

1. Einleitung

Die Intention dieser Arbeit ist es, die komplexen Umbauprozesse des Herzens nach Myokardinfarkt genauer zu beleuchten und die Veränderungen, die durch eine späte Reperfusion bewirkt werden, darzustellen. Dabei wird vor allem der Zusammenhang zwischen hämodynamischen Veränderungen, morphologischen Veränderungen und molekular-biochemischen Veränderungen untersucht.

Es wurden hierfür 77 weibliche Ratten infarziert, nach 2 Stunden oder 3 Tagen reperfundiert, und nach insgesamt 12 Wochen einer hämodynamischen Messung zugeführt. Die Herzen wurden anschließend histologisch ausgewertet und das Myokard wurde einer biochemischen Analyse unterzogen. Es wurden im nicht-infarzierten Myokard Proteine (Kollagen, Fibronectin, Vitronectin), Proteasen (MMP`s) und ihre Inhibitoren (TIMP`s) mittels Western Blot nachgewiesen sowie ihre Lokalisation immunhistochemisch analysiert.

Bevor allerdings diese Arbeit im Detail beschrieben wird, ist es notwendig, einen Überblick über einige für das Thema relevanten Fakten zu geben.

Sicherlich ist es als Einstieg in ein so komplexes Thema hilfreich einen Blick auf die momentane Datenlage zu werfen.

1.1 Epidemiologische und gesundheitsökonomische Daten:

Die Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems sind bis heute in den Industrieländern die häufigste Todesursache. Dabei stehen der Myokardinfarkt und die Herzinsuffizienz an erster Stelle. So gibt es in Deutschland jährlich ca. 200.000 Neuerkrankungen, und ca. 2 % des gesamten Gesundheitsbudgets wird pro Jahr durch Diagnosestellung, Behandlung und Prävention der Herzinsuffizienz verschlungen [1]. Somit ist die Herzinsuffizienz von enormer gesundheitsökonomischer Bedeutung.

Obwohl die Mortalität kardiovaskulärer Erkrankungen in den meisten entwickelten Industrienationen in den letzten Jahren gesunken ist, nehmen Inzidenz und Prävalenz der Herzinsuffizienz weiter zu [2]. Die American Heart Association gibt allein für die USA 2.3-3.0 Millionen bekannte Fälle an [3].

Die Inzidenz der Herzinsuffizienz wird oft unterschätzt. So liegt sie in Großbritannien mit 3 pro 1000 Neuerkrankungen über derjenigen von Brustkrebs (0.54/1000) oder Zervixtumoren (0.24/1000) [4].

Auch die Prognose der Herzinsuffizienz 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 % [1].

Es besteht also durchaus ein Bedarf sich genauer mit der Entstehung eines Herzinfarktes als Auslöser einer Herzinsuffizienz zu beschäftigen. Im Folgenden wird versucht einen Überblick über die Entstehung und die Risikofaktoren eines Infarktes zu geben. Später werden dann die Phasen des Infarktgeschehens näher betrachtet.

1.2 Infarktentstehung:

Der irreversible Zelluntergang oder Myokardinfarkt entwickelt sich rasch von einem meist zunächst subendokardialen Infarkt innerhalb weniger Stunden zu einem transmuralen Infarkt, falls eine hochgradige Ischämie persistiert. Die Ausdehnung des Infarkts hängt von den anatomischen Gegebenheiten ab, also dem Versorgungsgebiet des infarktassoziierten 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 [5].

1.2.1 Risikofaktoren:

Zu einer gesamten Bewertung der Risikofaktoren zählen als Parameter Alter, Geschlecht, Gesamtcholesterinspiegel, HDL-Cholesterinspiegel, Triglyceridspiegel, Rauchen, Blutdruck, Diabetes, Fettleibigkeit, Familiengeschichte und eine bereits vorhandene Herz-Kreislauf-Erkrankung. Da viele dieser Risikofaktoren variieren und im Zusammenhang gesehen werden müssen, sollten all diese Parameter zu einer genauen Einschätzung des individuellen Risikos für die Entwicklung einer kardiovaskulären Erkrankung zusammen genommen werden [6].

1.2.2 Phasenhafter Verlauf des Infarktgeschehens:

Phase der frühen Ischämie:

Die Frühphase des Myokardinfarktes ist von einem intrazellulären Energiedefizit und der Anhäufung von Endprodukten des anaeroben Stoffwechsels (Laktat, NADH², und Protonen) geprägt. 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.

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 Sarkolems. Durch freigesetzte Enzyme, freie Fettsäuren, kalziumaktivierte Phospholipasen und freie Radikale werden zelluläre Strukturen geschädigt. Makroskopisch und lichtmikroskopisch ist die Nekrose erst ab einem Infarktalter von ca. 4 h durch zunehmende Zelleosinophilie, nukleäre Pyknose und beginnende Zelldegeneration sichtbar.

Vernarbung:

Die Reparation des irreversibel geschädigten Myokards wird durch die Einwanderung von neutrophilen Granulozyten eingeleitet, die lichtmikroskopisch 12-24 h nach Infarktbeginn sichtbar sind und nach 2-4 Tagen ihre maximale Konzentration erreichen. Es folgt die Einwanderung durch Makrophagen nach 5-7 Tagen. Nach 11-14 Tagen beginnt an den Infarktträndern die Einsprossung von Granulationsgewebe. Nach 14-30 Tagen wird durch Fibroblasten extrazelluläres Kollagen gebildet. Eine reife Narbe mit dichtem Kollagen und fortschreitender Zellverarmung ist nach 30-50 Tagen zu erwarten[7].

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 werden. Dabei ist Remodeling ein Zeichen physiologischer Anpassung während des normalen Wachstums oder pathologisch z.B. nach Infarkt [7].

Bereits in der Frühphase des Infarkts und in den nachfolgenden Monaten kommt es zu Umbauvorgängen des gesamten linken Ventrikels, die als Remodeling bezeichnet werden. Neben der frühzeitigen Abnahme der Wandstärke und Ausdehnung des infarzierten Bezirkes kann es zu einer fortschreitenden Dilatation des linken Ventrikels unter Einbeziehung nicht-infarzierter Regionen kommen. Die infarktbedingte Zunahme des ventrikulären Umfangs und die Änderung der Ventikelkontur führt zu einer Zunahme der diastolischen Wandspannung. Mittel- bis langfristig entsteht kompensatorisch eine inadäquate Hypertrophie des nicht-infarzierten 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 [8].

1.2.3 Genauere Betrachtung des LV Remodeling nach Infarkt:

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, eine Hypertrophie sowie die Bildung einer Narbe aus Kollagen.

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 (MMP's), 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 Wandstress wiederum ist ein starker Stimulus für eine Hypertrophie der Myozyten und beeinflusst somit die ventrikuläre Leistungsfähigkeit.

Hämodynamische Störungen stimulieren in der frühen Phase das sympathische adrenerge System zur Synthese von Katecholaminen, aktivieren das Renin-Angiotensin-Aldosteron System und stimulieren die Bildung von natriuretischen Peptiden (ANP, BNP).

ANP und BNP wiederum 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. Eine Unfähigkeit den angestiegenen Wandstress zu normalisieren führt zur progressiven Dilatation [7].

1.3 Therapie des Myokardinfarktes :

Im Folgenden wird ein Abriss über die derzeit üblichen Therapieoptionen nach Myokardinfarkt gegeben. Dazu wird die interventionelle Therapie der Pharmakotherapie gegenübergestellt bzw. werden die jeweiligen Vor- und Nachteile beleuchtet.

1.3.1 Pharmakotherapie:

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 hier die in einem hohen Prozentsatz auftretenden Rhythmusstörungen schnell genug erkannt und behandelt werden können. Im Vordergrund steht hierbei die maximale Schonung des Herzens. Diese wird durch eine ausreichende Sedierung mit Benzodiazepinen (Diazepam 5-10 mg i.v.) und Analgesierung mit Opiaten (Morphin 10-20 mg s.c.) versucht zu erreichen. Des Weiteren hat sich die Anwendung von Glyceryltrinitrat bewährt. Einerseits entlastet eine leichte Vasodilatation das Herz, andererseits konnte

nachgewiesen werden, dass Nitrate i.v. die Infarktgröße, Infarktausdehnung und die Mortalität begrenzen. Als zweite wichtige Maßnahme sollte die später genauer beschriebene Lysetherapie und Antikoagulation mit ASS und Heparin Anwendung finden. Beim Auftreten von Tachykardien werden β -Blocker eingesetzt, eventuellen Arrhythmien kann mit Lidokain (0,5-3,5 mg/min) als Infusion entgegengewirkt werden. 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 gleichen oben beschriebenen Risikofaktoren, die entsprechend behandelt werden müssen. Die Therapie der Herzinsuffizienz richtet sich nach dem Schweregrad der Beeinträchtigung, die von keinen subjektiven Beschwerden, bis Beschwerden in Ruhe reichen. Hierbei hat sich eine Einteilung in NYHA I-IV bewährt.

Als Basistherapie nach Myokardinfarkt, v.a. bei großem Infarkt und reduzierter, linksventrikulärer Funktion, ist immer ein beta-Blocker in Verbindung mit Aspirin sowie ein ACE-Hemmer indiziert.

Danach richtet sich die Therapie entsprechend der Stufe der NYHA-Einteilung. Als Basismedikament wird ein ACE-Hemmer in allen vier Stufen gegeben. Im Stadium zwei wird zusätzlich ein Diuretikum, vorzugsweise Thiazide, gegeben. Ab Stufe drei wird die Therapie um einen β -Blocker ergänzt und bei Stufe vier werden zusätzlich noch Herzglykoside verabreicht. Dieses Basisschema wird entsprechend den Symptomen des Patienten angepasst und ergänzt. Mit dieser Behandlung soll eine Besserung des Zustandes, der Leistungsfähigkeit, der Prognose und der Lebenserwartung erreicht werden.

1.3.2 Interventionelle Therapie:

1.3.2.1 Reperfusion:

Bei der Reperfusion unterscheidet man zwischen einer frühen und einer späten Reperfusion. Die frühe Reperfusion bewirkt eine unmittelbare Rettung von Myokard mit daraus folgender Verbesserung der linksventrikulären Funktion und des Überlebens. Bei der späten Reperfusion ist hingegen keine Rettung von Myokard mehr möglich, sie hat aber dennoch Auswirkungen auf die linksventrikuläre Funktion und das Überleben

[9]. 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 2 Stunden oder später nach Infarkt als späte Reperfusion [10]. 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 beleuchtet wird.

Diese generelle Einteilung erhält aber ihre Einschränkung durch die Annahme, dass, soweit überhaupt noch ein Blutfluss ins Infarktareal vorhanden ist, sei es nach hochgradiger Stenose oder durch eine Versorgung durch kollaterale Gefäße, ein noch überlebendes aber schlecht funktionierendes Myokard existiert. Dieses sich „ im Winterschlaf befindliche“ (hibernating) Myokard wird nach erfolgreicher Reperfusion wieder aktiv; z.B. verbessert sich stellenweise die Wandbeweglichkeit [11] und es kommt zu einer Verbesserung der regionalen Myokardfunktion [12]. Es kann also auch durch späte Reperfusion Myokard gerettet oder reaktiviert werden, solange es vorher durch kollaterale Gefäße oder einen Restblutfluss am Leben gehalten wurde [9].

Generell gilt aber, dass eine frühe Reperfusion die Rettung von Myokard wie auch die Überlebenswahrscheinlichkeit maximiert. Sollte jedoch keine frühe Reperfusion erfolgen, spielt die späte Reperfusion dennoch eine wichtige Rolle. Auch wenn keine Rettung von Myokard mehr erfolgt führt die späte Reperfusion zu einer Abnahme des ventrikulären Remodeling, weniger Arrhythmien und einer höheren Überlebenswahrscheinlichkeit [9].

1.3.2.2 Reperfusionsschäden:

Bei einer 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 adhäreren an die

Endothelzellen und bilden Mikrothromben. Neuerdings wird versucht, diese Reperfusionsschäden durch den Einsatz von Antiadhäsions-Antikörpern zu reduzieren. Verwendet werden Antikörper gegen CD18 bei Myokardinfarkt, ICAM 1, GPIIb/IIIa bei Hirninfarkt [13].

1.2.3.3 Optimale Reperusionsstrategie:

Die möglichen Strategien des Managements des akuten Herzinfarkts bei Patienten mit ST-Strecken Hebung im EKG reicht von der klassischen Lyse mit Streptokinase oder synthetischen Wirkstoffen über die Lyse mit pharmakologischen Kombinations-therapien, 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 [14, 15]. Die beste pharmakologische Reperfusion erzielt heute eine Öffnungsrate im Infarktgefäß von etwa 70 %, während die interventionellen Verfahren eine Öffnungsrate von 90-95 % erzielen lassen [16].

Für die Akut-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 Aufnahme („door-to-balloon-time“) von einem erfahrenen Team durchgeführt werden kann [17]. 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 [18].

