trispuffer
280 $\mu$ l 20% SDS
10,5 ml Acrylamid 40 %
4,1 ml Bis 2 %
14 $\mu$ l TEMED
315 $\mu$ l APS 10 %

**Stakergel:**

9,0 ml Aqua dest.
1,75 ml 0,5 M Trispuffer
90 $\mu$ l 20 % SDS
1,8 ml Acrylamid 40 %
1,05 ml Bis 2%
14 $\mu$ l TEMED
210 $\mu$ l APS 10 %



## **Runningpuffer**

24 g Tris-Base (Firma Sigma),  
116 g Glycine (Firma Sigma),  
20 ml SDS 20% (Firma Sigma)  
4 Liter steriles Wasser

Nun werden die bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefrorenen Proteinproben bei Raumtemperatur aufgetaut und für 5 min bei  $95^{\circ}\text{C}$  gekocht. Danach mit 14000 U/min für eine Minute zentrifugiert. Anschließend werden mit einer Mikrospritze jeweils 20  $\mu\text{l}$  in eine Geltasche geladen.

Zur Bestimmung des Molekulargewichtes werden jeweils 20 $\mu\text{l}$  eines Rainbowmarkers in die äußersten Taschen des Gels gegeben. Dieser wird aus 70 $\mu\text{l}$  Rainbowmarker und 20 $\mu\text{l}$  SDS hergestellt. Eine weitere Geltasche sollte mit dem zu untersuchenden Protein geladen werden, welches dann als Positivkontrolle fungiert.

Das Gelelektrophoresegerät wird nun noch komplett montiert und die Pufferkammern mit Runningpuffer gefüllt. Die Box wird anschließen mit zwei Kabeln an die Stromquelle (EPS 601, Firma amersham pharmacia biotech) angeschlossen, wobei auf richtige Polung zu achten ist. Am Netzgerät wird eine Spannung von 200 Volt bei 50 mA eingestellt. Nach 15-16 Stunden sind die Proteine an den Unterrand des Gels gelaufen und soweit getrennt, dass sie vom Gel auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF) übertragen werden können.

### **2.4.3 Transfer der Proteine auf PVDF-Membran**

Die Proteine werden nun im Verfahren nach Western vom Polyacrylamidgel auf eine PVDF-Membran geblottet. Hierzu wird eine auf das Gel zugeschnittene Membran in eine Schale mit Methanol für 5 min. gelegt. Anschließend wird diese für weitere 5 min. mit Transferpuffer (Herstellung siehe Tabelle 5) gewaschen.

### **Tabelle 5, Herstellung des Transferpuffers**

Tris-Base (Firma Sigma)	12 g
Glicine (Firma Sigma)	58 g
Methanol (Firma Sigma)	800 ml
Steriles Wasser bis zu 1 Liter auffüllen.	

Auf den Boden der Transferbox (TE 70 Semi-Dry transfer-Unit, Firma Hoefer) wird ein Rahmen aus Plexiglasfolie gelegt, der etwa 2 mm kleiner sein sollte als das Gel. Hierauf wird das Sandwich platziert, für das jeweils 2-3 Lagen in Transferpuffer getränktes Blotting-Papier, die Membran und das Gel aufeinandergelegt werden. Zwischen den einzelnen Lagen dürfen sich keine Luftblasen befinden und die einzelnen Blätter müssen gut benetzt sein. Nach diesem Schema können bis zu vier Gele gleichzeitig bearbeitet werden, wobei zwischen die einzelnen Sandwichs jeweils eine Lage Cellophan-Papier gelegt wird. Für den Transfer wird die Box mit dem Deckel verschlossen und mit einem Gewicht von ca. 1 kg beschwert. Nachdem die Transferbox an die Spannungsquelle (EPS 601, Firma amersham pharmacia biotech) angeschlossen ist, wird die für die Gelgröße notwendige Spannung angelegt, hier 50 V, bei 150 mA und 100  $\Omega$ . Bei vier Gelen sollte eine Laufzeit von vier Stunden nicht unterschritten werden, um einen ausreichenden Übertrag der Proteine auf die Membran zu erzielen.

#### **2.4.4 Proteinnachweiß durch Immunoblot**

Ziel der weiteren Bearbeitung der Membranen ist es, die nachzuweisenden Proteine darzustellen und zu quantifizieren. Hierzu bedient man sich immunologischer Methoden. Proteine stellen als Makromoleküle antigene Determinanten dar, die spezifisch von Antikörpern erkannt werden. Die

Immunglobuline stammen für diese Arbeit von immunisierten Kaninchen oder Mäusen von verschiedenen Firmen, die in Tabelle 6 aufgelistet sind.

Zur weiteren Behandlung wird zunächst die Membran in eine 10 %ige Lösung aus 2g handelsüblichem Magermilchpulver und 20ml TBST gelegt. Anschließend werden die Antikörperlösungen aus 15 ml TBST und der für die jeweilige Konzentration erforderlichen Menge des Antikörpers hergestellt und über die geblockte Membran gegossen. Nach ca. 12 Stunden wird diese aus der Lösung genommen und dreimal jeweils für 5 min. in TBST gewaschen. Nun wird der zweite Antikörper in einer Konzentration von 1:8000 aufgebracht der spezifisch an den ersten bindet. Nach einer Einwirkzeit von einer Stunde wird die Lösung abgegossen und die Membran nochmals dreimal in TBST gewaschen und ist nun einer qualitativen und quantitativen Auswertung zugänglich.

**Tabelle 6, Übersicht der verwendeten Antikörper**

Zielprotein	Firma	Antikörperart	Konzentration
Fibronectin	Sigma	Maus	1:200
Vitronectin	Chemicon	Maus	1:200
Collagen-1	Abcam	Kaninchen	1 :2500
Collagen-3	Abcam	Kaninchen	1:2500
MMP-1	Chemicon	Maus	1:1000
MMP-2	Sigma	Kaninchen	1 :1000
MMP-13	Sigma	Kaninchen	1 :100
MMP-9	Sigma	Kaninchen	1 :1000
TIMP-1	Chemicon	Maus	1:200
TIMP-2	Chemicon	Maus	1:500

### 2.4.5 Auswertung Proteincharakterisierung

Das Ziel der Auswertung ist die aufgetrennten und mit spezifischen Antikörpern markierten Proteine quantitativ zu erfassen. Dies gelingt mit einem Fluoreszenzmarker, der nur an den Protein-Antikörperkomplex bindet. Das von diesem Marker ausgehende Licht kann mit einer speziellen Optik und Software gemessen werden und ist proportional zu der Menge des untersuchten Proteins.

Vor der Auswertung wird die Membran mit Chemi-Glow (Alpha Innotech Corporation) benetzt und dann in die an einen Rechner gekoppelte MultiImage FC Cabinet (FluorChem, Alpha Innotech Corporation) gegeben. Nachdem die Größe und die Position der Membran justiert sind erfolgt eine Serienaufnahme (Movie Mode) der gesamten Membran. Es werden dabei 10 Bilder mit einer Belichtungszeit von 20 sec überlagernd aufgenommen und abgespeichert. Eine Aufnahme wird als Final-Picture für die spätere Auswertung gesondert abgespeichert. Da sich meist auf den Membranen auch Banden mit unspezifischen Signalen befinden muss es möglich sein das gewünschte Protein anhand seines Molekulargewichtes zu unterscheiden. Dies wird durch einen Rainbow-Marker möglich, der gesondert fotografiert und als Overlay gespeichert wird. Anhand dieses Overlay-Bildes, das über das Final-Bild gelegt wird, kann so die gewünschte Bande durch die verschiedenen Farben des Markers identifiziert werden, da jede Farbe einem Molekulargewicht in Kilodalton entspricht.

Später wird das Finalbild mit Hilfe der Image Analysis Tools im ToolBox-Modus (Alpha Innotech Corporation) quantifiziert. Im Spot-Denso-Measurement Modus werden vorher definierte Kästchen (Object Boxes) über die sieben Einzelfractionen der zu untersuchenden Bande gelegt und die jeweilige Pixelstärke prozentual ausgewertet (7Kästchen =100%). Dieser Wert wird durch Auto Background um das Hintergrundrauschen berichtigt. Die SpotDenso-Results werden wiederum getrennt abgespeichert.

## 2.5 Enzymhistochemische Gewebeuntersuchung

Die in 7µm geschnittenen Gewebeproben des linken Ventrikels wurden im weiteren noch einer enzymhistochemischen Untersuchung unterzogen um die Lokalisation der jeweiligen Metalloproteinasen ( MMPs ), der TIMPs, sowie des Kollagens, des Fibronektins und des Vitronektins im Gewebe zu bestimmen. Die dazu benötigten Techniken werden in den folgenden Punkten näher erläutert.

### 2.5.1 Fixierung und Präparation der Gewebe

Das Prinzip dieser Methode besteht darin, das zu untersuchende Protein mittels eines spezifisch bindenden Antikörpers zu identifizieren und in einem zweiten Schritt den zuvor aufgetragenen Antikörper durch einen Fluoreszenzmarker sichtbar zu machen. Anschließend werden die Kardiomyozyten, sowie die Zellkerne spezifisch angefärbt. Das so vorbereitete Gewebe ist dann einer Auswertung unter dem Fluoreszenzmikroskop zugänglich. Für die Untersuchung werden die Gewebeproben wie bereits weiter oben beschrieben im Kryotom in 7 µm dicke Schnitte zerlegt und auf Objektträger gebracht. Zur Fixierung werden diese zunächst für 15 min. in Paraformaldehyd (2%ig, Firma Sigma), danach für 20 min. in eine Lösung aus 0,1% Triton-Puffer (aus Triton gelöst in TBS) gelegt und anschließend zwei mal mit TBS gewaschen. Die Puffer werden aus folgenden Bestandteilen angesetzt, die in Tabelle 7 aufgelistet sind.

**Tabelle 7, Herstellung von 0,1 % Triton Puffer**

TBS:	150 mM NaCl
	21 mM Tris, mit HCl eingestellt auf pH 7,6
	0,05 % NaN <sub>3</sub>
TBSA:	zusätzlich zum TBS-Puffer 1 % BSA (fatty acid free)
Triton:	0,5 % Triton X in PBSA,

Die Objektträger werden dann getrocknet und die darauf befindlichen Gewebsschnitte mit einem PAP- Pen (ImmEdge-Pen, Firma Vector Laboratories inc., Burlingame) umkreist. Im nächsten Schritt werden die Proben mit 10 %igem Donkey Serum (Normal Donkey Serum, Firma Jackson Immuno Research Laboratories inc., Niederlande), gelöst in TBSA für 1-2 Stunden geblockt um unspezifische Antikörper zu entfernen.

### **2.5.2 Immunologischer Proteinnachweis**

Nach der Gewebevorbereitung wird nun der erste Antikörper aufgebracht und für ca. 12 Stunden bei 4°C inkubiert. Es wurden folgende Proteine, die in Tabelle 8 zusammengefasst sind mit den jeweiligen spezifisch bindenden Antikörpern in einer Konzentration von 1:20 untersucht:

**Tabelle 8, Enzymhistochemisch nachgewiesene Proteine**

MMP 1,2,9 und 13	(Firma Chemicon, von Mäusen )
TIMP 1 und 2	(Firma Abcam, von Kaninchen)
Kollagen Typ I und III	(Firma Abcam, von Mäusen)
Fibronectin, Vitronectin	(Firma Abcam, von Mäusen)

Sind die Immunglobuline fest gebunden, werden die überschüssigen Antikörper durch dreimaliges Waschen in TBSA entfernt. Nun wird der zweite Antikörper in einer Konzentration von 1:500 aufgetragen und für 2 Stunden im Dunklen inkubiert. Zum Einsatz kommen hier Antikörper, die spezifisch an Immunglobuline von Kaninchen oder Mäusen binden, je nachdem welchen tierischen Ursprungs der erste Antikörper war. Anschließend werden die Schnitte wiederum dreimal mit TBSA gewaschen. In den nächsten beiden Schritten

werden die Kardiomyozyten mit Phalloidin (Alexa Fluor 546 Phalloidin, Firma Molecular Probes, Niederlande) und die Zellkerne mit DAPI (Firma Molecular Probes, Niederlande), einer Substanz, die sich an Nukleinsäuren bindet, angefärbt. Hierfür werden die Proben zunächst mit Alexa 546-phalloidin in einer Konzentration von 1:40 für 20 min inkubiert, nach dreimaligem Waschen mit TBSA wird schließlich noch mit DAPI (1:500) für 5 min., inkubiert und letztmals drei mal mit TBSA gewaschen. Auf die nun fixierten und gefärbten Schnitte werden mit Prolong Antifade Kit (Firma Molecular Probes, Niederlande) die Deckgläser montiert, welche über Nacht abgedeckt trocknen sollen. Diese werden schließlich mit Nagellack versiegelt.

### **2.5.3 Polarisationsmikroskopische Auswertung**

Die weitere Auswertung erfolgt unter dem Polarisationsmikroskop. Aufgrund der Eigenschaften der durchgeführten Färbungen leuchten die Kardiomyozyten unter dem Polarisationsmikroskop rot, die Zellkerne blau und das Signal des gewünschten Proteins grün auf. So ist es möglich, die unterschiedlichen Strukturanteile des Gewebes genau zu differenzieren und zu bestimmen, wo ein gewünschtes Protein im Gewebe lokalisiert ist.

### **3. Ergebnisse**

#### **3.1 Ergebnisse der Hämodynamik**

Im folgenden Abschnitt sind die Ergebnisse der hämodynamischen Messungen dargestellt. In den Tabellen sind jeweils die aus den Rohdaten unter statistischen Gesichtspunkten errechneten Mittelwerte mit den dazugehörigen Standardfehlern aufgelistet.

##### **3.1.1 Infarktgröße, Körper- und Herzgewichte**

In der folgenden Tabelle 9 sind die verschiedenen ermittelten Gewichte von Herz, Lunge und Körpergewicht als statistische Mittelwerte aufgeführt. Die Infarktgröße (MI Größe in %) errechnet sich hierbei aus dem Anteil der Narbe am Restmyokard und wird in Prozent angegeben. Das Körpergewicht der Tiere (BW), das linksventrikuläre-(LV), das rechtsventrikuläre-(RV) und das Lungengewicht (Lunge) wurden bei allen Gruppen bestimmt und das Verhältnis der Herz und Lungengewichte zum Körpergewicht errechnet (LV/BW, RV/BW, Lung/BW).