1.4 Zelluläre Grundlage der Infarktveränderungen:

Im Folgenden wird aus der Vielzahl der zellulären Veränderungen nach Infarkt eine Komponente herausgegriffen. Diese Arbeit möchte speziell die Veränderungen des extrazellulären Raumes genauer betrachten, wie sie nach Infarkt im überlebenden Restmyokard ablaufen. Die folgenden Abschnitte dienen der Begriffserklärung und der Schaffung einer Diskussionsgrundlage.

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 (Fibronectin, Tenascin) sowie aus der Zwischensubstanz (Proteoglykane und Hyaluronsäure) (7).

Kollagen:

Die Heilung eines Myokardinfarkts ist ein dynamischer Prozess, bestehend aus dem Abbau von Kollagen, der Resorption von nekrotischen Myozyten und der Erzeugung einer neuen Matrix aus Bindegewebe, welche die Narbenformation bildet [19].

Kollagenabbau:

Die Tripelhelix-Struktur des Kollagens erweist sich als äußerst resistent gegen proteolytischen Abbau. Ausgenommen sind Matrix Metallproteinasen (MMP`s), 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 [20].

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 [21].

Der Abbau von Kollagen wird durch Tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP`s) auf die geschädigte Zone beschränkt. Diese niedermolekularen Proteine formen Komplexe mit hoher Affinität zu aktivierten MMP`s und neutralisieren den Kollagenabbau durch eine Blockade der katalytischen Domäne [20]. TIMP`s werden in der Infarktzone innerhalb von 6 Stunden gebildet, erreichen ihren Höhepunkt am Tag 2 und kehren bis zum 14. Tag auf ihre Ausgangslevel zurück [21]. Die Synthese von Timp`s wird durch den Level der aktivierten MMP`s moduliert, so dass der Kollagenabbau das Ungleichgewicht zwischen MMP`s und TIMP`s widerspiegelt [7].

Übersicht:

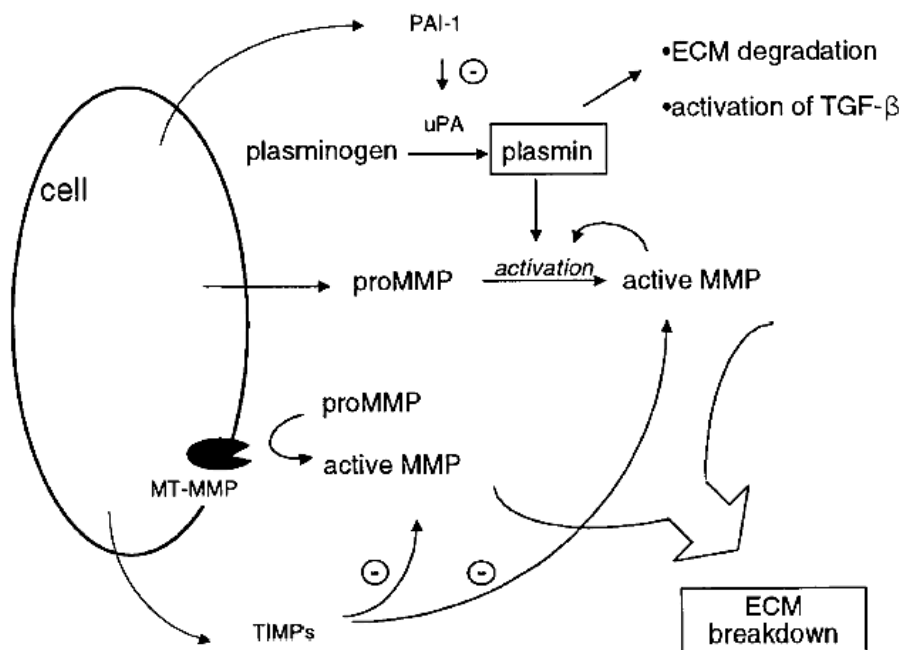


Abbildung 1
Regulierung des Abbaus der extrazellulären Matrix (ECM).

Der anfängliche Abbau von Bindegewebe in den ersten Tagen nach Infarkt, noch bevor es zur Neubildung von neuem 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 der Heilung weniger verwundbar. 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 die Heilung durch eine Stimulation zur Bildung von Fibronectin beschleunigt. Fibronectin spielt nämlich selbst eine kritische Rolle bei der Heilung von Gewebe. 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 [19].

Nach diesen theoretischen Erläuterungen der einzelnen Vorgänge im Ablauf eines akuten Myokardinfarkts zeigt sich in der Praxis, dass eine Reperfusionstherapie nach Myokardinfarkt mit thrombolytischen Medikamenten oder die Durchführung eines Herzkatheters zur Standardtherapie bei der Behandlung eines akuten Myokardinfarkts wurde [22].

Man erkannte, dass eine interventionelle Therapie durch Angioplastik und/oder Stent-Implantation der thrombolytischen Therapie überlegen ist [23, 24].

Allerdings gibt es im Gegensatz zur Thrombolysetherapie [25, 26] bei einer interventionellen Therapie keine exakt definierte Zeitgrenze, bis zu der eine Therapie durchgeführt werden soll. Bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt ist das Zeitfenster für eine Reperfusion derzeit auf einen Zeitraum bis zu 12 Stunden nach Einsetzen der Symptome [22] limitiert, was für eine große Anzahl der Patienten (mehr als 50 %) bedeutet, dass sie „nur“ eine konservative, medikamentöse Therapie erhalten [27, 28].

Wenn man sich allerdings die Daten der Patienten ansieht, die eine späte Reperfusion erhalten haben, wenn es z.B. die klinische Situation verlangte oder eine thrombolytische Therapie fehlschlug, zeigt sich bei dieser Gruppe keine Erhöhung des Risikos oder der Mortalität [29-31].

Aus den bisher vorhandenen Daten lässt sich vermuten, dass es einen anhaltend positiven Effekt einer Reperfusion gibt, auch wenn die Patienten erst später als 12 Stunden nach Einsetzen der Symptome behandelt werden [31-34].

Das exakte Zeitfenster einer Reperusionsstrategie über die 12 Stunden nach Gefäßverschluss hinaus wurde aber bisher noch in keiner größeren Patientenkohorte und unter den Voraussetzungen einer prospektiven Studie untersucht.

Im Tiermodell des chronischen Myokardinfarkts wurden die Effekte einer späten Reperfusion bis zu einem Zeitpunkt von 16 Stunden nach Gefäßverschluss untersucht und es zeigten sich innerhalb dieses Zeitraums positive Effekte auf die Infarktausdehnung und das Remodeling [35-38].

Des Weiteren wurde im Heilungs- und Umbauprozess nach Myokardinfarkt der Aktivierung und Regulation von Matrix Metalloproteasen (MMP`s) und ihren Inhibitoren (TIMP`s) eine wichtige Rolle zugesprochen. Während gezeigt werden konnte, dass eine Aktivierung von MMP`s nach Myokardinfarkt die Entwicklung einer Herzinsuffizienz und eines unvorteilhaften Remodeling zu fördern scheint [21, 39-43], ist der positive Einfluss einer Reperfusion auf die Expression von MMP`s und TIMP`s bisher nicht verstanden. Man sieht aber, dass eine Reperfusion die Expression von MMP`s und TIMP`s hemmt oder beschleunigt [19, 40, 44].

In dieser Arbeit wurden daher erstmals der Reperusionszeitraum auf bis zu drei Tage nach Myokardinfarkt ausgedehnt und die Auswirkungen auf die morphologischen, hämodynamischen und biochemischen Veränderungen des linken Ventrikels untersucht. In der biochemischen Untersuchung wurde dabei der Fokus auf die Proteasen, ihre Inhibitoren und Substrate gesetzt.

2. Material und Methodik

2.1 Tierexperimenteller Teil

2.1.1 Instrumentarium

Die verwendeten Instrumente und Hilfsgeräte werden in den einzelnen Methodik-Absätzen beschrieben.

2.1.2. Tiere

Die Studie wurde mit 77 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 oder Medikamentenlösung in beliebiger Menge und waren zu je 5 Tieren in Plexiglaskäfigen mit Gitterrostoberseite untergebracht. Das 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.

2.1.3 Gruppeneinteilung

Die Versuchstiere wurden aufgrund der Infarkttechnik in 3 Hauptgruppen unterteilt:

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

Bei der 3. Gruppe erfolgte die Reperfusion

2 Stunden, bzw.

3 Tage

nach Infarkt (MI).

Die Tiere wurden dann nach 12 Wochen einer hämodynamischen Messung zugeführt.

Gruppeneinteilung / Studiendesign

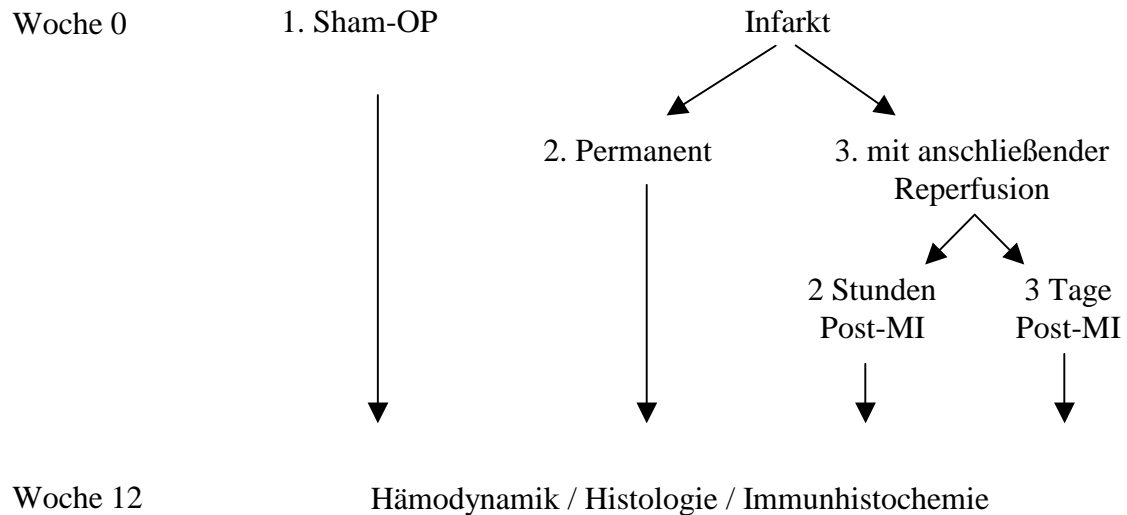


Abbildung 2

Gruppeneinteilung und Studiendesign. Beschreibung siehe oben.

2.1.4. Experimentelle Myokardinfarkt-Provokation und Reperfusion

2.1.4.1 Infarzierung:

Der Myokardinfarkt wurde durch Ligatur des Ramus interventricularis anterior der linken Koronararterie induziert; hierbei wurde eine etablierte Methode angewandt [45, 46].

Nach Einleitung der Narkose mit Äther und Erreichen des Tolranzstadiums wurde die Ratte gewogen und mit einer Plastikkanüle intubiert (PE 200, Portex, England). Sofort nach der Intubation erfolgte der Anschluß an ein Beatmungsgerät. Es wurde ein Beatmungsgerät für Nagetiere (Rodent Ventilator Typ UB 7025, Fa. Hufo Sachs Elektronik, D-March) verwendet. 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 erfolgte die Durchtrennung der Haut und des M. pectoralis mit einer Schere. Nachdem die Thoraxhöhle mit einem Spreizer gedehnt und dadurch offen gehalten wurde, erfolgte die Luxation des Perikardsackes aus dem Thorax heraus und die Eröffnung desselben mit einer Schere. Dann erfolgte die Umstechung des Ramus interventricularis anterior an proximaler Stelle mittels eines Fadens (Prolene 5/0 RB-1, Ethicon, Norderstedt, Deutschland). Der doppelte Knoten wurde dabei auf einem Soft Pleged (Soft Pleged „C“, Polytetrafluoroethylen, Firma Ethikon) geknüpft. Dies ermöglichte ein leichteres und atraumatischeres Lösen der Ligatur bei Reperfusion. 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. Direkt nach der Operation wurde die Isofluranzufuhr gestoppt und ein EKG zur Bestätigung des Infarktes beschrieben. Sobald die Tiere spontan atmeten, extubierten sie sich nach Wiedererlangen des Bewusstseins selbst. Postoperativ wurden die Ratten fünf Stunden überwacht und bei Herzrhythmusstörungen mechanisch reanimiert.

Ligatur des Ramus interventricularis anterior :

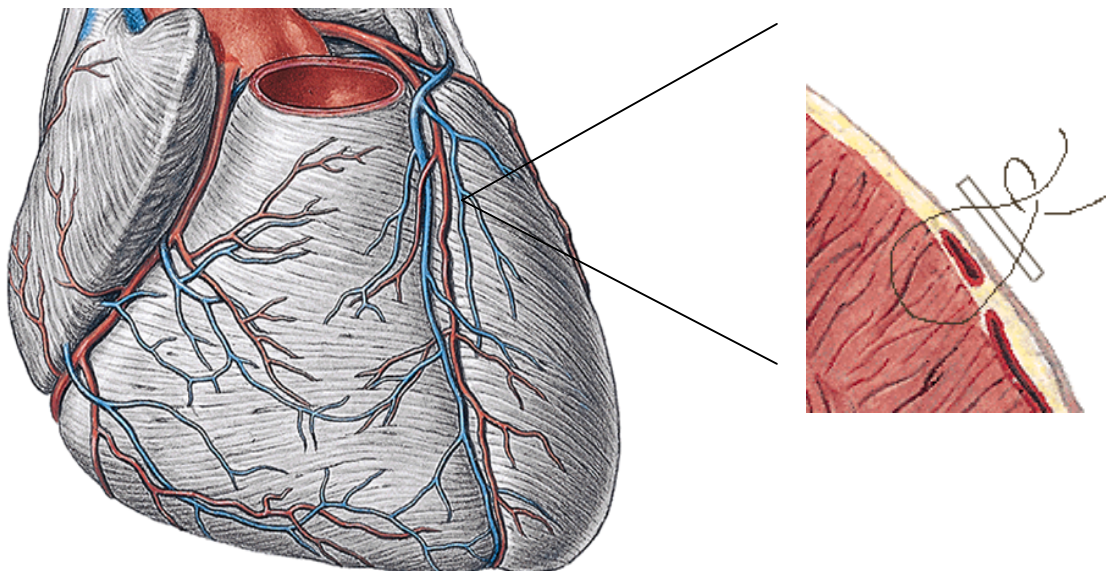


Abbildung 3 : Ligatur des Ramus interventricularis anterior . Beschreibung siehe oben.
Modifizierte Methode nach Pfeffer M.A 1979, 1991 und Gaudron P. 1994

2.1.4.2 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, genau wie oben bereits 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-Pleget 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-Verfahren mit Ausnahme einer Verknüpfung des ebenfalls im Myokard eingebrachten Monofilfadens durchgeführt.

2.1.5 Hämodynamische Messungen

12 Wochen nach Infarkt wurden im Rahmen einer Operation 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., 1972-79 sowie Fletcher et al. 1981 erstmals beschriebenen Methodik bestimmt (34,35,39,40). Im folgenden Abschnitt möchte ich den Operations-Ablauf nochmals kurz darstellen:

Zunächst wurden die Tiere in einem äthergetränkten Glasgefäß in Narkose versetzt. Die Tiefe der Narkose konnte hierbei von außen aufgrund Verfolgung des Bewegungsdranges sowie durch genaue Beobachtung der Atemfrequenz und der Thoraxexkursion eingeschätzt werden. Nach Erreichen einer ausreichenden Narkosetiefe wurde das Tier – nach letzter Messung des Körpergewichtes – 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 Arteria 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 Carotiskatheter 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 plziert, 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 (SAP (mmHg), DAP (mmHg), MAP (mmHg), HR (1/min)) (39).

Nun wurde nach Registrierung der Kontroll-Druckwerte des linken Ventrikels – 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. 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 (DEVP_{max} (mmHg)).

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 wiederholt (LVEDP (mmHg), EDV, (34)).

2.1.6. Druck Volumen Kurve (PVC)

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 (35).

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 μ l/sec aufgezeichnet.

Nach Registrierung derselbigen 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.

Auch wurden zum Schluss der hämodynamischen Messung dem Tier einige ml Blut entnommen. Dieses wurde bei 3°C und 14.000 Umdrehungen eine Minute lang zentrifugiert. Dann wurde das Serum abpipetiert und sofort in flüssigem Stickstoff gefroren. Der Plasmarest wurde verworfen.

2.1.7 Fixierung, Präparation, Infarktgrößenbestimmung

Präparation der histologischen Schnitte

Die Geweberinge wurden in Tissue-Tek (Sakura, Netherlands) gebettet und mittels Gefriermikrotom (Leica CM 1850) bei -23°C serienweise in 10 Schnitte mit jeweils 7 μ m Schichtdicke zerlegt. Die Kryoschnitte wurden auf Objektträgern fixiert und eingefärbt. Es 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:

He Färbung

1. Entparaffinieren in Xylol oder Roticlear, dann absteigende Alkoholreihe, kurz in Aqua dest. spülen
2. 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) , Alkoholreihe mit jeweils 100 % Alkohol tauchen und sofort in Xylol (jeweils 5 min.), mit Entellan oder Eucid eindecken.

Verwendete Reagenzien:

Hämalaun nach Mayer

6g	Hämatoxylin	(Fa. Roth)
1g	Natriumjodat	(Fa. Merck)
250g	Aluminiumkaliumsulfad	(Fa. Merck)
250g	Chloraldehyd	(Fa. Merck)
5g	Zitronensäure	(Fa. Merck)

auf 5000 ml mit Aqua dest. auffüllen

Eosin

1g	Eosin	(Fa. Merck)
----	-------	-------------

auf 100 ml mit Aqua dest. Auffüllen (1 % ig)

PSR (Pikro-Sirius-Red) Färbung

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

Verwendetes Reagenz:

Gesättigte Pikrinsäure, Sirius-Red 1 % ig

90 ml Pikrinsäure + 10 ml Sirius-Rot mindestens 24 Std. vor Gebrauch ansetzen

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 war 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 (38).

2.1.8. Einteilung der Infarktgruppen

Einer differenzierten Auswertung der Ergebnisse diente die Einteilung der Tiere in drei Gruppen nach der Infarktgröße.

1. Kontrolltiere mit einer relativen Infarktgröße von 0-5 % (n=15)
2. Tiere mit großen Infarkten; Infarktgröße > 45 % (n=30)

2.1.9. 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.

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: $t(sec) \cdot 0.013 (ml/sec)$. Zu diesem Ergebnis muß dann noch das Volumen des eingeführten Katheters als $[Katheterlänge (mm) \cdot 0.00285 ml/mm]$ addiert werden.

Die Steifigkeitskonstanten für den linearen Kurvenabschnitt der Druck-Volumen-Kurve (PVC) wurden nach der Formel $Druck=I+Vol \cdot S$ 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 $Druck=I \cdot Exp(Vol \cdot S)$ Verwendung; wiederum entspricht S der Steifigkeitskonstanten.

2.1.10. Statistische Auswertung

Alle Daten sind als arithmetisches Mittel $T \pm$ Standardfehler (SEM) angegeben. Unter der Voraussetzung einer Normalverteilung wurden die Gruppen mit Hilfe der Varianzanalyse verglichen, anschließend wurden die multiplen Vergleiche zwischen den Gruppen nach Bonnferroni korrigiert. Für einfache Vergleiche wurde ein Wahrscheinlichkeitswert $p < 0.05$, für multiple Vergleiche ($=n$) ein Wahrscheinlichkeitswert $p < 0,05/n$ für die Nullhypothese als signifikant gewertet. Die Regressionsanalyse

der Proteinlevel mit hämodynamischen oder morphologischen Parametern wurde mit Hilfe von ANOVA (SuperANOVA™, Abacus Concepts, Inc., Berkley, CA, USA) analysiert und Wahrscheinlichkeitswerte $p < 0,05$ als statistisch signifikant erachtet. Alle werte und Signifikanzlevel wurden mit Hilfe der Stat-View 5.0 Software (SAS institute, Cary, NC) berechnet.

2.2 Proteinbiochemischer Teil

2.2.1. Western Blot:

Im Folgenden wird die Vorgehensweise zur Bestimmung von Proteinen mit Hilfe des Western Blots beschrieben.

Untersucht und nachgewiesen wurden in dieser Arbeit folgende Proteine:

Kollagen-1

Kollagen-3

Fibronectin

Vitronectin

Matrix-Metalloproteinase-1 (MMP-1)

Matrix-Metalloproteinase-2 (MMP-2)

Matrix-Metalloproteinase-9 (MMP-9)

Matrix-Metalloproteinase-13 (MMP-13)

Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1 (TIMP-1)

Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-2 (TIMP-2)

Die Analyse gliedert sich in folgende Schritte:

2.2.1.1 Gewebeaufbereitung und Präparation

Zur Anwendung kommen Gewebeproben des nicht infarzierten Restmyokards des linken Ventrikels.

Zu Beginn der Aufarbeitung werden aus den bei -80°C gelagerten Gewebeproben ca. 80-120 mg schwere Stücke in 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 zugefügt, sowie kurz vor der Homogenisierung Oxalacetat und PMSF. Das Gewebe wird im Dounce Glaskolben ca. 1 min auf Eis homogenisiert, bis optisch keine Gewebestücke mehr sichtbar sind. Anschließend inkubiert die Lösung 20 min auf Eis.

Jetzt wird das Homogenisat mit einer Plastikpipette in ein Zentrifugenröhrchen transferiert und bei 4°C 10 min bei 14000 G zentrifugiert. Das Supernatant wird anschließend ohne das Pellet zu mobilisieren entfernt und in ein neues Röhrchen

gegeben, zusammen mit der gleichen Menge an 2-fach SDS-Sample Buffer. Beides wird vermischt und auf Eis gelagert.

Das verbleibende Pellet wird mit ca. 1ml Triton Puffer (einschl. Inhibitoren) gewaschen, dann mit Hilfe einer Nadel (Blau, 23g) und einer 1ml Insulin-Spritze mobilisiert, zerkleinert, und durch die Scherkräfte beim Einsaugen vollständig gelöst. Die Lösung wird erneut 10 min bei 4°C und 14000 G zentrifugiert. Das Supernatant wird vorsichtig ausgekippt; das Pellet sollte jetzt weiß sein, falls es noch rötlich oder rosa ist, muss es erneut gewaschen werden. Das Pellet wird dann in 1 fach SDS Buffer aufgelöst; dies geschieht wieder mit Hilfe einer Nadel (Blau, 23g) und einer 1ml Insulin-Spritze, sowie eines Ultrasonicators.

Nachdem beide Fraktionen in SDS Buffer gelöst sind werden sie nun für ca. 5 min. bei 95°C gekocht und anschließend eingefroren und bei -80°C gelagert oder nach Abkühlung direkt auf das Gel geladen.

Hierzu wurden folgende Reagenzien verwendet:

2% Tris-Triton Lysis Buffer

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

pH auf 7,4 einstellen und bei 4°C lagern

SDS-Sample Buffer mit 2 % SDS-Konzentration

1.Vorbereitung:	1.1 20 % SDS:	20g SDS in 100ml steriles Wasser
	1.2 0,2 M Tris Base:	242mg auf 10ml Wasser
	+0.02M EDTA:	74mg auf 10 ml Wasser
		pH auf 8.0 einstellen.

2. Pipettierschema:

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

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°C aufbewahren.

Inhibitoren:

EDTA (Fa. Sigma), unselektiver Metalloprotease-Inhibitor

PMSF (Fa. Sigma), irreversibler Serinprotease-Inhibitor

Ocadaic Acid (Fa. Calbiochem), Serin- und Threoninphosphatase-Inhibitor

Sodium Vanadate (NaVO₃, Fa. Sigma), Thyrosinphosphatase-Inhibitor

2.2.1.2 Proteincharakterisierung mittels Gelelektrophorese

Es werden die Proteine verwendet, deren Aufbereitung unter Punkt 1 beschrieben ist.

Diese werden mittels Gelelektrophorese ihrer Größe nach aufgetrennt und sind so einer genaueren Untersuchung zugänglich. Hierzu wird als erstes aus Monomeren ein hochvernetztes Polyacrylamidgel 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 zwei 18x16cm große 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 Sandwiches zu verhindern wird das Ganze durch zwei Klemmen gesichert. Die Klammern werden über den Rand mit den Platzhaltern geführt und handfest verschraubt. 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 Polyacryamidgels blasenfrei eingefüllt. (Herstellung und Reagenzien s.u.)

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.

Nun wird das Gel für den Staker angesetzt. (Herstellung und Reagenzien s.u.)

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 (Herstellung und Reagenzien s.u.) aufgefüllt.

Nun werden die bei -80°C eingefrorenen Proteinproben bei Raumtemperatur aufgetaut und für 5 min bei 95°C gekocht. Danach mit 14000 U/min für eine Minute zentrifugiert. Es ist sinnvoll bei jedem Gel eine Positivkontrolle mitlaufen zu lassen. Hierfür werden 18 μl SDS mit 6 μl des jeweiligen Markers gemischt. Zur Bestimmung des Molekulargewichtes werden jeweils 20 μl eines Rainbowmarkers in die äußersten Taschen des Gels gegeben. Dieser wird aus 70 μl Rainbowmarker (Firma Amersham) und 20 μl SDS hergestellt.

Von den Proben werden nun mit einer Mikrospritze jeweils 20 μl in eine Geltasche geladen. Auf den Oberrand des Gelsandwiches wird die obere Pufferkammer gesteckt

und mit zwei Bolzen gesichert. Gel und obere Pufferkammer werden aus der Halterung genommen und in die bis zur Hälfte mit Runningpuffer gefüllte untere Pufferkammer gestellt. Die obere Pufferkammer wird ebenfalls mit Runningpuffer gefüllt und mit dem entsprechenden Deckel verschlossen. Die Box wird anschließend 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 Nitrozellulosemembran übertragen werden können.