Es finden sich kaum Unterschiede zwischen den Infarktgrößen der einzelnen Gruppen im Durchschnitt und auch in der Streuung um den Mittelwert. Somit kann von einer guten Vergleichbarkeit der einzelnen Gruppen untereinander ausgegangen werden.

Die Tiere waren zum Zeitpunkt der hämodynamischen Messung, eine Woche nach Infarzierung alle etwa gleich schwer, so dass sich beim Körpergewicht keine signifikanten Unterschiede ergeben, ebenso zeigt der Gewichtsindex des linken Ventrikels in den einzelnen Gruppen kaum Unterschiede.

Anders als beim Gewichtsindex des linken Ventrikels zeigt sich eine signifikante Zunahme im Gewichtsindex des rechten Ventrikels der Gruppe 2 Stunden gegenüber Sham. Bei den anderen Gruppen sind keine wesentlichen Unterschiede zu erkennen.



**Tabelle 9:**

	Sham	Permanent	2 Stunden	3 Tage
<b>MI Größe (%)</b>	0 (n=13)	57±2 (n=9)	55±2 (n=10)	53±1 (n=10)
<b>BW (g)</b>	230±3	232±5	230±3	223±4
<b>LV/BW (mg/g)</b>	2.19±0.04	2.27±0.07	2.21±0.07	2.19±0.05
<b>RV/BW (mg/g)</b>	0.60±0.02	0.67±0.07	0.69±0.02*	0.61±0.02
<b>Lunge/BW (mg/g)</b>	7.26±0.44	10.50±1.1*	9.56±0.99*	10.08±1.00*

Die Messwerte sind als Mittelwert ± Standardfehler angegeben.

\*P<0.05 vs. Sham; † vs. Permanent; ‡ vs. 2 Stunden Reperfusion.

Das Lungengewicht in Bezug auf das Körpergewicht stellt einen Parameter für die Herzinsuffizienz dar und ist in allen drei Gruppen signifikant höher als in der Sham- Gruppe. Tendenziell ist das Verhältnis Lungengewicht/Körpergewicht in der Permanentgruppe höher als in der 3 Tage-Gruppe, dieses wiederum höher als in der 2 Stunden-Gruppe.

### 3.1.2 Strukturelles Remodeling nach Myokardinfarkt und Reperfusion

Die Ergebnisse der morphologischen Untersuchung der linken Ventrikel sind in Tabelle 10 zusammengefasst. Es wurden die Mittelwerte der Narben-, bzw. der Myokardwanddicke (Wanddicke), der Herzscheidewand (Septumdicke), der

Fläche des linksventrikulären Hohlvolumens (LV Hohlvolumen), sowie der Fläche des gesamten linken Ventrikels (LV Gesamtfläche) bestimmt. Durch Division des Quotienten aus linksventrikulärer Hohlfläche und linksventrikulärer Gesamtfläche mit dem Quotienten aus Wanddicke und Septumdicke ergibt sich der Infarktausdehnungsindex (MI Ausdehnungsindex)

**Tabelle 10**

	Sham	Permanent	2 Stunden	3 Tage
<b>Wanddicke (mm)</b>	1.80±0.11	1.33±0.19*	1.61±0.15	1.22±0.11*
<b>Septumdicke (mm)</b>	2.40±0.15	2.78±0.34	2.23±0.18	2.76±0.12
<b>LV Hohlfläche (mm<sup>2</sup>)</b>	9.4±0.9	14.2±1.9*	11.7±1.0	11.8±1.4
<b>LV Gesamtfläche (mm<sup>2</sup>)</b>	47.5±1.1	54.3±2.4*	48.2±2.4†	48.4±1.5†
<b>MI Ausdehnungsindex</b>	0.3±0.0	0.5±0.1*	0.4±0.1	0.6±0.1*‡

Die Messwerte sind als Mittelwert ± Standardfehler angegeben.  
 \*P<0.05 vs. Sham; † vs. Permanent; ‡ vs. 2 Stunden Reperfusion.

Es zeigt sich in beiden Gruppen Permanent und 3 Tage eine signifikante Abnahme der Myokard- bzw. Narbendicke gegenüber Sham- operierten Tieren. Die nach zwei Stunden reperfundierten Tiere weisen eine Tendenz zu einer dickeren Narbe gegenüber den anderen Infarkttieren auf, zeigen aber eine deutliche Abnahme der

Myokarddicke gegenüber der Shamgruppe. Bei der Dicke des Septums zeigt sich, dass eine permanente Okklusion und eine späte Reperfusion des Myokards eine Zunahme der Dicke der Herzscheidewand im Vergleich zu Sham-Tieren bewirkt. Diese Tendenz lässt sich bei einer frühen Reperfusion nicht nachweisen. Das linksventrikuläre Hohlvolumen steigt bei der permanent infarzierten Gruppe signifikant an und erhöht sich in den beiden Reperfusiongruppen gegenüber der Kontrollgruppe. Es zeigt sich aber, dass Tiere mit reperfundiertem Herzen eine deutlich geringere Zunahme des Hohlvolumens hatten, als Tiere der Permanentgruppe.

In der ersten Woche nach Myokardinfarkt zeigt sich eine signifikante Vergrößerung des linksventrikulären Gesamtvolumens bei der Permanentgruppe gegenüber Sham. Eine Reperfusion nach zwei Stunden, ebenso nach drei Tagen bewirkt eine signifikante Verringerung des Gesamtvolumens des linken Ventrikels gegenüber nicht reperfundierten Tieren und hat nur eine leichte Zunahme gegenüber den Kontrolltieren zur Folge. Bei dem Infarktausdehnungsindex zeigt sich eine signifikante Zunahme bei den permanenten Infarkten, sowie bei einer Reperfusion nach drei Tagen gegenüber der Kontrollgruppe. Darüber hinaus ist die Infarktausdehnung nach drei Tagen Reperfusion signifikant höher als nach zwei Stunden.

### **3.1.3 Hämodynamische Veränderungen nach Myokardinfarkt**

Im Folgenden sollen die Ergebnisse der Hämodynamik in Tabelle 11 vorgestellt werden. In den Messungen wurde an Druckparametern der linksventrikuläre systolische Druck (LVSP), der linksventrikuläre enddiastolische Druck (LVEDP) und der Vorhofdruck des rechten Ventrikels (RAP) ermittelt. Weiterhin wurde die Herzfrequenz (HR) aufgezeichnet und die Geschwindigkeit der linksventrikulären Anspannung ( $dp/dt$ ) bestimmt. Der Herzminutenvolumenindex (CI) errechnet sich aus dem Herzminutenvolumen bezogen auf Körperoberfläche und Körpergewicht. Wird das Schlagvolumen in Bezug zum Körpergewicht gesetzt ergibt sich der Schlagvolumenindex (SVI).

**Tabelle 11**

<b>LVSP (mmHg)</b>	Sham	Permanent	2 Stunden	3Tage
	135±4	115±4*	124±6	120±6*
<b>LVEDP (mmHg)</b>	Sham	Permanent	2 Stunden	3Tage
	8.3±1.2	17.8±1.9*	13.6±1.4*	21.6±1.5*
<b>HR (min-1)</b>	Sham	Permanent	2 Stunden	3Tage
	343±7	345±13	363±9	356±13
<b>dP/dt<sub>max</sub> (mmHg/s x 10<sup>3</sup>)</b>	Sham	Permanent	2 Stunden	3Tage
	9.8±0.6	7.9±0.7*	8.8±0.6	8.2±0.6
<b>RAP (mmHg)</b>	Sham	Permanent	2 Stunden	3Tage
	1.1±0.2	2.4±0.3*	1.2±0.3	1.9±0.3
<b>CI (ml/kg)</b>	Sham	Permanent	2 Stunden	3Tage
	241±13	153±17*	198±11	168±12*
<b>SVI (ml/kg)</b>	Sham	Permanent	2 Stunden	3Tage
	0.71±0.05	0.45±0.04	0.55±0.03	0.47±0.03
<b>TPRI (ml/kg)</b>	Sham	Permanent	2 Stunden	3Tage
	0.49±0.04	0.69±0.07*	0.54±0.04	0.63±0.04

Die Messwerte sind als Mittelwert ± Standardfehler angegeben.

\*P<0.05 vs. Sham; † vs. Permanent; ‡ vs. 2 Stunden Reperfusion.

Zuletzt wurde der Index aus totalem peripherem Widerstand und Körpergewicht (TPRI) errechnet. Der linksventrikuläre systolische Druck als Parameter für die Nachlast (afterload) des Herzens zeigt bei den Gruppen Permanent und 3 Tage signifikant niedrigere Drücke als bei Sham. Man erkennt allerdings eine Tendenz zur besseren Druckentwicklung bei 2 Stunden Reperfusion gegenüber einer permanenten Gefäßokklusion. Diese Tendenz lässt sich auch bei einer Reperfusion nach 3 Tagen gegenüber Permanent nachweisen, allerdings liegt der Druck dennoch niedriger als bei der 2 Stunden Gruppe.

Eine ähnliche Konstellation wie bei der Nachlast erkennt man beim linksventrikulären enddiastolischen Druck. Alle drei Gruppen mit Infarkt weisen signifikant höhere Drucke auf, als die Sham-Tiere, wobei die Tiere mit 2 Stunden Reperfusion tendenziell niedrigere Werte zeigen und somit eine geringere Vorlast. Im Gegensatz zu den Druckverhältnissen lassen sich bei der Herzfrequenz keine signifikanten Unterschiede in den jeweiligen Gruppen erkennen. Bei der Geschwindigkeit der linksventrikulären Anspannung sieht man eine signifikante Verringerung der Druckentwicklung bei Permanent gegenüber Sham. Bei der Geschwindigkeit der linksventrikulären Anspannung sieht man eine signifikante Verringerung der Druckentwicklung bei Permanent gegenüber Sham. Erkennbar ist auch eine tendenzielle Verbesserung der Anspannungsgeschwindigkeit nach Reperfusion gegenüber Permanent, bei 2 Stunden mehr noch als bei 3 Tagen.

Der Druck im rechten Vorhof steigt nach permanentem Infarkt signifikant an. Allerdings ändert eine Reperfusion nach zwei Stunden nur wenig gegenüber Sham und auch bei Reperfusion nach 3 Tagen sind die Werte noch tendenziell niedriger als bei Permanent. Der Herzminutenvolumenindex ist in allen drei Infarktgruppen niedriger als in der Vergleichsgruppe, allerdings signifikant nur für Permanent und 3 Tage. Die 2 Stunden und 3 Tage Gruppen lassen aber einen tendenziell höheren Index erkennen als die Permanentgruppe, wobei auch hier die Werte der 3 Tagestiere zwischen denen der Gruppen Permanent und 2 Stunden liegen. Keine deutlichen Unterschiede sind beim Schlagvolumenindex zu erkennen, allerdings nimmt dieser in allen drei Infarktgruppen ab, am wenigsten in der 2 Stunden Gruppe. Der Index des totalen peripheren Widerstandes steigt nur nach

permanentem Herzinfarkt signifikant an. Die beiden Reperfusionen liegen mit ihren Werten zwischen Permanent und Sham.

### 3.1.4 Arbeitsvolumen

In Tabelle 12 sind die aus den Hämodynamikergebnissen errechneten Arbeitsvolumina dargestellt. Dabei wird einerseits das Arbeitsvolumen auf das Körpergewicht bezogen (Arbeitsvolumenindex), andererseits auf das Gewicht des linken Ventrikels (Arbeitsvolumen/LV Gewicht). Der Wandstress errechnet sich ebenfalls aus den Hämodynamikdaten. Bei näherer Betrachtung des Arbeitsvolumenindex fällt in allen drei Infarktgruppen ein signifikanter Anstieg gegenüber Sham an. Zudem bewirkt eine Reperfusion nach 2 Stunden eine signifikante Verringerung des Index gegenüber der Permanentgruppe, ebenso gegenüber einer Reperfusion nach 3 Tagen, die gegenüber Permanent keine Änderung ergibt.

**Tabelle 12**

	Sham	Permanent	2 Stunden	3 Tage
<b>Arbeitsvolumen- index (ml/kg)</b>	1.22±0.08	1.97±0.16*	1.66±0.07*†	1.97±0.09*‡
<b>Arbeitsvolumen/ LV- Gewicht (ml/g)</b>	0.56±0.04	0.94±0.07*	0.75±0.03*†	0.90±0.04*‡
<b>Wandstress</b>	11.96±1.88	28.42±4.34*	17.33±2.13*†	32.59±3.15*‡

Die Messwerte sind als Mittelwert ± Standardfehler angegeben.  
\*P<0.05 vs. Sham; † vs. Permanent; ‡ vs. 2 Stunden Reperfusion.

Das Verhältnis Arbeitsvolumen zum linksventrikulären Gewicht ist bei Tieren mit Infarkt signifikant erhöht gegenüber Sham Tieren. Eine Wiedereröffnung der Koronararterie nach zwei Stunden bewirkt eine signifikante Verbesserung des Arbeitsvolumens bezogen auf das linksventrikuläre Gewicht gegenüber Permanent und Reperfusion nach 3 Tagen. Die späte Reperfusion zeigt keinen deutlichen Vorteil gegenüber der Permanentgruppe. Der Wandstress ist bei allen drei Infarktgruppen signifikant höher, als bei der Kontrollgruppe. Auch eine Reperfusion nach zwei Stunden ergibt einen signifikanten Vorteil gegenüber Permanent, allerdings zeigt eine späte Reperfusion keinen Vorteil gegenüber der Permanent-Gruppe.

### 3.1.5 Passiv Volumenkurve

In der nächsten Tabelle 13 wird auf die Druckbelastung des linken Ventrikels eingegangen, die durch die passive Druck-Volumen-Beziehung ausgedrückt wird.