Polyacryamidgel:

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

Staker:

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

Runningpuffer:

24 g	Tris-Base	(Firma Sigma)
116g	Glycine	(Firma Sigma)

20ml SDS 20% (Firma Sigma)
4 Liter sterilem Wasser

2.2.1.3 Geltransfer

Die Proteine werden nun im Verfahren nach Western vom Polyacrylamidgel auf eine PVDF-Membran geblottet. Hierzu wird eine auf das Gel zugeschnittene Membran in einer Schale mit Methanol für 5 min. inkubiert. Anschließend wird diese für weitere 5 min. mit Transfferpuffer gewaschen (Herstellung und Reagenzien s.u.).

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 Transfferpuffer getränktes Blotting-Papier, die Membran, sowie das Gel aufeinandergelegt werden. Es ist wichtig, dass sich zwischen den einzelnen Lagen keine Luftblasen befinden und die einzelnen Blätter gut mit Transfferpuffer benetzt sind. Nach diesem Schema können bis zu vier Gele transferiert werden, wobei zwischen die einzelnen Sandwiches 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 Ohm. Bei vier Gelen sollte eine Laufzeit von vier Stunden nicht unterschritten werden, um einen ausreichenden Übertrag der Proteine auf die Membran zu erzielen.

Transfferpuffer

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

2.2.2 Immunoblot

Ziel der weiteren Bearbeitung der Membranen ist es, die Proteine, die nachgewiesen werden sollen darzustellen und zu quantifizieren. Hierzu bedient man sich immunologischer Methoden. Proteine stellen als Makromoleküle antigene Determinanten dar, die spezifisch von monoklonalen Maus-Antikörpern oder polyklonalen Kaninchen Antikörpern erkannt werden. Die Immunglobuline stammen für diese Arbeit von immunisierten Kaninchen oder Mäusen von verschiedenen Firmen. (siehe Übersichtstabelle)

Zunächst wird die Membran mit einer 10 %igen Lösung aus 2g Magermilchpulver und 20ml TBST geblockt. Die Antikörper werden entsprechend der unten aufgeführten Tabelle in 15ml TBST gelöst und mit der PMDE –Membran in einem Schälchen auf einer Rüttelplatte über Nacht inkubiert.

Zielprotein	Firma	Antikörperart
Fibronectin	Sigma	Maus
Vitronectin	Chemicon	Maus
Collagen-1	Abcom	Kaninchen
Collagen-3	Abcom	Kaninchen
MMP-1	Chemicon	Maus
MMP-2	Sigma	Kaninchen
MMP-13	Sigma	Kaninchen
MMP-9	Sigma	Kaninchen
TIMP-1	Chemicon	Maus
TIMP-2	Chemicon	Maus

Tabelle 1

Übersichtstabelle der verwendeten Antikörper zum Nachweis der Zielproteine.

Die Antikörperlösung wird danach abgegossen und die Membran dreimal für 5 min. in TBST gewaschen. Um den ersten Antikörper sichtbar zu machen wird ein zweiter Antikörper in einer Konzentration von 1:8000 verwendet, der spezifisch an Immunglobuline der Maus oder der Ratte bindet. Entsteht der erste Antikörper der Maus, wird ein Anti-Maus-Antikörper verwendet, entsprechendes gilt bei der Ratte. 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.

2.2.3 Auswertung

Die Membran wird nun mit Chemi-Glow (Biozym, Hess. Oldendorf, Germany) benetzt und in die an einen Rechner gekoppelte Multiimage FC Cabinet (Fluor Chem, Alpha Innotech Corporation, San Leandro, CA, USA.) gegeben, unter Sicht werden Größe und Position der Membran justiert, dann wird eine Serienaufnahme (Movie Mode) der gesamten Membran mit einer 12-bit CCD-camera (Chemi Imager 5500 from Alpha Innotech, San Leandro, CA, USA) gestartet. Es werden dabei 10 Bilder mit einer Belichtungszeit von 20 sec überlagernd aufgenommen und abgespeichert. Eine Aufnahme wird als endgültiges Bild getrennt zur späteren Auswertung abgespeichert.

Im nächsten Schritt werden die Rainbow-Markerbanden fotografiert und die Laufgeschwindigkeit der Proteine durch Proteingewicht (K) und Marker-Farbe festgestellt. Dieses Bild wird als Overlay abgespeichert und anschließend über das Final gelegt. Somit können die Banden des Membranstücks den jeweiligen Kilodalton und dadurch den einzelnen Proteinen zugeordnet werden.

Später wird das Finalbild mit Hilfe der Image Analysis Tools in ToolBox (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 (7 Kästchen =100%) und absolut ausgewertet. Diese Werte werden durch Auto Background um das Hintergrundrauschen berichtigt. Die SpotDenso Results werden wiederum getrennt abgespeichert und dienen zur Bestätigung der optisch sichtbaren Tendenzen.

2.2.4 Enzymhistochemie

Die Gewebeproben des linken Ventrikels wurden noch einer enzymhistochemischen Untersuchung unterzogen, um die Lokalisation der jeweiligen Metalloproteasen (MMP's), der Timp's, sowie des Kollagens, des Fibronektins und des Vitronektins im Gewebe zu bestimmen. Das Prinzip dieser Methode besteht darin, zunächst die Kardiomyozyten anzufärben und anschließend das zu untersuchende Enzym mittels eines spezifisch bindenden Antikörpers zu identifizieren. In einem zweiten Schritt wird dann der zuvor aufgebrauchte Antikörper mittels eines Fluoreszenzmarkers sichtbar

gemacht und ist so einer Auswertung unter dem Polarisationsmikroskop zugänglich. Für die Untersuchung werden die Gewebeprobe 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 und TBST gelegt und anschließend zwei mal mit TBS gewaschen. Die Objektträger werden danach getrocknet und die Schnitte mit einem PAP- Pen umkreist. Im nächsten Schritt werden die Proben mit 10 %igem Donkey Serum (gelöst in TBSA) für 1-2 Stunden geblockt. Nach der Gewebepreparation wird nun der erste Antikörper aufgebracht und für ca. 12 Stunden bei 4°C inkubiert.

Wenn die Immunglobuline fest gebunden sind 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. Anschließend werden die Gewebeschnitte wiederum dreimal mit TBST gewaschen. In den nächsten beiden Schritten werden die Proben zunächst mit Alexa 546-phalloidin in einer Konzentration von 1:40 für 20 min inkubiert, nach dreimaligem Waschen mit TBST wird schließlich noch mit DAPI (1:500) für 5 min., oder mit YoYo (1:1000) für 1 min. inkubiert und letztmals dreimal mit TBST gewaschen. Auf die nun fixierten und gefärbten Schnitte werden mit Prolog Antifade Deckgläser montiert, welche über Nacht abgedeckt trocknen sollen. Diese werden schließlich noch mit Nagellack versiegelt. Die weitere Auswertung erfolgt unter dem Polarisationsmikroskop.

3. Ergebnisse

Bei dieser Arbeit wurde das Tiermodell der Ratte für den chronischen Myokardinfarkt verwendet und dahingehend modifiziert, dass man zu genau definierten Zeitpunkten nach Myokardinfarkt das Infarktareal durch eine Wiedereröffnung des vorher verschlossenen Gefäßes reperfundieren konnte. In dieser Studie wurde als Reperfusionzeitpunkt der bereits genau beschriebene Zeitpunkt für eine Reperfusion 2 Stunden (2 hours) nach Infarkt, sowie der bisher noch nie beschriebene Zeitpunkt 3 Tage (3 days) nach Infarkt gewählt.

Im Folgenden werden die Einzelergebnisse der Studie dargestellt:

3.1 Infarktgröße, Körpergewicht, Herzgewicht und Lungengewicht

	Sham	Permanent	2 hours	3 days
MI Size (%)	0 (n=15)	52±1 (n=9)	50±1 (n=9)	52±1 (n=12)
BW (g)	271±5	280±5	277±6	283±6
LV/BW (mg/g)	2.44±0.05	2.34±0.09	2.66±0.11*†	2.42±0.08‡
RV/BW (mg/g)	0.55±0.02	1.13±0.08*	0.79±0.07*†	1.11±0.07‡
Lung/BW (mg/g)	6.08±0.30	12.31±1.96*	8.47±0.99*†	9.75±0.73*†

Tabelle 2, Beschreibung:

- Sham, scheinoperierte Tiere ohne Infarkt;
- Permanent, Tiere mit Myokardinfarkt ohne Reperfusion
- 2 h, Tiere mit Myokardinfarkt und Reperfusion nach zwei Stunden 3 d, Tiere mit Myokardinfarkt und Reperfusion nach drei Tagen
- MI, Myokardinfarkt; MI (%), Infarktfläche in %, n, Zahl der Tiere pro Gruppe.
- BW, body weight, Körpergewicht
- LV, left ventricular weight, LV, linker Ventrikel
- RV, right ventricular weight, RV, rechter Ventrikel
- Lung, Lungengewicht
- Die Messwerte sind als Mittelwert ± Standardfehler angegeben.
*P<0.05 vs. Sham; † vs. Permanent; ‡ vs. 2 hours reperfusion.

Bei der durchschnittlichen Myokardinfarktgröße zeigt sich in den verschiedenen Gruppen im Mittel ein einheitliches Bild. Die Reperfusion hat also keinen Einfluss auf die Infarktgröße.

Auch das Körpergewicht ist nach 12 Wochen bei allen Gruppen einheitlich. Vor Beginn der Studie lag das Körpergewicht zwischen 220 und 240g, im Mittel bei 229g.

Bei Betrachtung der Gewichtsindizes des linken und rechten Ventrikels fällt folgendes auf. Der Gewichtsindex des linken Ventrikels zeigt bei 2 Stunden Reperfusion eine signifikante Zunahme gegenüber Permanent-Tieren, wohin gegen der Gewichtsindex des rechten Ventrikels bei 2 Stunden Reperfusion signifikant gegenüber Permanent-Tieren abnimmt.

Dieser Effekt ist bei einer Reperfusion nach 3 Tagen nicht mehr zu sehen. Hier ergibt sich keine Veränderung gegenüber der Permanent-Kontrollgruppe.

Außerdem zeigt sich bei allen Infarkt-Gruppen eine signifikante Gewichtszunahme des rechten Ventrikels gegenüber Sham-Tieren.

Das Lungengewicht in Bezug auf das Körpergewicht als Anzeiger für eine Herzinsuffizienz liegt in allen drei Infarktgruppen im Vergleich zu den jeweiligen Sham-Tieren signifikant erhöht vor. Sowohl eine Reperfusion nach 2 Stunden als auch eine Reperfusion nach 3 Tagen bewirkt eine signifikante Abnahme des Lungengewichts gegenüber Permanent-Tieren.

3.2 Hämodynamik

Bezüglich der Hämodynamik wurden folgende Einzelergebnisse erhoben:

	Sham	Permanent	2 hours	3 days
LVSP (mmHg)	145±3	125±6*	131±8*	121±3*
LVEDP (mmHg)	8.2±0.9	36.5±4.8*	28.3±5.2*	33.6±4.8*
HR (min-1)	333±7	320±12	327±16	311±3
dP/dt_{max} (mmHg/sx10³)	10.9±0.5	7.7±0.8*	7.8±0.8*	7.1±0.6*
RAP (mmHg)	1.1±0.3	4.3±1.3*	3.1±0.7*	3.5±0.6*
CI (ml/kg)	271±13	188±22*	180±15*	179±17*
SVI (ml/kg)	0.81±0.04	0.60±0.08*	0.56±0.06*	0.58±0.06*
TPRI (ml/kg)	0.46±0.02	0.62±0.07*	0.66±0.06*	0.64±0.07*

Tabelle 3, Beschreibung:

- LVSP, left ventricular systolic pressure, linksventrikulärer systolischer Druck.
- LVEDP, left ventricular end-diastolic pressure, linksventrikulärer enddiastolischer Druck.
- HR, heart rate, Herzfrequenz.
- dP/dt_{max} Geschwindigkeit der linksventrikulären Anspannung.
- RAP, right atrial pressure, rechter Vorhofdruck.
- CI, cardiac index, Herzindex, Herzminutenvolumenindex.
Verhältnis Herzminutenvolumen zum Körperobergewicht
- SVI, stroke volume index, Schlagvolumenindex.
Verhältnis Schlagvolumen zum Körpergewicht.
- TPRI, total peripheral resistance index, total peripherer Widerstandsindex.
Verhältnis totaler peripherer Widerstand zum Körpergewicht.
- Die Messwerte sind als Mittelwert ± Standardfehler angegeben. *P<0.05 vs Sham; † vs. Permanent; ‡ vs. 2 hours reperfusion.

Der linksventrikuläre systolische Druck als Parameter für die Nachlast (afterload) des Herzens zeigt bei allen Infarktgruppen einen signifikanten Abfall. Jedoch verbessert sich die Druckentwicklung bei einer Reperfusion nach 2 Stunden tendenziell im

Vergleich zur Permanent-Kontrollgruppe. Eine Reperfusion nach 3 Tagen bringt keine Verbesserung der Druckentwicklung.

Der linksventrikuläre enddiastolische Druck, ein Maß für die Vorlast (preload) des Herzens, steigt nach Infarkt hochsignifikant im Vergleich zu Sham-Tieren an. Auch hier bewirkt eine Reperfusion nach 2 Stunden eine tendenzielle Verbesserung der Druckentwicklung gegenüber der Permanent-Kontrollgruppe. Eine Reperfusion nach 3 Tagen zeigt allerdings nur noch sehr abgeschwächte Tendenzen hin zu einer Verbesserung der Druckentwicklung.

Die Herzfrequenz der Tiere war nach 12 Wochen in allen Gruppen nahezu gleich hoch. Aufgrund der hohen Streubreite der Werte innerhalb der Gruppen sind auch keine Tendenzen ersichtlich.

Die Geschwindigkeit der linksventrikulären Anspannung als Maß für die Kontraktilität in der isovolumetrischen Anspannungsphase und die Relaxationsfähigkeit des Gewebes in der Diastole ist nach Infarkt bei allen Gruppen signifikant erniedrigt. Im Vergleich der Infarktgruppen untereinander lässt sich keine Veränderung der Geschwindigkeit der linksventrikulären Anspannung durch eine Reperfusion ersehen.

Der rechte Vorhofdruck zeigt nach Infarkt eine signifikante Steigerung gegenüber sham-operierten Tieren. Die Reperfusion nach 2 Stunden bewirkt ebenso wie eine Reperfusion nach 3 Tagen eine tendenzielle Abnahme des rechten Vorhofdruckes gegenüber der Permanent-Kontrollgruppe.

Der Herzminutenvolumenindex nimmt 12 Wochen nach Infarkt bei allen Gruppen signifikant gegenüber sham-operierten Tieren ab. Durch eine Reperfusion lässt sich keine Veränderung des Herzminutenvolumenindex gegenüber der Kontrollgruppe nachweisen.

Der Schlagvolumenindex nimmt nach Infarkt bei allen Gruppen signifikant gegenüber sham-operierten Tieren ab. Durch eine Reperfusion lässt sich keine Veränderung des Schlagvolumenindex gegenüber der Kontrollgruppe nachweisen.

Der Index des totalen peripheren Widerstandes nimmt bei allen Gruppen nach Infarkt signifikant gegenüber sham-operierten Tieren zu. Eine Reperfusion nach 2 Stunden oder 3 Tagen führt zu keiner Veränderung gegenüber der Permanent-Kontrollgruppe.

3.3 Morphologie

Bezüglich der Morphologie wurden folgende Einzelergebnisse erhoben:

	Sham	Permanent	2 hours	3 days
Free Wall (mm)	2.16±0.13	0.70±0.07*	1.37±0.19* †	0.91±0.06* ‡
Septum Thickness (mm)	2.33±0.13	3.37±0.32*	3.06±0.17*	2.92±0.14*
LV Cavity Area (mm²)	7.8±0.8	28.5±2.8*	20.4±2.2*†	24.1±2.3*
Total LV area (mm²)	55.2±2.4	71.2±6.2*	66.9±3.2*	67.3±2.1*
Infarct Expansion Index	0.2±0.0	2.1±0.3*	0.8±0.1*†	1.2±0.1*†

Tabelle 4, Beschreibung:

- Free Wall, Myokard- bzw. Narbendicke
- Septum Thickness, Septumdicke
- LV cavity area, linksventrikuläres Hohlvolumen
- LV total area, linksventrikuläres Gesamtvolumen;
- Infarct Expansion Index
- Die Messwerte sind als Mittelwert ± Standardfehler angegeben.
*P<0.05 vs Sham; † vs. Permanent; ‡ vs. 2 hours reperfusion.

Nach Infarkt zeigt sich bei allen Gruppen eine signifikante Abnahme der Myokarddicke bzw. Narbendicke gegenüber Sham-operierten Tieren. Bei einer Reperfusion nach 2 Stunden hat allerdings die Narbendicke signifikant gegenüber Permanent-operierten Tieren zugenommen. Dies gilt tendenziell auch für die Reperfusion nach 3 Tagen, jedoch ist die Veränderung nicht so deutlich ausgeprägt.

Bei der Septumdicke zeigt sich ein Trend hin zu einer geringeren Septumdicke bei Reperfusion im Vergleich zur Kontrollgruppe. Außerdem zeigt sich bei allen Infarktgruppen eine signifikante Zunahme der Septumdicke im Vergleich zu Sham-operierten Tieren.

Beim linksventrikulären Hohlvolumen zeigt sich eine deutliche Zunahme in den Infarktgruppen gegenüber Sham Tieren. Auch hier verringert eine Reperfusion nach 2 Stunden die Volumenzunahme signifikant, die Reperfusion nach 3 Tagen zeigt ebenfalls noch eine tendenzielle Verringerung gegenüber der Permanent-Kontrollgruppe.

Das Gesamtvolumen des linken Ventrikels (inklusive Free wall und Septum) ist bei allen Gruppen gegenüber der Sham-Gruppe signifikant vergrößert. Durch die Reperfusion lässt sich die Volumenzunahme nur geringfügig verringern.

Die Infarktausdehnung wird durch eine Reperfusion nach 2 Stunden wie nach 3 Tagen gegenüber Permanent-Tieren signifikant begrenzt. Dieser Effekt ist nach 2 Stunden stärker ausgeprägt als nach 3 Tagen. Alle Gruppen zeigen erwartungsgemäß eine deutliche Zunahme gegenüber sham-operierten Tieren.

3.4 Passive Volumen Kurve

Folgende Tabelle beschreibt die Druckbelastung des linken Ventrikels, die durch die passive Druck-Volumen-Beziehung ausgedrückt wird:

	Sham	Permanent	2 hours	3 days
0 mmHg	0.173±0.026	0.198±0.069	0.177±0.031	0.404±0.091*†‡
2.5 mmHg	0.601±0.052	0.958±0.144*	0.952±0.103*	1.185±0.112*
5 mmHg	0.967±0.074	1.584±0.135*	1.483±0.142*	1.640±0.126*
10 mmHg	1.376±0.083	2.209±0.124*	1.992±0.155*	2.099±0.136*
15 mmHg	1.598±0.084	2.491±0.118*	2.231±0.159*	2.336±0.143*
20 mmHg	1.736±0.084	2.666±0.115*	2.383±0.160*	2.482±0.147*
30 mmHg	1.907±0.082	2.877±0.115*	2.576±0.164*	2.680±0.154*

Tabelle 5, Beschreibung:

linksventrikuläre Füllungsvolumina in den einzelnen Druckabschnitten der Druck-Volumen-Kurve, Volumen (ml) bezogen auf ein kg Körpergewicht unter Druckbelastung von 0-30 mmHg, Die Messwerte sind als Mittelwert ± Standardfehler angegeben.

*P<0.05 vs Sham; † vs. Permanent; ‡ vs. 2 hours reperfusion.

Das Volumen bei 0 mmHg nimmt in allen Infarktgruppen im Vergleich zur Sham-Gruppe tendenziell zu. Eine signifikante Volumenzunahme zeigt sich nach 3 Tagen Reperfusion im Vergleich zu allen anderen Gruppen.

Das Volumen des linken Ventrikels ist bei 2.5 mmHg für alle Infarktgruppen gegenüber der Sham-Gruppe signifikant erhöht. Die überproportionale Steigerung der Gruppe mit 3 Tagen Reperfusion bei 0 mmHg geht bei 2.5 mmHg deutlich zurück.

Ab einem Volumen von 5 mmHg setzt sich auch für die folgenden Volumina 10 mmHg, 15 mmHg, 20 mmHg und 30 mmHg ein einheitlicher Trend fort.

Alle Infarktgruppen zeigen eine signifikante Volumenzunahme gegenüber Sham-Tieren, bei einer durchgeführten Reperfusion zeigt sich eine tendenzielle Volumenabnahme gegenüber Permanent-Tieren, wobei dieser Effekt bei Reperfusion nach 2 Stunden stärker ausgeprägt ist als bei einer Reperfusion nach 3 Tagen.

3.5 Steifigkeitskonstanten

Im Bezug auf die linksventikuläre Kammersteifigkeit ergaben sich folgende Einzelkonstanten:

	Sham	Permanent	2 hours	3 days
K0 (0-30 mmHg)	6.9±0.2	4.7±0.2*	5.7±0.2	6.2±0.5
K1 (0-3 mmHg)	24.3±2.6	11.2±0.7*	12.8±1.7*	12.8±1.2*
K2 (3-10 mmHg)	6.5±0.3	3.9±0.2*	5.0±0.3*	5.6±0.4†
K3 (10-20 mmHg)	7.3±0.3	5.5±0.3*	6.5±0.2	6.8±0.5
K4 (20-30 mmHg)	8.9±0.5	6.9±0.3*	7.5±0.2	7.7±0.5

Tabelle 6, Beschreibung:

- K0-K4, Errechnete Steifigkeitskonstanten der Druck-Volumen-Kurven,
- K0, Steifigkeitskonstante für die gesamte Druck-Volumen-Kurve;
- K1, Steifigkeitskonstante von 0-3 mmHg;
- K2, Steifigkeitskonstante von 3-10 mmHg usf.
- Die Messwerte sind als Mittelwert ± Standardfehler angegeben.
*P<0.05 vs. Sham; † vs. Permanent; ‡ vs. 2 hours reperfusion.

Bei Betrachtung der Steifigkeitskonstanten soll zuerst auf die errechnete Kammersteifigkeit für die gesamte Druck-Volumen-Kurve im Bereich zwischen 0 und 30 mmHg eingegangen werden, danach werden die Verhältnisse bei den einzelnen Druckabschnitten besprochen. Prinzipiell lässt sich sagen, dass ein hoher Wert der Steifigkeitskonstante mit den physiologischen Bedingungen des Herzens korreliert.

Nach Berechnung der Gesamtsteifigkeitskonstante K0 für den Bereich zwischen 0 und 30 mmHg wird ersichtlich, dass tendenziell bei allen Infarktgruppen im Vergleich zu Sham-Tieren die Steifigkeit nachlässt, signifikant ist dieser Unterschied allerdings nur bei Permanent-Tieren. Anders ausgedrückt bedeutet dies natürlich, dass eine

Reperfusion nach 2 Stunden und selbst noch eine Reperfusion nach 3 Tagen die Steifigkeit tendenziell verbessert.

Im linearen Kurvensegment zwischen 0 und 3 mmHg, was der frühen Füllungsphase entspricht, ist nun der Rückgang der Kammersteifigkeitskonstante K_1 bei allen Infarktgruppen signifikant ausgeprägt. Eine Reperfusion kann die Steifigkeit gegenüber permanent infarzierten Tieren nur tendenziell verbessern.

Im logarithmischen Abschnitt zwischen 3 und 10 mmHg, was der Niedrigdruck-Phase entspricht, zeigt sich nur noch bei der Permanent-Gruppe und bei Tieren mit 2 Stunden Reperfusion eine signifikante Abnahme der Steifigkeitskonstante K_2 . Bei der Reperfusion nach 3 Tagen ist diese Entwicklung nur noch tendenziell vorhanden. Jedoch verbessert eine Reperfusion nach 3 Tagen die Steifigkeit gegenüber Permanent Tieren signifikant.

Im logarithmischen Abschnitt von 10–20 mmHg ist nur noch die Steifigkeit der Tiere der Permanent-Gruppe gegenüber Sham-Tieren signifikant erniedrigt. Die beiden Reperfusiongruppen verbessern die Steifigkeitskonstante K_3 gegenüber der Permanent-Gruppe nur noch tendenziell.

Ein Blick auf den Abschnitt von 20-30 mmHg, den Bereich der Hochdruckphase, lässt erkennen, dass sich die Tendenzen des Abschnitts von 10-20 mmHg fortsetzen.

3.6 Arbeitsvolumen, Arbeitsvolumenindex, Wandstress und Auswurf- fraktion

Bei den folgenden Tabellen handelt es sich um errechnete Parameter der hämodynamischen Messungen:

	Sham	Permanent	2 hours	3 days
Operating volume index (ml/kg)	1.21±0.11	2.79±0.16*	2.58±0.28*	2.71±0.16*
Operating volume/ Lv weight (ml/g)	0.49±0.04	1.21±0.09*	0.98±0.12* (p=0.06 vs P)	1.13±0.07*
Wall stress	7.77±1.40	69.92±10.39*	50.73±12.07*	64.45±10.17*
EF	0,72558	0,23363	0,46681	0,21798

Tabelle 7, Beschreibung

- Operating volume index, Arbeitsvolumenindex, Verhältnis Arbeitsvolumen zum Körpergewicht
- Operating volume/ Lv weight, Verhältnis Arbeitsvolumen zum linksventrikulären Gewicht
- Wall stress, Wandstress
- EF, Ejection Fraction, Auswurfraction,
- Die Messwerte sind als Mittelwert ± Standardfehler angegeben.
*P<0.05 vs Sham; † vs. Permanent; ‡ vs. 2 hours reperfusion.

Das Arbeitsvolumen steigt bei allen Gruppen nach Infarkt signifikant im Vergleich zu Sham Tieren an. Durch eine Reperfusion nach 2 Stunden zeigt sich nach 12 Wochen eine leichte Tendenz der Verbesserung des Arbeitsvolumens gegenüber der Permanent-Kontrollgruppe. Eine Reperfusion nach 3 Tagen bewirkt hingegen keine Verbesserung.