**Tabelle 13**

	Sham	Permanent	2 Stunden	3 Tage
<b>0 mmHg</b>	0.204±0.032	0.449±0.118*	0.241±0.036†	0.291±0.080
<b>2.5 mmHg</b>	0.596±0.062	1.059±0.141*	0.712±0.050†	0.895±0.154*
<b>5 mmHg</b>	0.895±0.067	1.411±0.153*	1.107±0.064	1.304±0.157*
<b>10 mmHg</b>	1.245±0.064	1.751±0.153*	1.553±0.066*	1.752±0.150*
<b>15 mmHg</b>	1.442±0.062	1.943±0.152*	1.773±0.069*	1.980±0.148*
<b>20 mmHg</b>	1.573±0.060	2.077±0.155*	1.906±0.070*	2.125±0.149*
<b>30 mmHg</b>	1.731±0.057	2.255±0.169*	2.071±0.070*	2.315±0.153*

Die Messwerte sind als Mittelwert ± Standardfehler angegeben.

\*P<0.05 vs. Sham; † vs. Permanent; ‡ vs. 2 Stunden Reperfusion.

Wiedergegeben sind die linksventrikulären Füllungsvolumina der Druck-Volumen-Kurve, die zum Erreichen der einzelnen Druckabschnitte nötig sind. Hierbei wird das Volumen (in ml) bezogen auf ein Kilogramm Körpergewicht bei einer Druckbelastung von 0 bis maximal 30 mmHg .

Bei 0 mmHg erkennt man eine signifikante Zunahme des Volumens bei Permanent gegenüber Sham und bei 2 Stunden gegenüber Permanent. Ähnliches gilt bei 2.5 mmHg, wobei sich hier noch ein signifikanter Unterschied zwischen Sham und 3 Tagen ergibt. Tendenziell zeigt sich aber noch eine Verbesserung von 3 Tagen und noch deutlicher von 2 Stunden gegenüber Permanent. Bei 5 mmHg liegen die Werte von Permanent und Spätreperfusion signifikant höher als die der Kontrollgruppe, wobei auch hier die 2 Stunden Gruppe eine niedrigere Tendenz als 3 Tage und noch deutlicher als Permanent zeigt. Bei Druckwerten von 10-30 mmHg zeigt sich immer das gleiche Bild: Es finden sich signifikant höhere Werte in den Infarktgruppen gegenüber den scheinoperierten Tieren, wobei Tiere mit Reperfusion nach 2 Stunden mit ihren Werten näher an den Sham-Tieren liegen, als die 3 Tage-Gruppe.

### **3.2 Biochemische Ergebnisse und Regressionsanalyse**

Bei dieser Arbeit war von besonderem Interesse, wie Reperfusion nach Myokardinfarkt den Prozess des Remodelings auf molekularer Ebene beeinflusst. Hierfür wurde die Proteinexpression und die Verteilung der Extrazellulärmatrix, der Matrixmetalloproteinasen (MMPs) und der Inhibitoren der MMPs, den TIMPs untersucht. Hierfür wurde das Restmyokard des linken Ventrikels in der weiter oben beschriebenen Weise zu zwei Fraktionen aufbereitet, der löslichen, welche zytoplasmatische und lösliche Membranproteine enthält und der Fraktion des Zytoskeletts, welche unlösliche Zytoskelett- und Membranproteine enthält.

Auf den weiter unten zu sehenden Abbildungen ist die statistische Auswertung der Proteincharakterisierung in Balkendiagrammen, sowie Abbildungen der Originalbanden zu sehen. Des Weiteren sind die Graphen der Regressionsanalysen abgebildet, die Korrelationen von biochemischen



Veränderungen auf hämodynamische Messwerte zeigen. In den Balkendiagrammen ist auf der Ordinate die Menge des jeweiligen Proteins angegeben, welche sich aus den Graustufen der Originalbanden errechnet. Dabei bedeutet die Farbe weiß auf den Banden im Bild unter dem Diagramm, dass kein Signal zu detektieren ist und entspricht im Balkendiagramm der Nulllinie. Die Absolutzahl der Proteinmenge ergibt sich aus der Anzahl von Pixel (Signale) auf einer definierten Fläche. In den Diagrammen der Regressionsanalysen wird dargestellt, ob sich Korrelationen zwischen den biochemischen und den hämodynamischen Ergebnissen zeigen. Auf der Ordinate sind die Absolutzahlen der jeweiligen Proteinmengen abgebildet, auf der Abszisse die Skalen der jeweiligen Einheiten der Hämodynamik. Eine positive statistisch signifikante Korrelation ergibt sich, wenn der Anstieg eines Proteins mit dem Anstieg eines hämodynamischen Parameters einhergeht.

### **3.2.1 Ergebnisse für Timp-1**

Die Untersuchung von Timp-1 und Timp-2 zeigt (Abbildung 3), dass beide Proteine im Myokard exprimiert werden, vornehmlich in der löslichen Fraktion. Weiterhin ist festzustellen, dass es zu einer signifikanten Reduktion von Timp-1 in allen Infarktgruppen kommt, während bei Timp-2 (Daten nicht gezeigt) keine Veränderungen festzustellen sind. Um zu testen, ob es Beziehungen zwischen den hämodynamischen und morphologischen Veränderungen gibt, wurden Regressionsanalysen mit dem Arbeitsvolumen, dem linksventrikulären enddiastolischen Druck (LVEDP) und dem linksventrikulären systolischen Druck (LVSP) durchgeführt. Es zeigte sich für LVSP eine positive statistisch signifikante Korrelation, nicht jedoch für das Arbeitsvolumen und den LVEDP. Für diese beiden Parameter zeigten sich negative Korrelationen. Dies legt nahe, dass Timp-1 eine mögliche Rolle im Prozess des frühen Remodeling des linken Ventrikels spielt.

Abbildung 3

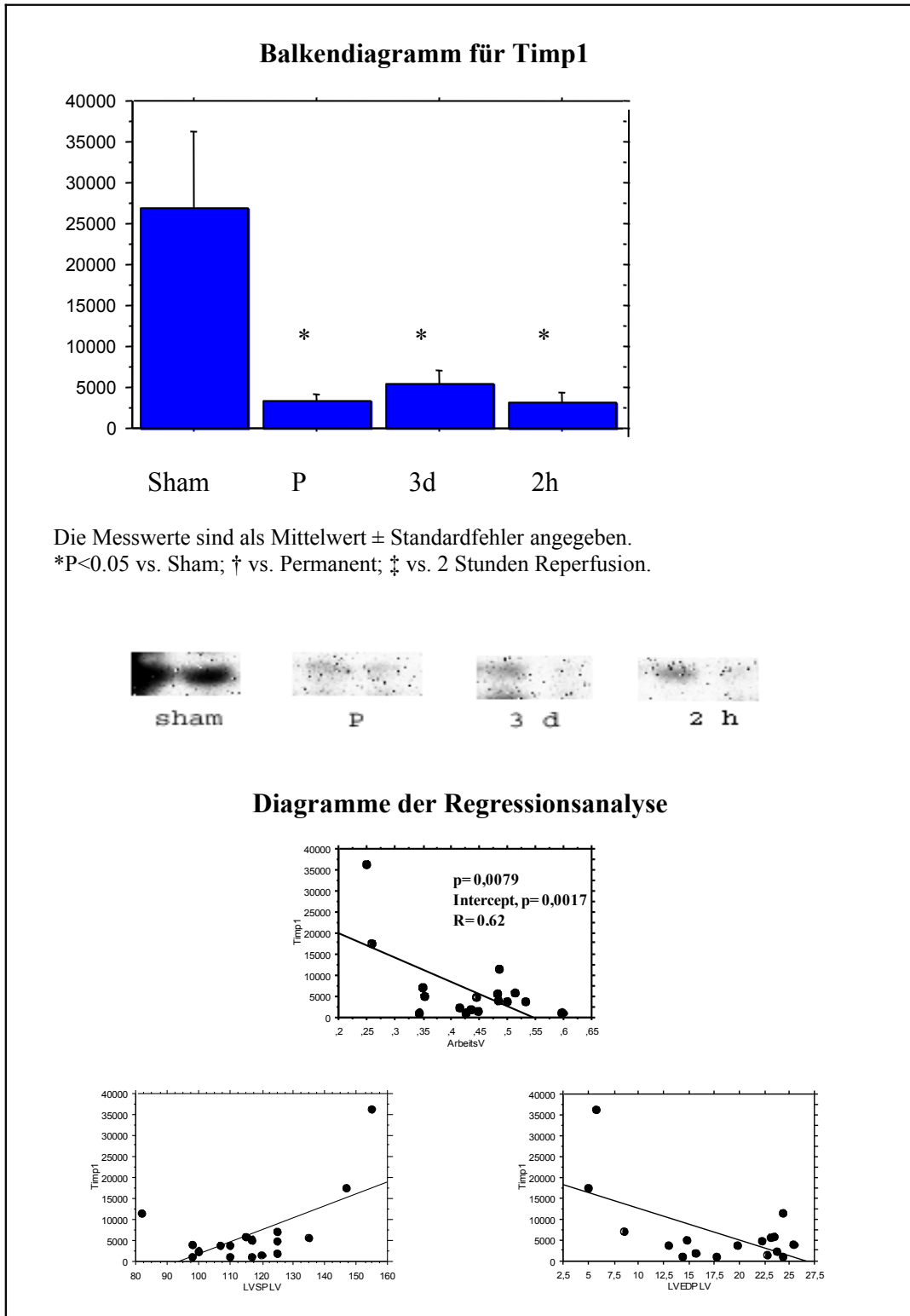


Abbildung 3: Ergebnisse von Timp-1 als Balkendiagramm mit Abbildung der Western blot-Banden und Diagramme der Regressionsanalysen.

### 3.2.2 Ergebnisse für MMP-1 im Pellet

Abbildung 4a

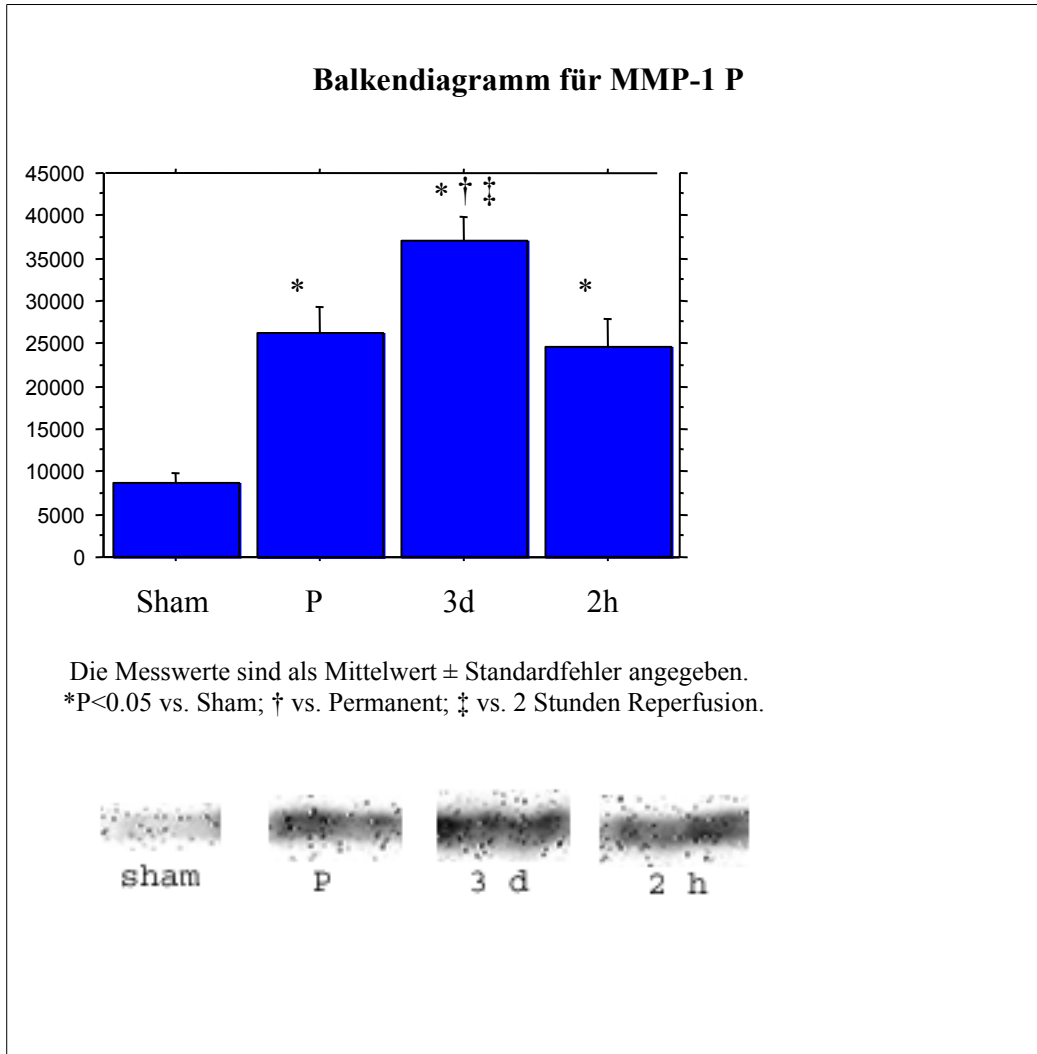


Abbildung 4a: Ergebnisse von MMP-1 als Balkendiagramm mit Abbildung der Westernblot-Banden.

Wie bereits weiter oben beschrieben wurden die Matrixmetalloproteinasen (MMP-1, -2, -9 und -13) untersucht. Abbildung 4a und 4b zeigt, dass es nach 3 Tagen Reperfusion zu einem signifikant höheren Anstieg von MMP-1 im Pellet kommt, als bei Permanent, bzw. bei einer Reperfusion nach 2 Stunden. Die auch hier durchgeführten Regressionsanalysen für Arbeitsvolumen (AV),

Infarktausdehnungsindex (EI) und LVEDP zeigen für alle drei Parameter statistisch signifikante positive Korrelationen mit dem Anstieg an MMP-1.