Das Verhältnis Arbeitsvolumen zum linksventrikulären Gewicht ist bei Tieren mit Infarkt signifikant erhöht gegenüber Sham Tieren. Durch eine Reperfusion nach 2

Stunden lässt sich beinahe eine signifikante Verbesserung des Verhältnisses Arbeitsvolumen zu linksventrikulärem Gewicht gegenüber der Permanent-Kontrollgruppe erzielen. Leider erreicht der Wert nicht ganz das Signifikanzniveau. Eine Reperfusion nach 3 Tagen führt nur noch zu einer geringen tendenziellen Verbesserung.

Der Wert für den Wandstress erhöht sich bei allen Infarktgruppen signifikant gegenüber den sham-operierten Tieren. Jedoch zeigt auch hier eine Reperfusion nach 2 Stunden eine positive Tendenz hin zu niedrigeren Werten gegenüber der Permanent-Kontrollgruppe. Diese Tendenz zeigt sich immer noch, wenn auch nur schwach, bei einer Reperfusion nach 3 Tagen.

3.7 Proteinbiochemische Ergebnisse

Um mögliche Mechanismen zu identifizieren, wie eine Reperfusion das Remodeling auf molekularer Ebene modulieren kann, wurde die Expression und die Verteilung von extrazellulären Matrixproteinen, Matrix Metalloproteases (MMP`s) und Tissue Inhibitors of Matrix Metalloproteases (TIMP`s) untersucht. Für die Analyse mit Hilfe des Western Blots wurde Gewebe des nicht infarzierten linken Ventrikels verwendet und in zwei unterschiedlichen zellulären Fraktionen analysiert; zum einen die gereinigte lösliche Fraktion, welche hauptsächlich cytoplasmatische Proteine und lösliche Membranproteine beinhaltet, zum anderen die zytoskelettale Fraktion, welche gereinigte unlösliche Membranproteine, Proteine des Zytoskeletts und membranassoziierte Proteine beinhaltet.

Ergebnisse des Western Blot für TIMP-2 in der löslichen Fraktion:

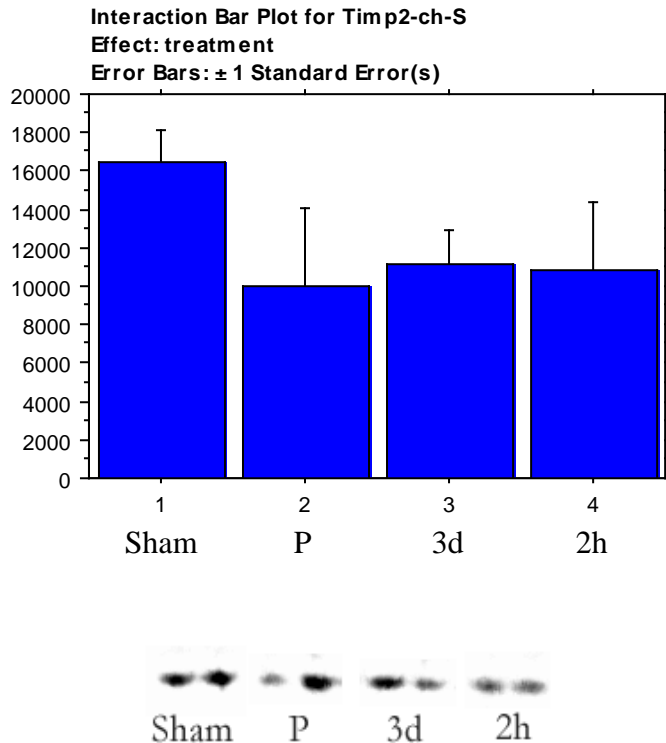


Abbildung 4, Beschreibung siehe Text

Western Blot:

Man sieht 12 Wochen nach Infarkt und Reperfusion eine Abnahme der Proteinmenge von Timp-2 gegenüber Shamtieren, die allerdings nicht signifikant wird. Zwischen den Infarkt bzw. Reperfuisionsgruppen zeigen sich jedoch keine Unterschiede.

Regressionsanalyse:

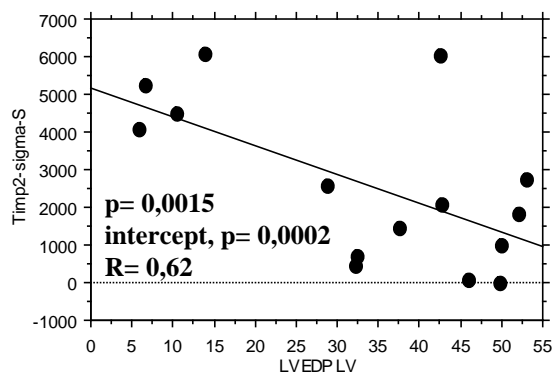
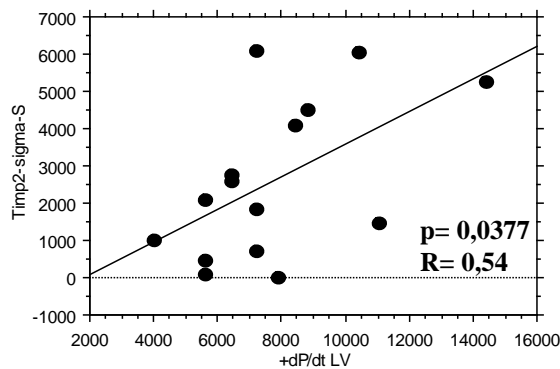
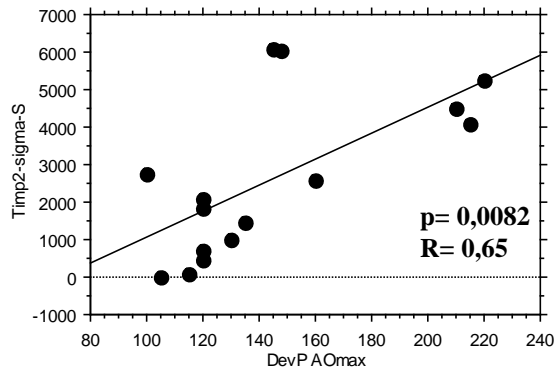


Abbildung 5

Regressionsanalyse von TIMP-2 in der löslichen Fraktion zu DevP Ao max., dp/dt max, LVEDP

Um einen möglichen Zusammenhang der Expression von TIMP-2 mit hämodynamischen und morphologischen Parametern, die wie weiter oben beschrieben auch für die hier verwendeten Gewebe erhoben wurden, zu untersuchen, wurde eine Regressionsanalyse durchgeführt.

Die Regressionsanalyse zeigt die Korrelation von TIMP-2 in der löslichen Fraktion

- zu **DevP Ao max**:

DevP Ao max ist der maximale Druckanstieg bei Aortenocclusion als Maß für die isovolumetrische Kontraktionsfähigkeit des linken Ventrikels.

- zu **dp/dt max**:

dp/dt max ist die Geschwindigkeit der linksventrikulären Anspannung als Maß für die Kontraktilität des linken Ventrikels.

Für beide Korrelationen gilt hier in gemeinsamer Weise:

Je höher die Proteinmenge für Timp2 (und deshalb je geringer die Menge für MMP`s) ist, desto besser ist die Kontraktionsfähigkeit bzw. die Kontraktilität des linken Ventrikels.

- zu **LVEDP**:

LVEDP ist ein Maß für die Nachlast des Herzens, ein hoher Wert ist also ein Zeichen einer schlechten linksventrikulären Funktion.

Hohe Werte für Timp 2 (und damit verbunden wiederum niedrige Werte für MMP`s) korrelieren mit niedrigen Werten für LVEDP und einer guten linksventrikulären Funktion. Anders ausgedrückt kann man sagen dass es bei geringen Timp-2 Proteinmengen 12 W nach Infarkt zu einem Anstieg von LVEDP und damit zu einer Verschlechterung der linksventrikulären Funktion kommt.

MMP`s

In dieser Studie wurden wie weiter oben beschrieben verschiedene MMP`s analysiert (MMP-1, -2, -9, -13). Während MMP-13 keine Veränderung des Expressionslevels nach Myokardinfarkt zeigte, MMP-1 und -9 nach Infarkt anstiegen, aber durch eine Reperfusionstherapie nicht beeinflusst wurden, konzentrierten wir uns auf MMP-2, welches nach Infarkt anstieg und durch eine Reperfusionstherapie beeinflussbar war.

3.7.2 Ergebnisse des Western Blot für MMP-2 im Pellet:

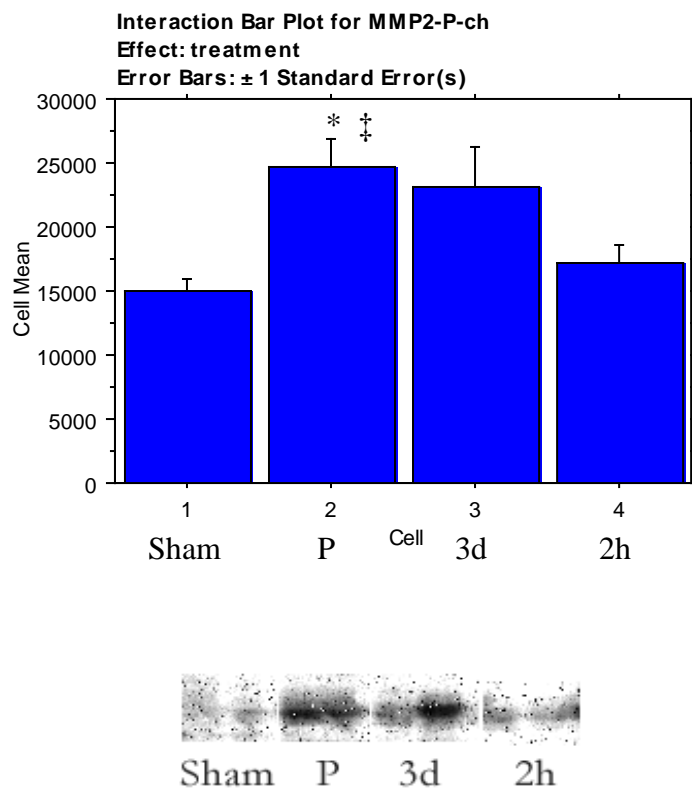


Abbildung 6, Beschreibung siehe Text

Western Blot:

Permanent infarzierte Tiere zeigen eine signifikante Erhöhung in der Expression von MMP-2 gegenüber Sham operierten Tieren und Tieren mit einer Reperfusion nach 2h. Anders ausgedrückt senkt eine Reperfusion nach 2h die Menge an MMP-2 12 Wochen nach Infarkt und damit die Infarktausdehnung (siehe Regressionsanalyse). Eine Reperfusion 3 Tage nach Infarkt zeigt hier keine Veränderung gegenüber der permanent infarzierten Kontrollgruppe.

Regressionsanalyse:

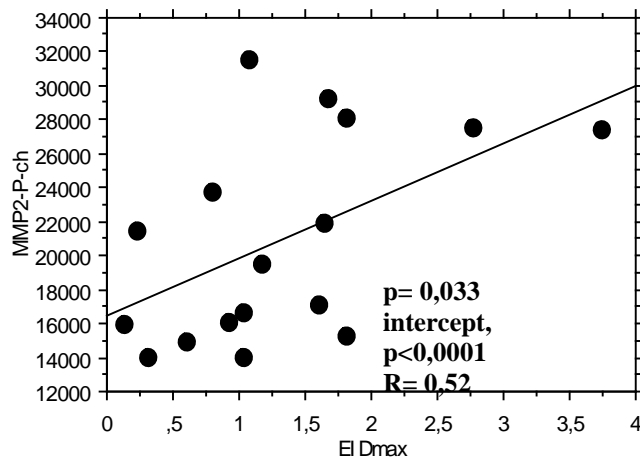


Abbildung 7, Beschreibung siehe Text

Die Regressionsanalyse zeigt die Korrelation von MMP-2 in der unlöslichen Fraktion

- zum Infarkt-Expansion-Index:

Hier zeigt sich, dass eine hohe Expression von MMP-2 12 Wochen nach Infarkt mit einer großen Infarktausdehnung korreliert.

Eine Abnahme der Expression von MMP-2 durch eine Reperfusion 2h nach Infarkt reduziert also die Infarktausdehnung 12 Wochen nach Infarkt.

Vitronektin und Fibronektin sind Substrate vieler MMP's und ihre Expression ist nach Myokardinfarkt hochreguliert.

3.7.3 Ergebnisse des Western Blot für Vitronektin im Löslichen:

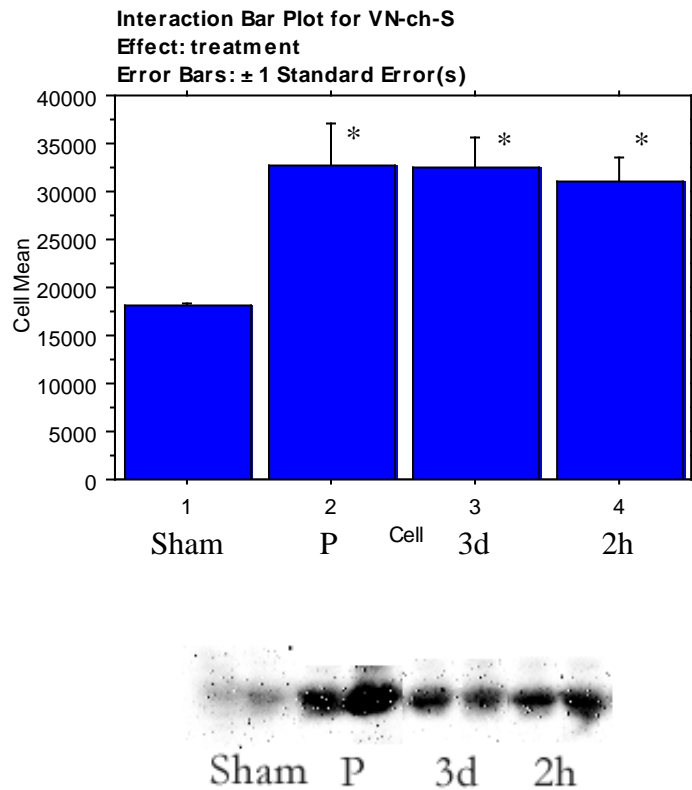


Abbildung 8, Beschreibung: Westernblotergebnisse für Vitronectin in der löslichen Fraktion für die behandelten Gruppen.

Westernblot:

Die Proteinmenge von Vitronektin in der löslichen Fraktion steigt nach Infarkt für alle Gruppen signifikant gegenüber Sham operierten Tieren an. Eine Reperfusion bewirkt 12 Wochen nach Infarkt keine Veränderung.

Regressionsanalyse:

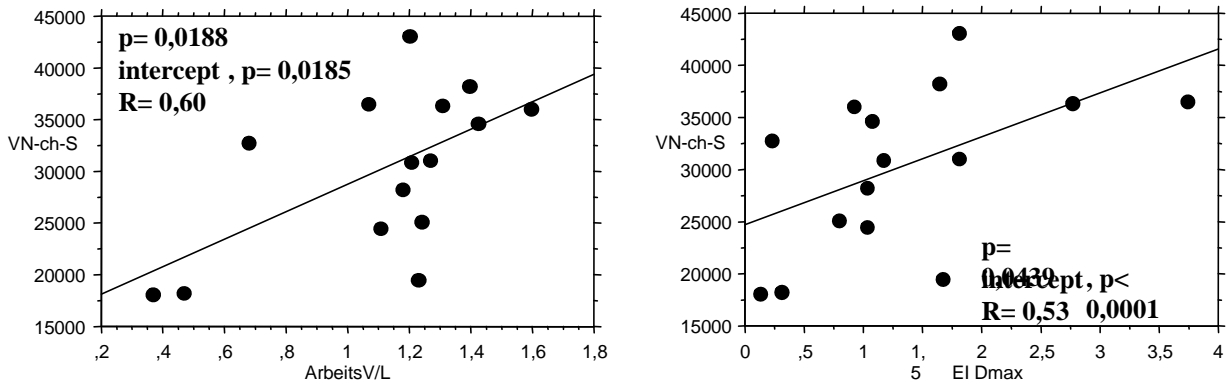


Abbildung 9, Beschreibung siehe Text

Die Regressionsanalyse zeigt die Korrelation von Vitronektin in der unlöslichen Fraktion

- zum Arbeitsvolumen:

Ein Anstieg des Arbeitsvolumens des Herzens als Ausdruck der Herzinsuffizienz korreliert mit einem Anstieg von Vitronektin.

- zum Infarkt-Expansions-Index:

Für den Infarkt-Expansions-Index als Maß für das Remodeling nach Infarkt zeigt sich, dass, je stärker die Strukturveränderungen innerhalb der Infarktzone sind, desto stärker steigt die Proteinmenge von Vitronektin an. Dies geschieht im Sinne der allgemeinen Heilungs- und Schutzfunktion, sowie der Downregulation von MMP's.

3.7.4 Ergebnisse des Western Blot für Fibronectin im Löslichen

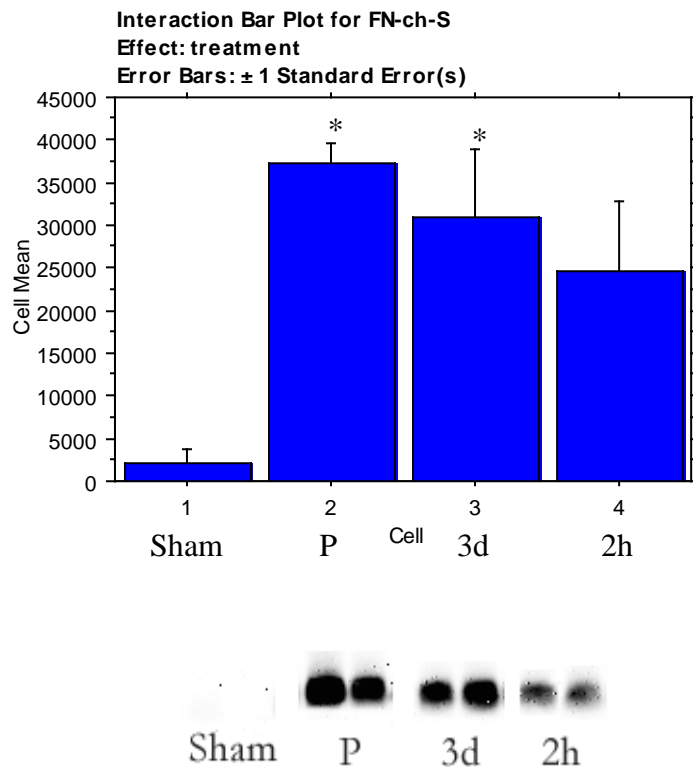


Abbildung 10, Beschreibung siehe Text

Westernblot:

Fibronectin ist 12 Wochen nach Infarkt bei permanent infarzierten Tieren und Tieren mit einer Reperfusion nach 3 Tagen signifikant gegenüber Sham operierten Tieren erhöht, bei der Gruppe der Tiere mit einer Reperfusion nach 2h ist Fibronectin immer noch erhöht, allerdings erreicht der Wert hier nicht mehr das Signifikanzniveau, oder, anders ausgedrückt, durch eine Reperfusion nach 2h konnte die signifikante Erhöhung reduziert werden.

Regressionsanalyse:

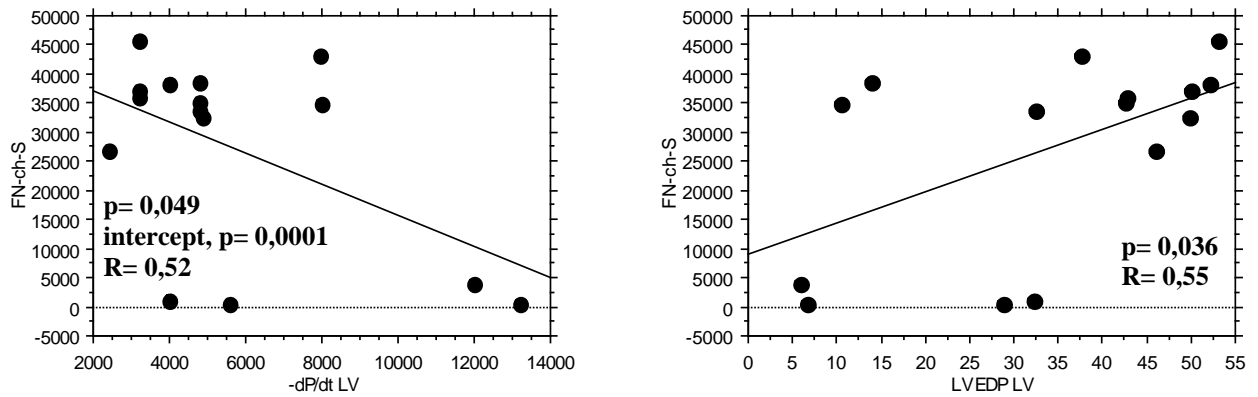


Abbildung 11, Beschreibungssiehe Text

Die Regressionsanalyse zeigt die Korrelation von Fibronectin in der löslichen Fraktion

- mit dp/dt min:

Eine schlechte Relaxationsfähigkeit des Ventrikels nach Infarkt korreliert mit einer hohen Menge an Fibronectin im Gewebe des nicht infarzierten Anteils des linken Ventrikels.

- mit LVEDP:

Eine Verschlechterung der linksventrikulären Funktion, hier ersichtlich durch hohe Werte für LVEDP, korreliert mit einem Anstieg an Fibronectin.

3.7.5 Ergebnisse des Western Blot für Fibronectin im unlöslichen Pellet

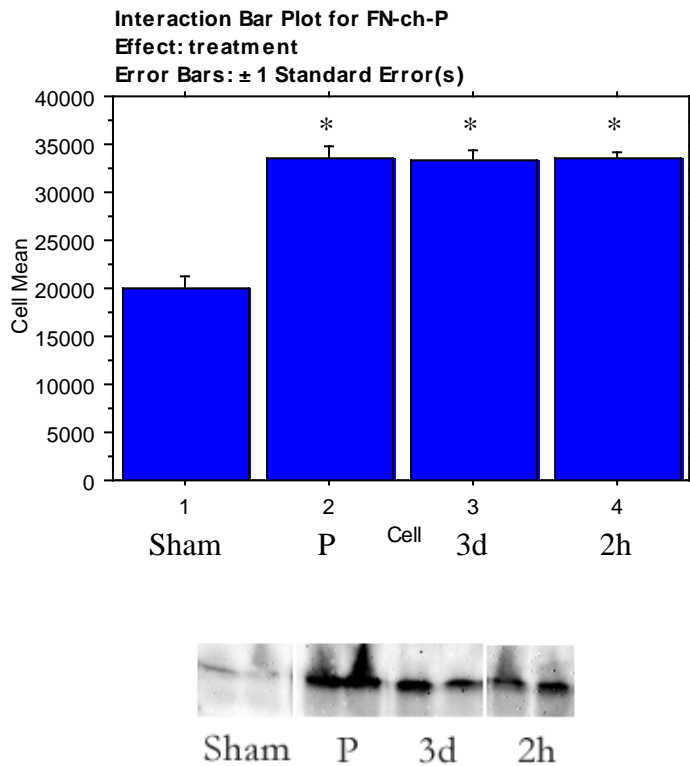


Abbildung 12, Beschreibung siehe Text

Westernblot:

Im Westernblot zeigt sich bei allen Infarktgruppen eine signifikante Erhöhung der Proteinmenge von Fibronectin gegenüber Sham operierten Tieren. Eine Reperfusion hat hier keinen Einfluss auf den Anstieg der Proteinmenge des Fibronectin.

Regressionsanalyse:

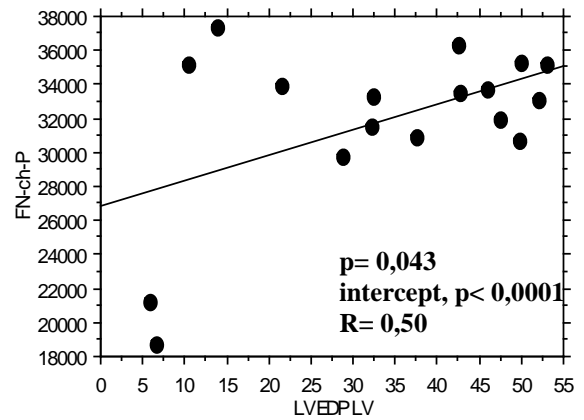
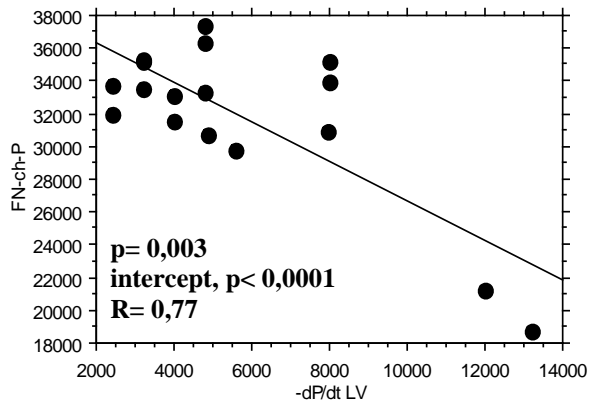


Abbildung 13, Beschreibung siehe Text

Die Regressionsanalyse zeigt die Korrelation von Fibronectin in der unlöslichen Fraktion

- mit dp/dt min:

Ein niedriger Wert für dp/dt min als Ausdruck der schlechten Relaxationsfähigkeit des linken Ventrikels korreliert mit hohen Werten für Fibronectin.

- mit LVEDP:

Hier zeigt sich ein ähnliches Bild wie in der löslichen Fraktion. Hohe Werte für LVEDP als Zeichen einer schlechten linksventrikulären Funktion korrelieren mit hohen Werten an Fibronectin.