**Abbildung 4b**

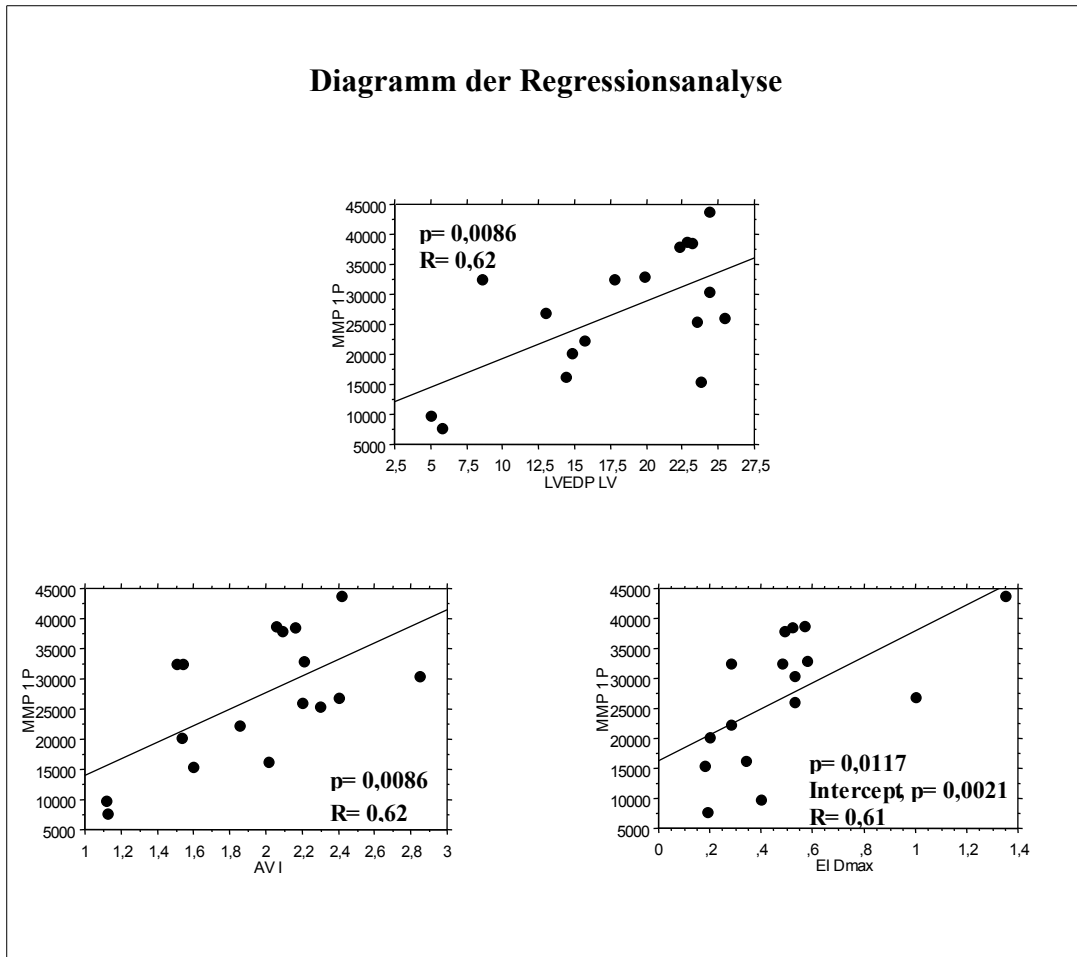


Abbildung 4b: Diagramme der Regressionsanalysen von MMP-1.

### 3.2.3 Ergebnisse für MMP-1 in Lösung:

In den untenstehenden Abbildungen 5a und 5b sind die Ergebnisse der biochemischen Versuche mit MMP-1 aus der löslichen Fraktion, sowie der Regressionsanalyse mit den hämodynamischen Daten zu sehen. Der lösliche Teil von MMP-1 verhält sich ähnlich wie der eben beschriebene unlösliche Teil des Pellets und zeigt eine deutliche Proteinzunahme in allen drei Infarktgruppen gegenüber Sham.

Abbildung 5a

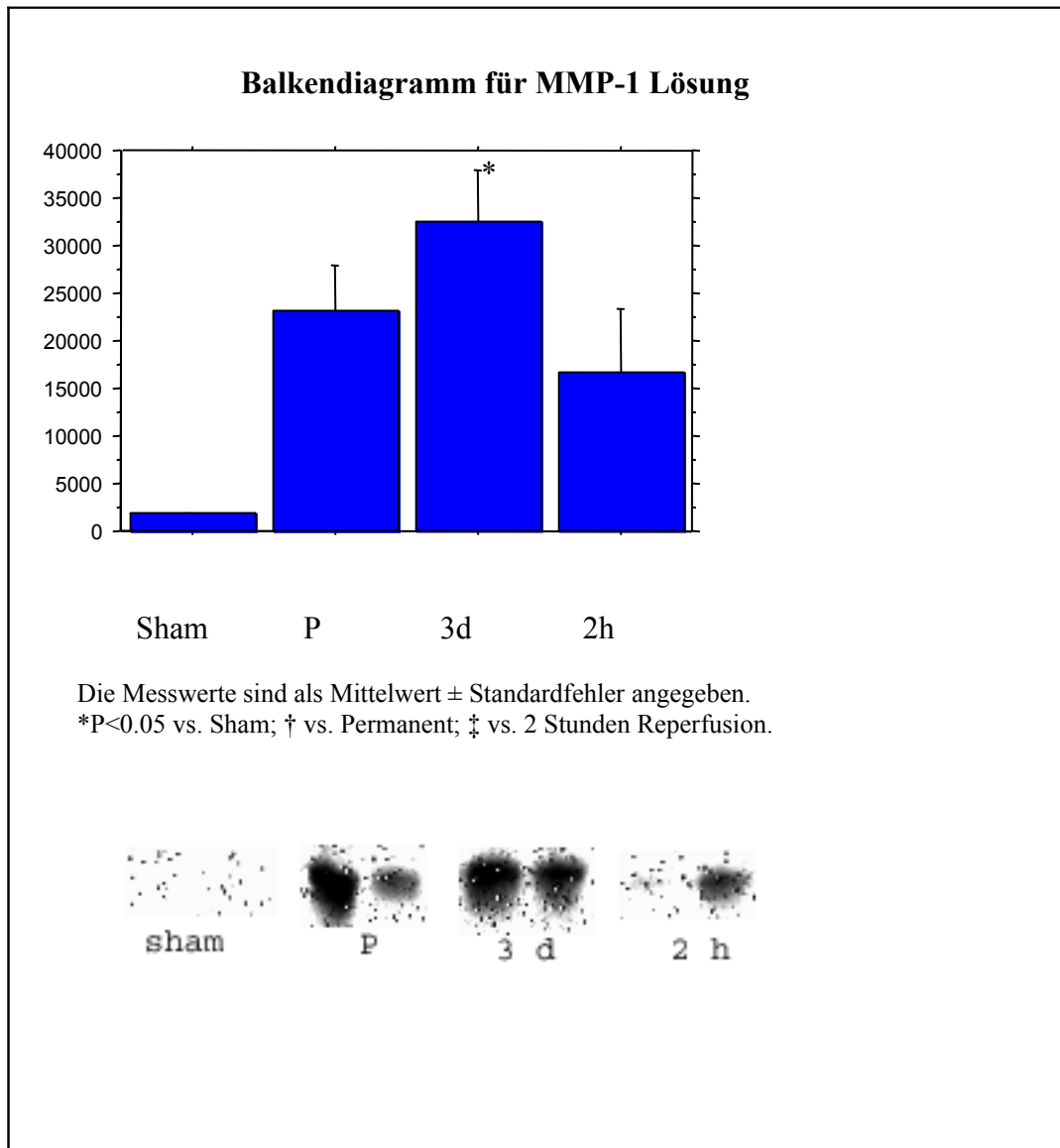


Abbildung 5a: Ergebnisse von MMP-1 als Balkendiagramm mit Abbildung der Westernblot-Banden.

Signifikant ist dieser Anstieg allerdings nur für die Reperfusion nach drei Tagen. Aber auch hier ist eine deutlich vermehrte Produktion des Proteins nach drei Tagen Reperfusion im Vergleich zu den anderen beiden Infarktgruppen zu erkennen. Auch in der Regressionsanalyse zeigen sich die Ergebnisse in der löslichen Fraktion ähnlich, wie im Pellet. Auch hier korrelieren LVEDP, EI Dmax und Arbeitsvolumen statistisch signifikant mit einem Anstieg an MMP-1.

Abbildung 5b

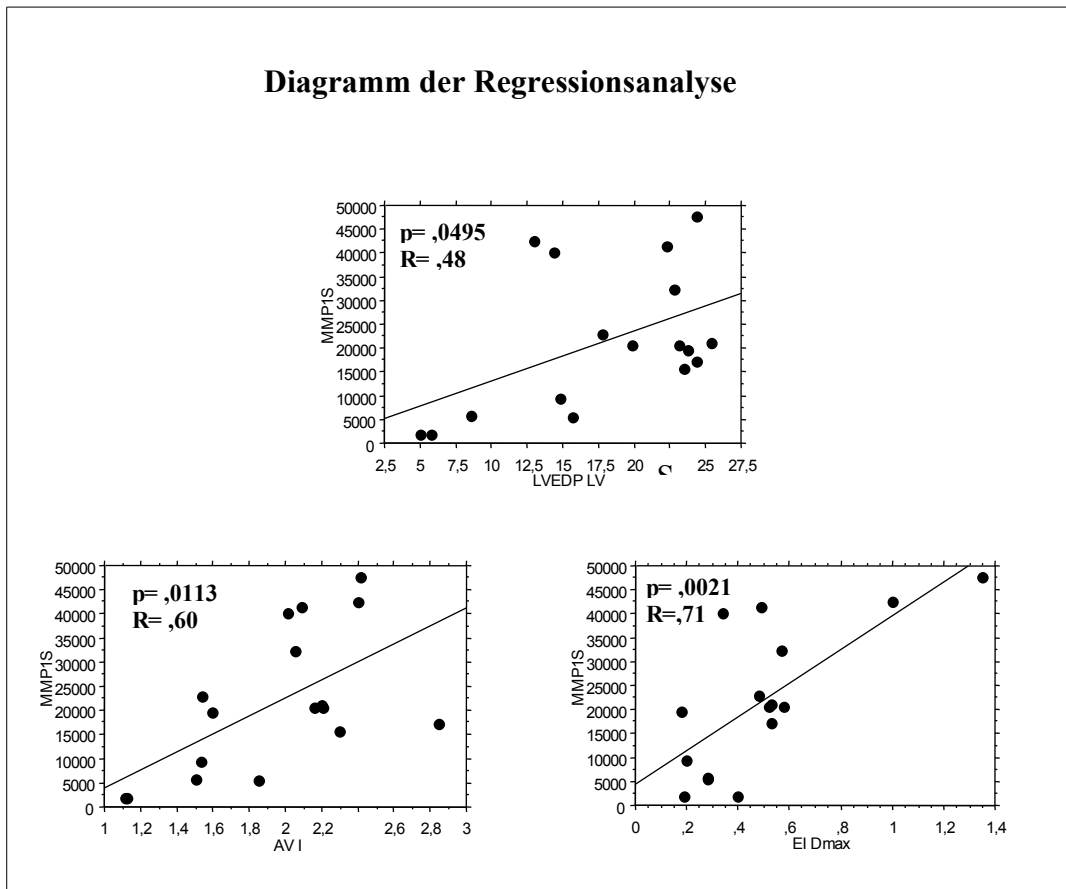


Abbildung 5b: Diagramme der Regressionsanalysen von MMP-1.

### 3.2.4 Ergebnisse MMP-2 im Pellet

Die Abbildung 6 zeigt auch bei der Protease MMP-2 einen deutlichen Anstieg in den drei Infarktgruppen gegenüber Sham, der nur bei einem permanenten Infarkt statistisch signifikant ist. Diese erhöhte Expression korreliert mit einem erhöhten Arbeitsvolumen.

Abbildung6

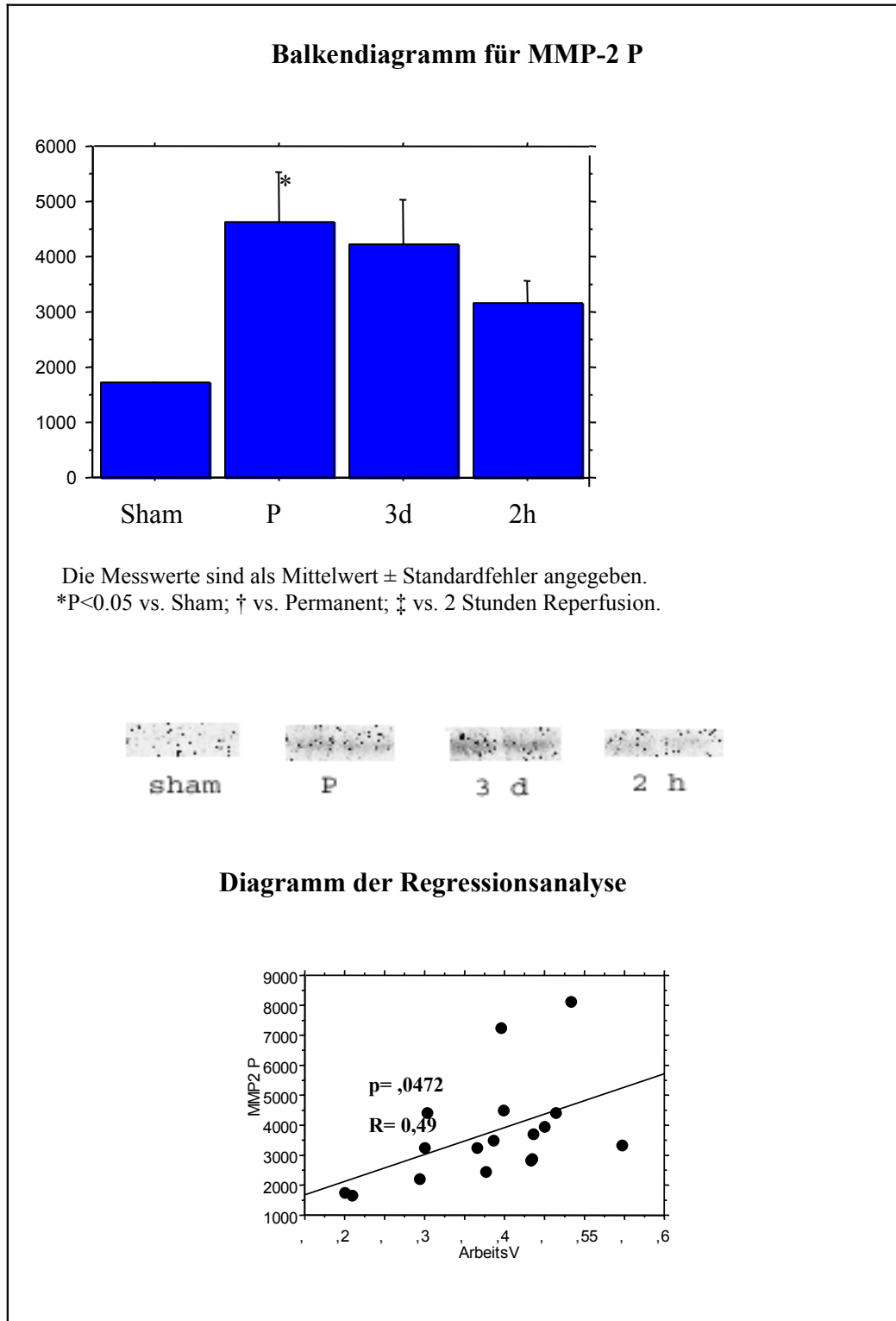


Abbildung 6: Ergebnisse von MMP-2 als Balkendiagramm mit Abbildung der Westernblot-Banden und Diagramm der Regressionsanalyse.

### 3.2.5 Ergebnisse von Fibronectin im Pellet

Fibronectin ist ein Substrat vieler MMPs und wird nach einem Infarkt hochreguliert. Auf den Abbildungen 7a und 7b ist zu sehen, dass es eine Woche nach Infarkt zu einem Anstieg an Fibronectin gegenüber der Vergleichsgruppe

Abbildung 7a

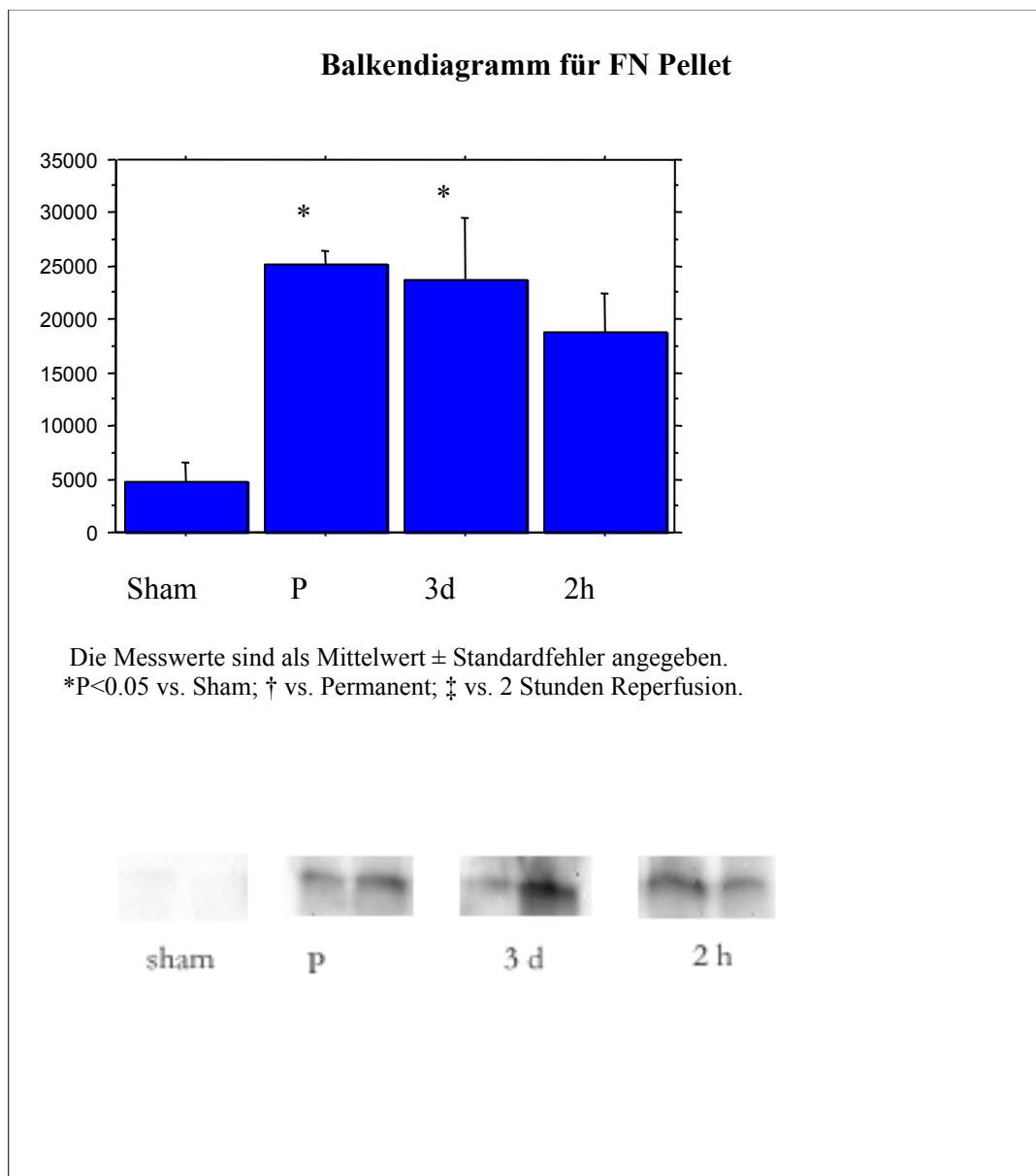


Abbildung 7a: Ergebnisse von FN als Balkendiagramm mit Abbildung der Westernblot-Banden.



kommt, wobei nur für die Permanentgruppe und für die Reperfusion die Zunahme signifikant ist.

**Abbildung 7b**

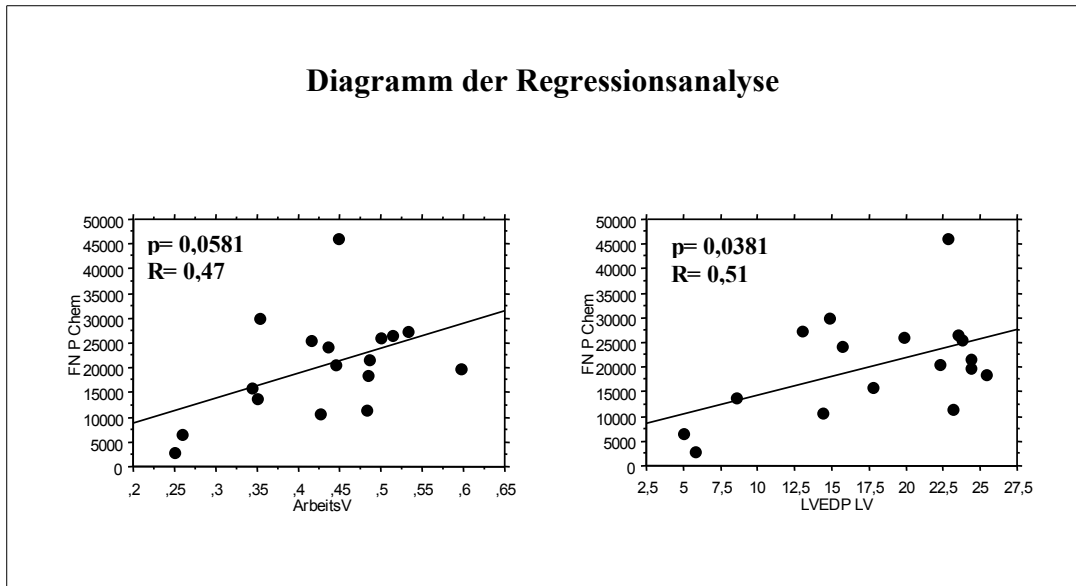


Abbildung 7b: Diagramme der Regressionsanalysen von FN.

Bei genauerer Betrachtung zeigt sich, dass eine Reperfusion nach zwei Stunden einen niedrigeren Anstieg an Fibronectin nach sich zieht, als ein permanenter Infarkt. Die Menge bei einer Rekanalisation nach drei Tagen liegt genau zwischen den beiden anderen Infarktgruppen. In der Regressionsanalyse, durchgeführt mit dem Arbeitsvolumen und dem LVEDP zeigt sich eine positive Korrelation zwischen dem Anstieg an Fibronectin und einer Erhöhung der beiden genannten Parameter.

### 3.3. Ergebnisse der Immunlokalisation von MMP-2, FN, Collagen -1 und -3

In dem folgenden Absatz sollen die Ergebnisse der Immunlokalisation vorgestellt werden. Die Analyse von MMP-2, FN, Collagen -1 und -3 wurde mittels Fluoreszenzmikroskop an Kryoschnitten des nichtinfarzierten Restmyokards durchgeführt, aus der selben Region des linken Ventrikels, aus der Gewebe für die

Western Blots gewonnen wurde. Vorteil dieser Methode ist, dass die Expression einzelner Proteine nicht nur quantitativ erfasst werden kann, sondern auch deren Lokalisation. Auf der unten stehenden Abbildung 8 ist die Expression von MMP-2 (grüne Farbe) in den jeweiligen Gruppen zu sehen.

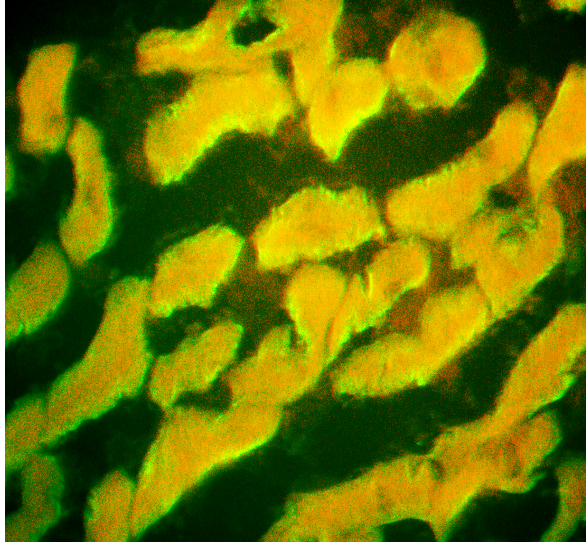
**Abbildung 8: MMP-2 Expression im linksventrikulären Restmyokard eine Woche nach Infarkt.**



Abbildung 8: Restmyokard der Sham-Gruppe nach enzymhistochemischer Färbung zur Beurteilung der Expression von MMP-2 eine Woche nach Infarkt.

### **Permanent**

Grüne Farbe: MMP-2, rote Farbe: Aktin



### **3 Tage Reperfusion**

Grüne Farbe: MMP-2, rote Farbe: Aktin

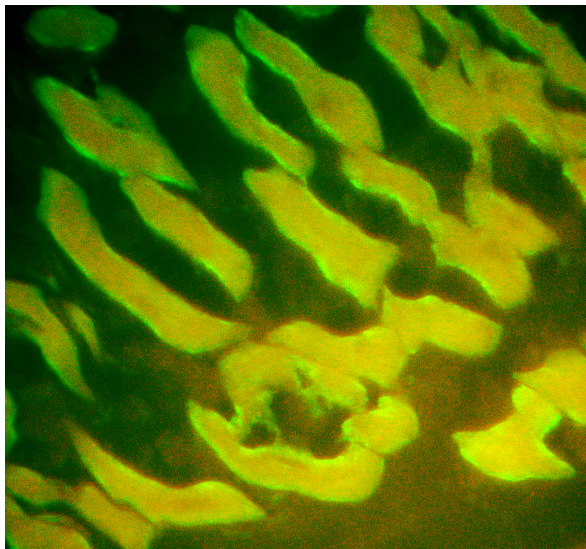


Abbildung 8: Restmyokard der Permanent- und 3 Tage-Gruppe nach enzymhistochemischer Färbung zur Beurteilung der Expression von MMP-2 eine Woche nach Infarkt.

## 2 Stunden Reperfusion

Grüne Farbe: MMP-2, rote Farbe: Aktin

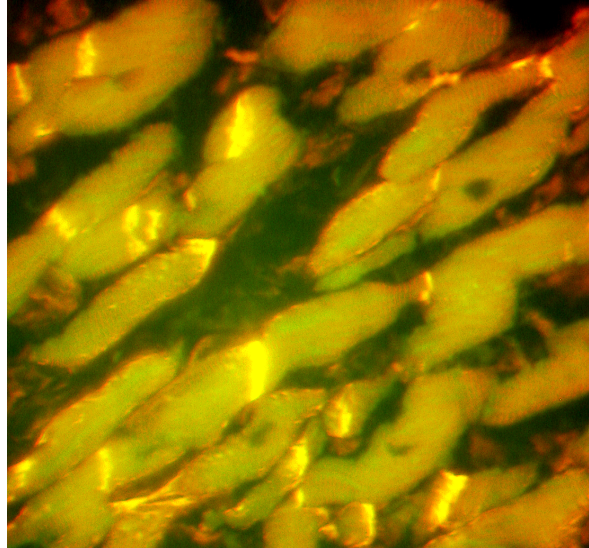


Abbildung 8: Restmyokard der 2 Stunden Reperfusionsgruppe nach enzymhistochemischer Färbung zur Beurteilung der Expression von MMP-2 eine Woche nach Infarkt.

Dabei zeigt sich eine nur schwache Expression von MMP-2 im Zytoplasma, das nicht in der Nähe der Actin-Myofilamente oder der Plasmamembran lokalisiert ist. Andererseits findet sich bei 3-Tage Reperfusion und bei Permanent-Infarkt eine feste Assoziation mit der Plasmamembran der Kardiomyozyten, also einer Neuverteilung innerhalb der Zelle. Da alle Proteine der Extrazellulärmatrix auf der Plasmamembran der Kardiomyozyten angeordnet sind, ist eine Interaktion der MMPs, im besonderen Fall des MMP-2 klar zu erkennen. Da allerdings, wie eben gezeigt, MMP-2 bei einer Reperfusion nach zwei Stunden nicht an der Membranoberfläche sichtbar ist, ist dieser Unterschied möglicherweise die Ursache für ein geringeres Remodeling. Diese Abweichung könnte die signifikant niedrigere Infarktausdehnung und die geringere Fläche des linken Ventrikels nach

einer Reperfusion 2 Stunden nach Infarkt erklären, sowie weitere günstige Auswirkungen der koronaren Rekanalisation.

#### **4. Diskussion**

Der positive Effekt einer Reperfusion nach Myokardinfarkt auf Hämodynamik, Remodeling und Mortalität ist seit langem bekannt. Ziel dieser Arbeit war darzulegen, dass eine Reperfusion drei Tage nach Myokardinfarkt immer noch einen positiven Effekt bietet. Als das Hauptergebnis dieser Studie können wir zeigen, dass Reperfusion auch nach drei Tagen einen positiven Effekt auf das Remodeling hat, was sich in einer verglichen mit nichtreperfundierten Herzen signifikant niedrigeren Dilatation des linken Ventrikels feststellen lässt. Nach unserem Wissen ist dies die erste Studie, in der das Zeitfenster zwischen Infarkt und Reperfusion bis auf drei Tage ausgedehnt wurde. Der gedankliche Hintergrund hierfür reifte aus der klinischen Erfahrung mit Patienten, die sich sehr spät nach einem akuten Myokardinfarkt vorstellen. Gemäß den Richtlinien über die Behandlung des akuten Myokardinfarktes [55] ist hier keine Revaskularisation vorgesehen, außer bei fortbestehender Ischämie. In der klinischen Praxis erhalten Patienten mit stummen, bzw. subakuten Myokardinfarkten, entgegen den Richtlinien, dennoch eine Herzkatheteruntersuchung mit Revaskularisation des okkludierten Gefäßes. Es zeigte sich nämlich, dass eine Katheteruntersuchung mit Intervention auch jenseits der ersten 12 Stunden kein erhöhtes Risiko darstellt [29, 32] und die Patienten auf Grund der besseren Narbenheilung, des besseren Remodelings, sowie besserer Spätergebnisse [56] von einer späten Reperfusion profitieren.

Um eine valide Aussage bezüglich der Effekte der späten Reperfusion nach drei Tagen treffen zu können wurden in dieser Studie zusätzlich drei weitere Gruppen (Permanent, 2 Stunden und Sham) untersucht. Dadurch ist es möglich Vergleiche mit bereits veröffentlichten Ergebnissen anderer Gruppen anzustellen, die mit dem selben Tiermodell gearbeitet haben [33, 34, 57, 58].

#### **4.1. Auswirkungen einer späten Reperfusion auf Hämodynamik und Morphologie**

Im ersten Teil dieser Studie richtete sich unser Augenmerk auf die Veränderungen in Hämodynamik und Morphologie die nach Myokardinfarkt auftreten. Hierzu wurden nur Tiere mit großen Infarkten ausgewählt um eine Vergleichbarkeit innerhalb der jeweiligen Gruppen zu erreichen. Aus früheren Studien am Rattenmodell ist bekannt, dass bei einer myokardialen Ischämiezeit von mehr als einer Stunde eine Reperfusion nach dieser Zeit keinen Einfluss mehr auf die Infarktgröße hat. Somit ist davon auszugehen, dass die Revaskularisation nach zwei Stunden keine direkte Rettung von Muskelmasse mit sich bringt. Dieser Umstand erlaubt eine genaue Untersuchung der Remodelingvorgänge nach einer späten Reperfusion. Wie bereits erwähnt ist das linksventrikuläre Remodeling nach Myokardinfarkt detailliert von verschiedenen Arbeitsgruppen beschrieben worden [33, 59]. Auch der pharmakologische Einfluss auf diesen Prozess ist in mehreren Arbeiten, u.a. von unserer Arbeitsgruppe, untersucht worden [60-63].

So zeigen sich an morphologischen Veränderung eine Woche nach Myokardinfarkt mit einer Reperfusion nach zwei Stunden vergleichbare Ergebnisse zu bereits vorbeschriebenen Arbeiten [34, 57, 58]. Wie auch bei Boyle et. al. zeigte sich keine Reduktion der Infarktgröße bei 2 Stunden, sowie bei drei Tagen, da das Infarktgeschehen bei der Ratte bereits nach einer Stunde abgeschlossen ist. Allerdings zeigte sich in der sehr frühen Zeit nach dem Infarkt eine Tendenz zum verbesserten ventrikulären Remodeling, was sich durch ein niedrigeres Gewicht des rechten Ventrikels (RV/BW) und niedrigere Lungengewichte festmachen lässt. Ein weiteres Zeichen, das für den Vorteil einer Wiedereröffnung der betroffenen Gefäße spricht, ist eine signifikant niedrigere Gesamtfläche, sowie einer niedrigeren Hohlfläche des linken Ventrikels. In der kurzen Beobachtungszeit von einer Woche nach MI zeigte sich allerdings, dass durch die Reperfusion nach drei Tagen auch Verschlechterungen festzustellen sind, wie eine geringere Wanddicke und ein höherer MI-Ausdehnungsindex. Die wenigen signifikanten Ergebnisse in der Morphologie erklären sich aus dem

kurzen Beobachtungszeitraum, da eine Woche nach Infarkt die Umbauprozesse am Myokard erst am Anfang stehen. Während sich eine Reperfusion nach 2 Stunden auf alle hämodynamischen Parameter günstig auswirkt, verbessert die Behandlung nach drei Tagen diese nur teilweise (LVSP, dp/dt, RAP, CI und TPRI). Auf andere Werte (LVEDP, Wandstress) wirkt es sich zunächst negativ aus. Die Ergebnisse der passiven Volumenkurve stellen sich in gleicher Weise dar und bieten keine signifikanten Verbesserungen im Vergleich mit einer permanenten Gefäßokklusion. Zusammenfassend kann man sagen, dass eine Spätreperfusion, untersucht eine Woche nach dem Akutereignis, zunächst eine Verschlechterung morphologischer und hämodynamischer Parameter mit sich bringt. Ebenso kommt es zu einem Anstieg molekularbiologischer Marker (FN), die in dieser Phase eher als ungünstig einzustufen sind. Der Verdacht liegt nahe, dass sich dies ungünstig auf das Remodeling auswirkt.

Klinische Studien unterstreichen den zunächst schädlich erscheinenden Effekt einer sehr späten Reperfusion [64]. Diese Ergebnisse (Daten nicht gezeigt) konnten in einer von unserer Arbeitsgruppe parallel durchgeführten Studie bestätigt werden. Hier wurden die Tiere bei gleichem Studiendesign erst nach 12 Wochen untersucht. Es stellte sich heraus, dass trotz der Verschlechterung in der Frühphase die Tiere mit 3 Tagen Reperfusion ähnlich positive Effekte zeigten, wie die 2 Stunden Tiere, wobei es zu keinem Anstieg der Mortalität kam. Diese schädlichen Effekte in der Frühphase lassen sich am ehesten auf einen Reperfusionsschaden zurückführen, der mit einem Anstieg der Expression und Aktivität von MMPs zusammenhängt [65-68].

Nach einer Beobachtungszeit von 12 Wochen sind die meisten der negativen Effekte einer Spätreperfusion kaum mehr vorhanden und die Werte entsprechen eher denen einer Behandlung nach zwei Stunden, allen voran der Infarktexpansionsindex. Dieser Index ist ein bedeutender Marker des chronischen linksventrikulären Remodeling [34, 57] und korreliert eng mit einem Anstieg der Überlebenswahrscheinlichkeit [69]. Diese Daten und die bereits weiter oben ausgeführten Vorteile unterstreichen die Hypothese des positiven Effektes einer verspäteten Reperfusion auf das chronische Remodeling nach Myokardinfarkt.

Dies legt nahe, das bislang übliche Zeitfenster für die Wiedereröffnung der betroffenen Koronararterie in der klinischen Praxis auszudehnen.

#### **4.2. Biochemische Veränderungen und ihre Bedeutung**

Der zweite Teil dieser Studie konzentriert sich auf die biochemischen Veränderungen, die eine Woche nach Infarkt auftreten. Unser Augenmerk richtete sich auf die Expression von Proteinen der Extrazellulärmatrix, die nachweislich entscheidenden Einfluss auf das linksventrikuläre Remodeling besitzen [70]. In dieser frühen Phase werden möglicherweise Mechanismen in Gang gesetzt, die später zum Remodeling führen und eventuell auch noch durch eine späte Reperfusion günstig beeinflusst werden können. Ähnliche Untersuchungen sind bereits von anderen Arbeitsgruppen durchgeführt worden [65, 71, 72]. Carlyle et al. [48] zeigt in einer Studie, dass es bis 7 Tage nach Myokardinfarkt zu einem Anstieg der Aktivität an MMP-1, -2, und -9 kommt, sowie zu einer verstärkten Expression an Fibronectin. Es zeigte sich aber auch der positive Effekt einer Reperfusion nach 150 min. wonach es zu einer Reduktion der eben genannten Proteine gekommen ist. Weitere Arbeiten kommen ebenfalls zu dem Schluss, dass es nach einem Infarkt zu einem signifikanten Anstieg der Aktivität der MMPs bei gleichzeitiger Downregulation ihrer Inhibitoren (TIMPs) kommt [42] und zwar nicht nur in der Narbenregion, sondern auch im nicht infarzierten Restmyokard. Welchen Einfluss die späte Reperfusion auf diesen Teil des Herzmuskels hat, wo es zur Hypertrophie und zum Remodeling kommt, ist bisher noch wenig verstanden und es existieren nur wenige Daten, die sich mit diesem Thema befassen. Verstanden ist mittlerweile dass die Expression und Aktivität der MMPs eng mit Veränderungen am Herzen korrelieren. Dies konnte an Knockout-Mäusen gezeigt werden, bei denen die MMP-Gene ausgeschaltet wurden. Durch diese Arbeiten wurde klar, dass die Matrixproteinasen mitbeteiligt sind an der Hypertrophie und Dilatation des Herzens und der Entwicklung einer Herzinsuffizienz [65, 73, 74].



Wie im Ergebnisteil gezeigt ergeben sich aus einer Reperfusion keine nennenswerten Änderungen am Expressionslevel von TIMP-1 und TIMP-2 nach Myokardinfarkt. Es zeigte sich, wie auch Romanic et al [70] in seiner Arbeit feststellt eine starke, signifikante Downregulation von TIMP-1 in allen Gruppen gegenüber Sham, die Unterschiede der Infarktgruppen untereinander sind aber nur marginal. TIMP-2 hingegen lässt in dieser frühen Phase nach einem Infarkt keine eindeutige Richtung erkennen. Dies wirft die Frage auf, wie sich diese Veränderungen auf die Umbauprozesse des Herzens auswirken. Auch wenn Reperfusion keine Unterschiede in den einzelnen Gruppen bringt, scheint die Expression von TIMP-1 und TIMP-2 einer zeitlichen Regulation zu unterliegen und eine wichtige Rolle im Hinblick auf das Remodeling im Restmyokard des linken Ventrikels zu spielen. Diese Vermutung wird dadurch unterstützt, dass TIMP-1 einer starken Regulierung in der ersten Woche nach Infarkt unterliegt und somit wohl für Prozesse in der Frühphase entscheidender ist, als zum Beispiel TIMP-2. Dies wird durch die signifikante negative Korrelation von TIMP-1 mit dem LVEDP in der Regressionsanalyse untermauert. Des Weiteren war kein Unterschied in der räumlichen Neuverteilung beider TIMPs zu beobachten, weder in der zytoplasmatischen, noch in der Fraktion des Zytoskeletts. Die Arbeit von Podesser et al. [75] zeigt ähnliche Ergebnisse. Er beobachtete an Ratten in einem Zeitraum von sechs Wochen nach Infarkt eine ähnliche Aktivierung von MMP-1, -2, und -9 im Restmyokard. Gleichzeitig kam es zu einer Downregulation von TIMP-1, während die Expression von TIMP-2 unverändert blieb. Die Einflüsse einer Myokardischämie auf die Inhibitoren der Matrixmetalloproteinasen konnten wie eben erklärt von dieser Studie bestätigt werden. Die Frage stellte sich aber, in wie fern die Expression der MMPs durch eine späte Reperfusion verändert wird und welche Auswirkungen dies auf das ventrikuläre Remodeling hat.

In unserer Studie fand sich eine vermehrte Expression von MMP-1 nach einem Infarkt gegenüber der Kontrollgruppe. Diese Ergebnisse finden ihre Bestätigung in bereits vorausgegangenen Arbeiten [42]. Allerdings zeigte sich zusätzlich bei einer Reperfusion nach drei Tagen im Vergleich zu den anderen Infarktgruppen

der größte Anstieg von MMP-1. Des weiteren korreliert dieser Anstieg mit einem erhöhten LVEDP und Arbeitsvolumen sowie einem erhöhtem Infarktausdehnungsindex. Der Anstieg von MMP-1 könnte somit eine wichtige Rolle in dem Prozess des Remodeling nach Infarkt spielen. Zudem könnte es darauf hindeuten, dass MMP-1 beteiligt ist für die in der Frühphase nach einem Infarkt mit Reperfusion nach drei Tagen gesehenen verschlechterten Parameter wie LVEDP, Arbeitsvolumen und Wandstress.

Als wichtigste Entdeckung des zweiten Teils dieser Studie kann die unterschiedliche Regulation und Verteilung von MMP-2 bezeichnet werden. Eine Woche nach Infarkt kommt es zu einer Hochregulierung dieser Protease, wobei eine Reperfusion nach drei Tagen und noch mehr nach zwei Stunden, eine deutliche Reduktion bringt. Auf Grund dieses Ansprechens auf die Reperfusion, auch wenn die Ergebnisse nicht signifikant innerhalb der Gruppen sind, wurde MMP-2 eingehender untersucht. So ergab sich in der Regressionsanalyse eine signifikante positive Korrelation mit dem Infarktausdehnungsindex, auf Grund dessen man eine wichtige Rolle von MMP-2 für den Remodelingprozess im restlichen Myokard nach MI ableiten kann. Ähnliche Beobachtungen machte auch Cheung et al [66] in einem Modell mit akuter Ischämie/Reperfusion an Mäusen. Dort korrelierte die Inhibition, bzw. Zugabe von MMP-2 in ähnlicher Weise mit dem Infarktausdehnungsindex wie in dieser Arbeit.

### **4.3. Einfluss der Reperfusion auf die Enzymlokalisation**

In einem weiteren Schritt wurde mit Immunhistochemie die Lokalisation dieser Protease in der Zelle untersucht. Tiefgefrorene Gewebeschnitte wurden speziell gefärbt und unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. So erhält man einen Einblick in die Verteilung der Proteine in der Zelle und ermöglicht so zu untersuchen, welchen Anteil MMP-2 am Remodelingprozess hat. Es stellte sich heraus, dass die Hauptlokalisation bei der Vergleichsgruppe und den zwei-Stunden Tieren im Zytoplasma ist, während es bei den permanenten Infarkten und drei- Tage- Reperfusion zu einer Rückverteilung an die Oberfläche der

Plasmamembran der Kardiomyozyten kommt. Diese Lokalisation stimmt überein mit der Bindungsstelle für Proteine der Extrazellulärmatrix, Fibronectin, Kollagen 1 und -3. Da diese Proteine als Substrat der proteolytischen Spaltung unterliegen, ist die Mitbeteiligung von MMP-2 am Remodeling bei dem eben gesagten in Betracht zu ziehen. Geht man einen Schritt weiter, können mit diesen Veränderungen der Verteilung von MMP-2 innerhalb der Zelle die unterschiedlichen Ergebnisse der einzelnen Gruppen in Bezug auf Hämodynamik und Morphologie erklärt werden. So kommt es in allen Gruppen, außer der 2 Stunden Gruppe, zu einer Erhöhung des LVEDP, ein Parameter, der den Wandstress repräsentiert. Da diesem Wert eine gewisse Triggerfunktion für das Remodeling zugeschrieben wird, lassen sich damit die Unterschiede in der Expression und Verteilung von MMP-2 in der Zelle erklären, bzw. bedingt dessen Aktivität ein erhöhtes LVEDP.

Seit langem ist bekannt, dass es nach einem Myokardinfarkt zu einem Wachstum und einer Ausdehnung der Kardiomyozyten kommt. Dieses Verhalten des Herzmuskels, auch als linksventrikuläres Remodeling bezeichnet, ist gekoppelt an eine veränderte Zusammensetzung der Extrazellulärmatrix. Diese Anpassung an die neue Ventrikelgeometrie kann mit dem Zusammenspiel von MMPs, Integrinrezeptoren und Matrixproteinen an der Oberfläche der Herzmuskelzellen als dessen Mechanismus erklärt werden. Allerdings sind bislang nur Spekulationen darüber anzustellen, welchen Einfluss die Rekanalisation eines Gefäßes, besonders die sehr späte Reperfusion, auf die Expression der MMPs im Restmyokard nimmt.

Eine mögliche Erklärung ist der wiederhergestellte lokale Blutfluss, der einzelne Zellen vor Nekrose und Apoptose bewahrt, sowie zu einer verbesserten Heilung nach dem Infarkt-geschehen führt [28]. Auf molekularbiologischer Ebene scheint eine Reperfusion sich günstig auf die Mechanismen auszuwirken, von denen man annimmt, dass sie Signalwege triggern, so z.B. der Wandstress.

Zusammenfassend lassen sich aus dieser Arbeit zwei Hauptergebnisse ableiten: Erstens, dominieren eine Woche nach Infarkt bei einer Reperfusion nach drei

Tagen noch die Effekte des Reperfusionsschadens, zeigen sich nach 12 Wochen doch die günstigen Auswirkungen einer sehr späten Reperfusion auf die chronischen Umbauprozesse im Restmyokard durch eine signifikante Reduktion des Infarktausdehnungsindex (Daten nicht gezeigt). Somit ergibt sich langfristig ein positiver Nettoeffekt bei unveränderter Mortalität in der Frühphase.

Zweitens, die Abschwächung der MMP-2 Expression durch Reperfusion und die Verlagerung lokaler Bindungsstellen auf der Oberfläche der Kardiozyten könnte die positive Korrelation von MMP-2 und der Infarktausdehnung während des chronischen Remodelingprozesses am Herzen nach Infarkt erklären.

Mit dieser Studie sollte geklärt werden, ob eine späte Reperfusion drei Tage nach Myokardinfarkt positive Effekte besitzt, und welche Mechanismen dies bedingen. Unsere Ergebnisse legen nahe, das Zeitfenster für die Gefäßbrevaskularisation, entgegen den bisherigen Richtlinien, auszuweiten. Viele Faktoren in diesem Zusammenhang sind im einzelnen noch lange nicht verstanden und bedürfen einer weiteren intensiven Untersuchung. Auch wird durch klinische Studien geklärt werden müssen, in welchem Ausmaß diese Ergebnisse auf den Menschen übertragbar sind.

## **5. Zusammenfassung**

Bislang herrscht Unklarheit darüber, in welchem Zeitfenster eine Reperfusion nach Myokardinfarkt noch einen Benefit bringt. Besonders die späte Reperfusion ist noch wenig untersucht und die Mechanismen, die einen möglichen positiven Effekt ausmachen noch lange nicht verstanden. In dieser Studie haben wir die Effekte einer sehr späten Reperfusion drei Tage (3 Tage) nach Myokardinfarkt mit der Reperfusion nach zwei Stunden (2 Stunden), permanentem Infarkt (Permanent) und sham-Operation (Sham) an 73 Ratten verglichen. Die Tiere wurden auf morphologische und hämodynamische Veränderungen untersucht, sowie auf Unterschiede in der Proteinexpression eine Woche nach Infarkt.

### **Ergebnisse:**

Die morphologische Untersuchung zeigte innerhalb der Gruppen ähnliche Infarktgrößen (52-59 %) und das typische Remodeling. Die Reperfusion erbrachte eine signifikante Erhöhung des Lunge/KG, LV-Gesamtfläche und MI-Ausdehnungsindex gegenüber Sham. Weiterhin führt eine Reperfusion zu einer signifikant niedrigeren LV-Gesamtfläche gegenüber Permanent, allerdings auch zu einem signifikant größerem MI-Ausdehnungsindex nach drei Tagen Reperfusion gegenüber 2 Stunden und Permanent.

Die Reperfusion zeigte auch bei der Hämodynamik deutliche Veränderungen. Es kommt zu einer signifikanten Erniedrigung des LVSP und des Herzindex, sowie zu einer Erhöhung des Arbeitsvolumenindex, des Arbeitsvolumen/LV Gewicht und des Wandstress.

Die Analyse der Proteinexpression des Restmyokards für Fibronectin (FN), Matrixmetalloproteinasen (MMPs) und Tissue inhibitors of MMPs (TIMPs) zeigte eine unterschiedliche Expression nach Myokardinfarkt und Reperfusion. Eine Woche nach dem Infarkt kam es zu einer signifikanten Reduktion von TIMP-1, nicht aber von TIMP-2 in allen Infarktgruppen. Fibronectin und MMP-2 wurden nach einem Infarkt stark hochreguliert. Die Reperfusion nach zwei Stunden verursachte einen Anstieg der Expression von MMP-2 nach dem Infarkt. Die Immunlokalisation in gefrorenen Schnitten des linken Ventrikels zeigte nach Permanentinfarkt sowie nach drei Tagen Reperfusion einen Anstieg von MMP-2, das in Verbindung mit der Plasmamembran stand, während eine 2 Stunden Reperfusion davor schützt. Weiterhin konnte eine Kollokalisierung von MMP-2 mit Fibronectin, Collagen -1 und -3 gezeigt werden.

In der Regressionsanalyse fanden sich signifikante positive Korrelationen von MMP-2 mit dem Ausdehnungsindex. Fibronectin korrelierte überdies über dies mit dem Arbeitsvolumen und dem LVEDP.

Zusammenfassend kann man sagen, dass eine Reperfusion drei Tage nach Myokardinfarkt zu einer deutlichen Verbesserung des morphologischen Remodelings führen kann. Dennoch lassen sich in der Frühphase auch negative Auswirkungen erkennen, die jedoch keinen Einfluss auf die Mortalität haben.

Nach einem langen Beobachtungszeitraum von 12 Wochen sind diese nicht mehr zu erkennen und somit ergibt sich langfristig ein positiver Nettoeffekt. Möglicherweise geschieht dies durch die Regulation von MMP-2.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Schmitt F, T.G., *Physiologie des Menschen*. 27. Auflage ed, ed. U. Mainz. 1997, Berlin Heidelberg: Springer-Verlag. 448.
2. WHO, *world health report*. 2000: p. 169.
3. Schettler G, G.H., *Innere Medizin, Verstehen-Lernen-Anwenden*. 9 ed. 1998, Stuttgart-New York: Georg Thieme Verlag. 90-100.
4. Szucs TD, S.E., *Economic significance of heart failure. An overview of costs and economics of therapy*. *Herz*, 2000. **25**(5): p. 538-46.
5. Yusuf S, T.T., *Changes in hypertension treatment and in congestive heart failure mortality in the United States*. *Hypertension*, 1989. **13**: p. 174-179.
6. Levy P, L.P., et al., *A cost minimization of heart failure therapy with bisoprolol in the french setting: an analysis from CIBIS trial data. Cardiac Insufficiency Bisoprolol Study*. *Cardiovasc Drug Ther*, 1998(12): p. 301-5.
7. Association, A.H., *Heart and stroke facts and statistics*. 1992 Dallas.
8. Eriksson H, *Heart failure: a growing public health problem*. *J Intern Med*, 1995. **237**: p. 135-141.
9. G. Ertl, D.F., P. Gaudron, K. Hu, A. Laser, S. Neubauer, W. Schorb,, *Übergang von Myokardischämie in Herzinsuffizienz*. *c. Z Kardiol*, 1998. **87**: p. 667-675.
10. Ertl G, G.P., Neubauer S, Bauer B, Horn M,, *Cardiac dysfunction and development of heart failure*. *Eur Heart J*, 1993(14): p. 33-37.
11. Grundmann, E., *Einführung in die allgemeine Pathologie*, Vol. 9. 1994, München: Urban&Fischer Verlag. 196-198.
12. Assmann G, C.a.S.H., *The Münster Heart Study (PROCAM); Results of follow-up at 8 years*. *Eur Heart J*, 1998. **19**(suppl A): p. A2-A11.
13. Sutton Martin G. St. J., S.N., *Left ventricular remodeling after myocardial infarction*. *Circulation*, 2000. **101**: p. 2981-2988.
14. Oberholzer Martin J, *Pathologie verstehen*. Georg Thieme Verlag, 2001: p. 274.
15. Renz-Polster H., B.J., *Innere Medizin*. Urban und Fischer Verlag München/Jena, 2001(2.Auflage): p. 70.
16. Solomon A., G.B., *The open artery hypothesis*. *Annu. Rev. Medicine*, 1998. **49**: p. 63-76.
17. Michael Lloyd H., B.C.M.e.a., *Myocardial infarction and remodeling in mice : effect of reperfusion*. *Am. J. Physiol. (Heart Circ. Physiol. 46)*, 1999. **277**: p. H660-H668.
18. Martin G, *Left Ventricular Remodeling After Myocardial Infarction*. *Circulation*, 2000(101): p. 2981-2988.
19. Wagner S, S.S., Schiele R, Fischer F, Dehn H, *Akuter Myokardinfarkt in Deutschland im Zeitraum zwischen 1996 und 1998: Therapie und hospitaler Verlauf*. *Zeitschrift für Kardiologie*, 1999. **88**(10): p. 857-867.
20. Krück, K., Bünte, Gladtko, *Therapiehandbuch*. Vol. 3. Auflage. 1989, München: Töle.

21. Lüllmann, H., *Pharmakologie und Toxikologie*. Georg Thieme Verlag, 1999(14): p. 162-167.
22. Reimer KA, L.J., Rasmussen MM, Jennings RB, *The wavefront phenomenon of ischemic cell death. 1. Myocardial infarct size vs. duration coronary occlusion in dogs*. *Circulation*, 1977. **56**: p. 786-94.
23. Brodie BR, S.T., Kissling G, Hansen CJ, Muncy DB,, *Importance of time to reperfusion for 30 days and late survival and recovery of left ventricular function after primary angioplasty for acute myocardial infarction*. *J Am Coll Cardiol*, 1998. **32**(5): p. 1312-9.
24. Milavetz J, G.D., Timothy F, Schwarts R, Holmes D, Gibbons R, *Time to therapy and salvage in myocardial Infarction*. *J Am Coll Cardiol*, 1998(31): p. 1246-51.
25. Ertl G, F.D., Gaudron P, Hu K, Laser A, Neubauer S, Schorb W, *Übergang von Myokardischämie in Herzinsuffizienz*. *Z Kardiol*, 1998. **87**: p. 667-675.
26. Montalescot G, F.M., *Myocardial viability in patients with Q wave myocardial infarction and no residual ischemia*. *Circulation*, 1992. **86**: p. 47-55.
27. Sabia PJ, P.P., Ragosta M., *An association between collateral blood flow and myocardial viability in patients with recent myocardial infarction*. *N. Engl. J. Med.*, 1992. **327**: p. 1825-31.
28. Hirayama A, A.T., Hansen C., *Late reperfusion for acute myocardial infarction limits the dilatation of left ventricle without the reduction of infarct size*. *Circulation*, 1993. **88**: p. 2565-74.
29. Zahn R, S.R., Schneider S, Gitt AK, Wienbergen H, Seidl K, Bossaller C, Hauf GF, Gottwik M, Altmann E, Rosahl W, Senges J., *Primary angioplasty versus no reperfusion therapy in patients with acute myocardial infarction and a prehospital delay of > 12-24 hours: results from the pooled data of the maximal individual therapy in acute myocardial infarction (MITRA) registry and the myocardial infarction registry (MIR)*. *J Invasive Cardiol*, 2001. **13**(5): p. 367-72.
30. Karlson BW, H.J., Edvardsson N, Emanuelsson H, Sjolin M, Hjalmarson A, *Eligibility for intravenous thrombolysis in suspected acute myocardial infarction*. *Circulation*, 1990. **82**: p. 1140-6.
31. French JK, W.B., Hart HH, Wyatt S, Poole JE, Ingram C, Ellis CJ, Williams MG, White HD, *Operspective evaluation of eligibility for thrombolytic therapy in acute myocardial infarction*. *Bmj.*, 1996. **312**: p. 1637-41.
32. Cannon CP, G.C., Lambrew CT, Shoultz DA, Levy D, French WJ, Gore JM, Weaver WD, Rogers WJ, Tiefenbrunn AJ., *Relationship of symptom-onset-to-balloon time and door-to-balloon time with mortality in patients undergoing angioplasty for acute myocardial infarction*. *Jama*, 2000. **283**: p. 2941-7.
33. Pfeffer MA, B.E., *Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observation and clinical implications*. *Circulation*, 1990. **81**: p. 1161-72.



34. Boyle MP, W.H., *Limitation of infarct expansion and ventricular remodeling by late reperfusion. Study of time course and mechanism in a rat model.* Circulation, 1993. **88**(6): p. 2872.
35. J, O.M., *Pathologie verstehen.* Georg Thieme Verlag, 2001: p. 274.
36. Lee, K.L., et al., *Predictors of 30-day mortality in the era of reperfusion for acute myocardial infarction. Results from an international trial of 41,021 patients. GUSTO-I Investigators.* Circulation, 1995. **91**(6): p. 1659-68.
37. White, H.D.a.F.J.V.d.W., *Thrombolysis for acute myocardial infarction.* Circulation, 1998. **97**(16): p. 1632-46.
38. Morrison, L.J., et al., *Mortality and prehospital thrombolysis for acute myocardial infarction: A meta-analysis.* Jama, 2000. **283**(20): p. 2686-92.
39. Coletta, A., et al., *Clinical trials update: highlights of the scientific sessions of The American College of Cardiology 2002: LIFE, DANAMI 2, MADIT-2, MIRACLE-ICD, OVERTURE, OCTAVE, ENABLE 1 & 2, CHRISTMAS, AFFIRM, RACE, WIZARD, AZACS, REMATCH, BNP trial and HARDBALL.* Eur J Heart Fail, 2002. **4**(3): p. 381-8.
40. O, P., *Der akute Herzinfarkt: Optimale Reperusionsstrategie 2002?* J Kardiol, 2002. **9**(6): p. 225-226.
41. J, D.A., *Matrix Metalloproteinase Disruption of the Extrazellular Matrix and Cardiac Dysfunction.* TCM, 2002. **12**(3): p. 97-101.
42. Creemers E., C.J., Smits J., Daemen M., *Matrix Metalloproteinase Inhibition After Myocardial Infarction: A New Approach to Prevent Heart Failure?* Circulation Research., 2001. **89**: p. 201-210.
43. Weisman HF, B.D., Mansini JA, et al., *Cellular mechanisms of myocardial infarct expansion.* Circulation, 1988. **78**: p. 186-201.
44. Spinale G, C.M., Bond B, Zellner J, *Myokardial matrix degradation and metalloproteinase activation in the failing heart: a potential therapeutic target.* Cardiovascular Research, 2000. **46**: p. 255-238.
45. Dollery CM, M.J., Henney AM,, *Matrixmetalloproteinases and cardiovascular disease.* Circ Res, 1995. **77**: p. 863-868.
46. Löffler G., P.P., *Biochemie und Pathobiochemie.* Vol. 6. 1998, Berlin: Springer-Verlag. 735.
47. Sun Yao, W.K., *Infarct scar: a dynamic tissue.* Cardiovasc Research, 2000. **46**: p. 250-256.
48. Carlyle, W.C., et al., *Delayed reperfusion alters matrix metalloproteinase activity and fibronectin mRNA expression in the infarct zone of the ligated rat heart.* J Mol Cell Cardiol, 1997. **29**(9): p. 2451-63.
49. Mann DL, S.F., *Aktivation of matrix metalloproteinases in the failing human heart: breaking the tie that binds.* Circulation, 1998. **98**: p. 1699-1702.
50. Cleutjens JP, K.J., Guarda E, et al., *Regulations of collagen degradation in the rat myocardium after infarction.* J Mol Cell Cardiol, 1995. **27**: p. 1281-1292.

51. Carlyle, W.C., et al., *Delayed reperfusion alters matrix metalloproteinase activity and fibronectin mRNA expression in the infarct zone of the ligated rat heart*. J Mol Cell Cardiol, 1997. **29(9)**: p. 2451-63.
52. Pfeffer, M.a.J.P., *Blood pressure and left ventricular dysfunction in the spontaneously hypertensive rat*. Fed Proc, 1983. **42**: p. p. 2698-2702.
53. Pfeffer MA, F.E., *Electromagnetic flowmetry in anaesthetized rats*. J Appl Physiol, 1972. **33**: p. 137.
54. Pfeffer JM, P.M., Fishbein MC, Fletcher PJ, *Myocardial infarct size and ventricular function in rats*. Circ Res, 1979. **44**: p. 503-512.
55. Van de Werf F, A.D., Betriu A, Cokkinos DV, Falk E, Fox KA, Julian D, Lengyel M, Neumann FJ, Ruzylo W, Thygesen C, Underwood SR, Vahanian A, Verheugt FW, Wijns W, *Management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation*. Eur Heart J, 2003. **24**: p. 28-66.
56. Ishikawa K, *Benefits of the late Reperfusion in the treatment of acute myocardial infarction*. J Thromb Thrombolysis, 2002. **13**: p. 191-200.
57. McDonald K, C.C., Francis G, Judd D, Caryle W, Toher C, Hauer K, Hartmann M., *The effect of delayed reperfusion following infarction in the rat on structural changes in viabel myocardium*. Cardiovasc Research, 1997. **36**: p. 347-53.
58. Hochman JS, C.H., *Limitation of myocardial infarct expansion by reperfusion independent of myocardial salvage*. Circulation, 1987. **75**: p. 299-306.
59. Sutton Martin G. St. J., *Left ventricular Remodelling after acute myocardial infarction*. Science Press. 1996. 30-38.
60. Ertl G, G.P., Hu K., *Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental and clinical studies*. Basic Res Cardiol., 1993. **88**: p. 125-37.
61. Fraccarollo D, B.J., Kellner M, Galuppo P, Ertl G., *Cardioprotection by longterm ET(A) receptor blockade and ACE inhibition in rats with congestive heart failure: mono- versus combination therapy*. Cardiovasc Research, 2002. **54(85-94)**.
62. Nahrendorf M, H.K., Fraccarollo D, Hiller KH, Haase A, Bauer WR, Ertl G, *Time course of right ventricular remodeling in rats with experimental myocardial infarction*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2003. **284**: p. H241-8.
63. Wagner JA, H.K., Bauersachs J, Karcher J, Wiesler M, Goparaju SK, Kunos G, Ertl G., *Endogenous cannabinoids mediate hypotension after experimental myocardial infarction*. J Am Coll Cardiol, 2001. **38**: p. 2048-54.
64. Yousef ZR, R.S., Bucknall CA, Sulke AN, Marber MS, *Late intervention after anterior myocardial infarction: effects on left ventricular size, function, quality of life, and exercise tolerance: results of the Open Artery Trial (TOAT Study)*. J Am Coll Cardiol, 2002. **40**: p. 869-76.
65. Romanic AM, B.-K.C., Pickering S, Gu J, Grau E, Mao J, Santhe GM, Ohlstein EH, Yue TL, *Myocardial protection from ischemia/reperfusion*

- injury by targeted deletion of matrix metalloproteinase -9.* Cardiovasc Research, 2002. **54**: p. 549-58.
66. Cheung PY, S.G., Wozniak M, Wang W, Radomski MW, Schulz R,, *Matrix metalloproteinase-2 contributes to ischemia reperfusion injury in the heart.* Circulation, 2000. **101**: p. 1933-9.
  67. Schulze CJ, W.W., Suarez-Pinzon WL, Sawicka J, Sawicki G, Schulz R, *Imbalance between tissue inhibitor of metalloproteinase-4 and matrix metalloproteinases during acute myocardial (correction of myoctardial) ischemia-reperfusion injury.* Circulation, 2003. **107**: p. 2487-92.
  68. Wang W, S.C., Suarez-Pinzon WL, Dyck JR, Sawicki G, Schulz R,, *Intracellular action of matrix metalloproteinase-2 accounts for acute myocardial ischemia and reperfusion injury.* Circulation, 2002. **106**: p. 1543-9.
  69. Mallavarapti C, R.P., Langenback EG, Hakim II, Jain P, Siddiqui F, Lillis O, Brown Jr EJ, *Effects of Late Coronary Artery Reperfusion on Left Ventricular Remodeling Persists for 10 Weeks After Experimental Rat Myocardial Infarction and Are Associated with Improved Survival.* J Thromb Thrombolysis, 1994. **1**: p. 55-62.
  70. Romanic AM, B.-K.C., Gout B, Berrebi Bertrand I, Ohlstein EH,, *Matrix metalloproteinase expression in cardiac myocytes following myocardial infarction in the rabbit.* Life Sci., 2001. **68**: p. 799-814.
  71. Lindsey ML, G.J., Aikava M, Schoen FJ, Rabkin E, Lopresti-Morrow L, Crawford J, Black S, Libby P, Mitchell PG, Lee RT,, *Selectiv matrix metalloproteinase inhibition reduces left ventricular remodeling but does not inhibit angiogenesis after myocardial infarction.* Circulation, 2002. **105**: p. 753-8.
  72. Cleutjens JP, K.J., Guarda E, et al., *Regulations of collagen degradation in the rat myocardium after infarction.* J Mol Cell Cardiol., 1995(27): p. 1281-1292.
  73. Ducharme A, F.S., Aikava M, Rabkin E, Lindsey M, Rohde LE, Schoen FJ, Kelly RA, Werb Z, Libby P, Lee RT,, *Targeted deletion of matrix metalloproteinase-9 attenuates left ventricular enlargement and collagen accumulation after experimental myocardial infarction.* J Clin Invest., 2000. **106**: p. 55-62.
  74. Rohde LE, D.A., Arroyo LH, Aikava, M, Sukhova GH, Lopez-Anaya A, McClure KF, Mitchell PG, Libby P, Lee RT,, *Matrix metalloproteinase inhibition attenuates early left ventricular enlargement after experimental myocardial infarction in mice.* Circulation, 1999. **99**: p. 3063-70.
  75. Podesser BK, S.D., Eberli FR, Sam F, Ngoy S, Lambert J, Ngo K, Apstein CS, Colucci CS,, *ET(A)-receptor blockade prevents matrix metalloproteinase activation late postmyocardial infarction in the rat.* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2001. **280**: p. H984-91.



# BERND MEYER

---

Hochhauserstrasse 4  
D-26121 Oldenburg  
Telefon privat (0441-8007280)

## LEBENS LAUF

### Angaben zur Person:

Name: Bernd Meyer  
Wohnort: Hochhauserstrasse 4  
26121 Oldenburg  
Tel.: 0441-8007280  
Geburtstag und -ort: 16.01.1977 in Gunzenhausen  
Familienstand: ledig  
Konfession: römisch katholisch  
Nationalität: deutsch

### Schulbildung:

1983-1987 Grundschohle Pleinfeld  
1987-1992 Willibald-Gymnasium Eichstätt, Eintritt in das bischofliche Studien  
-seminar St. Willibald  
1992-1996 Werner-von-Siemens-Gymnasium Weissenburg  
28.06.1996 Abitur

### Zivildienst

08.1996-08.1997 Caritas Sozialstation, Alten- und Krankenpflege

### Ausbildungsdaten:

1997-1999 Vorklinisches Studium / Universität Regensburg  
14.09.1999 Ärztliche Vorprüfung  
1999-2000 Klinisches Studium / Julius-Maximilian-Universität Würzburg  
29.08.2000 1. Staatsexamen  
2000-2003 Klinisches Studium / Julius-Maximilian-Universität Würzburg  
31.03.2003 2. Staatsexamen  
28.04.2003 Beginn des Praktischen Jahres / Innere Medizin (Kardiologie und  
Intensivmedizin) Universitätsklinikum Würzburg  
18.08.2003 Praktisches Jahr / Gynäkologie und Geburtshilfe / Universitäts-  
Frauenklinikum Würzburg  
08.12.2003 Praktisches Jahr / Chirurgie (Gefäßchirurgie und Unfallchirurgie)  
Universitätsklinikum Würzburg

**Studienbegleitende Tätigkeiten:****Pflegepraktikum:**

01.10.-31.10.1998 Kreiskrankenhaus Weißenburg, Abteilung Innere Medizin

**Famulaturen:**

01.03.-31.03.2000 Chirurgie, Kreiskrankenhaus Weißenburg  
13.02.-22.03.2001 Innere Medizin, Medizinische Intensivstation, Universitätsklinikum  
Würzburg  
01.09.-30.09.2001 Urologie, Charité – Universitätsklinikum Berlin  
01.03.-01.04.2003 Orthopädie, Praxis Dr. Dirsch, Eichstätt

**Berufliche Weiterbildung:**

09.2004-09.2005 Beginn der Facharztausbildung in der Allgemein- und  
Visceralchirurgischen Klinik des städtischen Klinikums Oldenburg,  
Chefarzt: Prof. Dr. med. H.R. Raab.

**Nebentätigkeiten:**

15.08.-25.08.1997 Laborpraktikum, Wasserentsorgung Zweckverband Brombachsee  
2001-2003 Doktorandentätigkeit in der kardiologischen Arbeits/Forschungsgruppe,  
Innere Medizin Universität Würzburg, Prof. Dr. Georg Ertl  
2001/2002 Teilnahme am Kursus: Einführung in die abdominelle  
Ultraschalldiagnostik, Anfänger  
2002 Teilnahme am Kursus: Einführung in die abdominelle  
Ultraschalldiagnostik, Fortgeschrittene  
2002/2003 Teilnahme an den Kursen: Klinische Röntgendiagnostik von Herz-  
Thorax-Erkrankungen, Röntgenologisches Kolloquium  
02.2006 Strahlenschutzkurs für Mediziner, Strahlenschutzstelle der Universität  
Würzburg.

**Sonstiges:**

Fremdsprachen: Gute Kenntnisse in Englisch, Grundkenntnisse in  
Französisch EDV: gute Kenntnisse in Word, Exel, Powerpoint,  
StatView und Photoshop  
Persönliche Interessen: Bergwandern, Langstreckenlauf, Fliegenfischen

Oldenburg, den 04.04.2006



Bernd Meyer