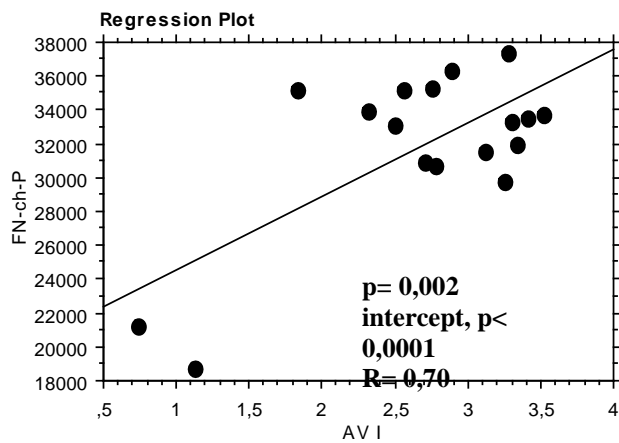


Abbildung 14, Beschreibung siehe Text

Die Regressionsanalyse zeigt die Korrelation von Fibronectin in der unlöslichen Fraktion

- **mit AVI:**

Unter dem Arbeitsvolumenindex (AVI) versteht man die Relation des Arbeitsvolumens (in ml) zum Körpergewicht (in kg).

In der Regressionsanalyse sieht man, dass ein hohes Arbeitsvolumen mit großen Mengen an Fibronectin korreliert.

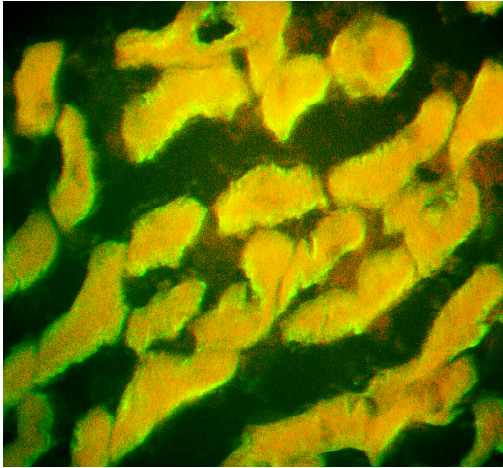
3.8 Immunlokalisation von MMP-2, Fibronectin, Collagen-1 und Collagen-3

Die Abbildungen zeigen die MMP-2, Fibronectin, Collagen -1 und -3 Expression im nicht infarzierten Myokard (Septum und freie Wand) in scheinoperierten (Sham) Tieren, bei permanent infarzierten (MI) Tieren und bei Tieren mit MI und Reperfusion nach 2 Stunden und nach 3 Tagen.

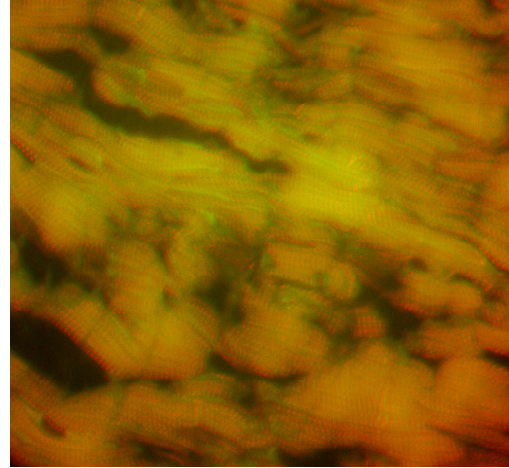
Gezeigt werden Gefrierschnitte des linksventrikulären Myokards mit einer Dicke von 7 μm . Die Schnitte wurden mit 4 % Paraformaldehyd fixiert, zuerst mit monoklonalem Antikörper für MMP-2, Fibronectin, Collagen -1 und -3 und anschließend mit Cy-2 (grün) gekoppelten Zweitantikörpern zur Fluoreszenzmikroskopie sowie mit Cy3-(rot) Phalloidin zur Darstellung des Actins der Kardiozyten inkubiert. Das Gewebe wurde wiederum aus demselben Areal entnommen, wie die Gewebeproben, welche zur Analyse mit Hilfe des Western Blots verwendet wurden.

3.8.1 MMP-2 Expression im linksventrikulären Myokard 12 Woche nach Myokardinfarkt

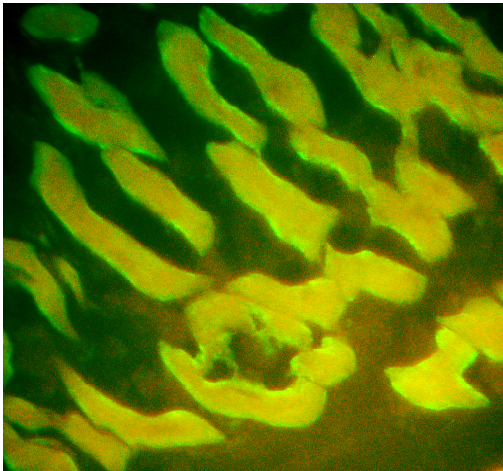
Tiere mit permanentem Myokardinfarkt



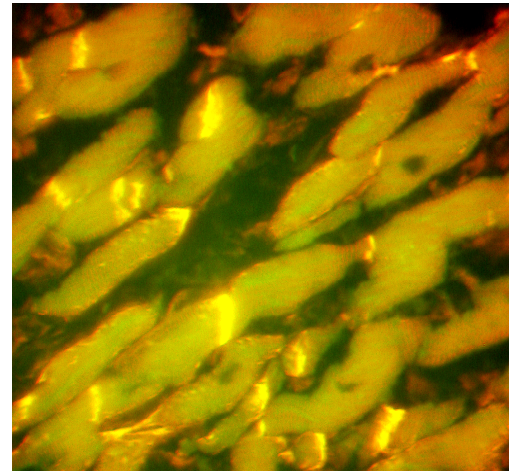
Sham-operierte Tiere



3d Reperfusion



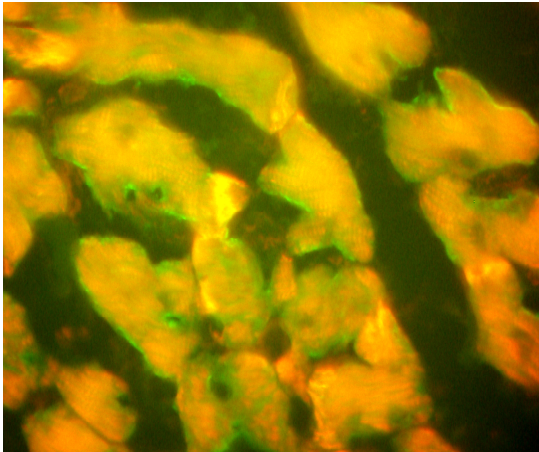
2h Reperfusion



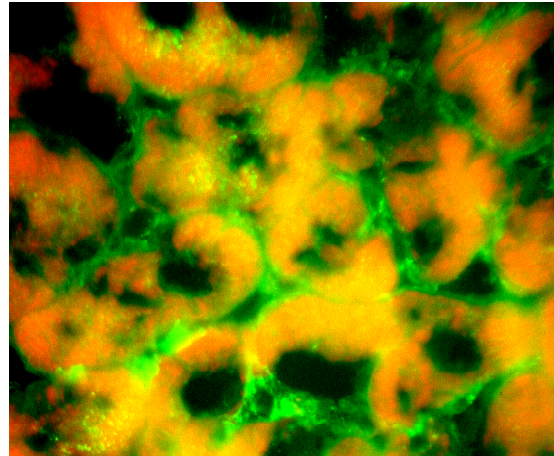
3.8.2 MMP-2 und Matrixproteine im linksventrikulären Myokard 12

Wochen nach Myokardinfarkt

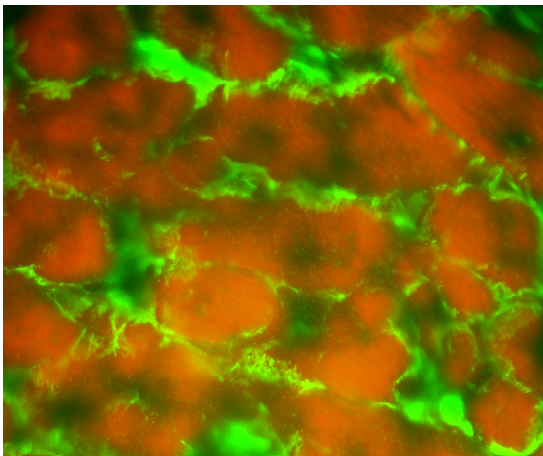
MMP-2



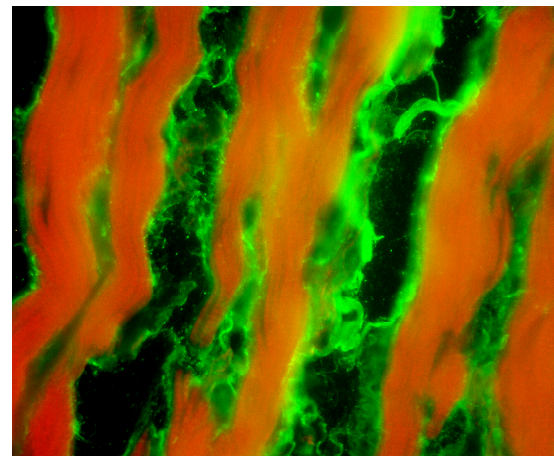
Fibronectin



Collagen 1



Collagen 3



Wie man auf den Bildern erkennen kann, zeigte sich nur eine schwache zytoplasmatische Expression von MMP-2, welche nicht mit Actinfilamenten oder Plasmamembranen kolokalisiert war. Bei Tieren mit permanentem Infarkt und Tieren mit einer Reperfusion nach drei Tagen war MMP-2 allerdings stark mit der Plasmamembran der Kardiozyten assoziiert und deshalb innerhalb der Zelle umverteilt. Um weiter herauszufinden, ob diese Lokalisation identisch mit der Lage einiger

bekannter Substrate von MMP-2 ist, wurden die Schnitte zusätzlich für Fibronectin, Collagen-1 und Collagen-3 gefärbt. Es zeigte sich für alle extrazellulären Matrixproteine eine Kollokalisierung von Protease (MMP-2, grün) und Substrat (Collagen, Fibronectin) an der Zellmembran der Kardiozyten im nicht infarzierten Myokard und es wurde auf diese Art und Weise eine mögliche Interaktion zwischen MMP-2 und höchst wahrscheinlich auch anderen MMP's mit ihren Substraten ersichtlich. Ein deutlicher Unterschied nach einer Reperfusion konnte bei der Gruppe mit Reperfusion nach 2 Stunden beobachtet werden, wo MMP-2 nicht mit der Plasmamembran assoziiert zu sein scheint und deshalb auch weniger MMP-2 assoziiertes Extrazellulär-Matrix-Remodeling nachzuweisen ist.

Dieser Unterschied könnte sich in der signifikant kleineren Infarktausdehnung und totalen linksventrikulären Fläche widerspiegeln und eventuell einige der hilfreichen Effekte einer Reperfusion erklären.

Diskussion

In dieser Studie wurden die Auswirkungen einer Reperfusion nach Myokardinfarkt am Model der Ratte untersucht. Unserem Wissen nach ist dies die erste Studie, in der das Zeitfenster bis zu einer Reperfusion auf drei Tage nach Myokardinfarkt ausgedehnt wurde. Die gedankliche Grundlage für dieses Protokoll wurde aus der klinischen Erfahrung abgeleitet, wo sich Patienten oftmals in einer ähnlichen Zeitspanne nach einem Myokardinfarkt präsentieren. Dies hat unterschiedlichste Ursachen und bedeutet in der Praxis, dass nach den derzeit herrschenden Richtlinien für die Behandlung eines akuten Myokardinfarkts eine Revaskularisationsbehandlung dann nicht mehr indiziert ist.

Der klinische Alltag zeigt aber, dass eine Mehrheit der Infarktpatienten, die sich mit einem subakuten Infarkt ohne Symptomatik vorstellen, eine Herzkatheteruntersuchung und normalerweise, ungeachtet der herrschenden Richtlinien, eine Dilatation des verschlossenen Gefäßes erhalten. Des weiteren zeigen die Erfahrungen mit dieser Handhabung sowie retrospektive Analysen von Untersuchungen und Registern [29-31], dass das Risiko bei einem Eingriff mehr als 12 Stunden nach Myokardinfarkt nicht erhöht ist und sich im Gegenteil durch eine Reperfusion sogar eine Verbesserung des Remodeling-Prozesses sowie der Langzeitergebnisse einstellt [33].

Jedoch gibt es bis zum heutigen Zeitpunkt keine randomisierten Studien, aus denen sich der Nutzen einer späten Reperusionsstrategie nach Myokardinfarkt bestimmen lässt. Um die Effekte einer sehr späten Reperfusion, sprich drei Tage nach Myokardinfarkt in unserer Studie, zu verdeutlichen, wurden zusätzliche Untersuchungsgruppen (permanent-infarzierte Tiere und Tiere mit Myokardinfarkt und anschließender Reperfusion nach 2 Stunden) eingeschlossen. Dies erlaubte gleichzeitig den Vergleich mit Ergebnissen früherer Veröffentlichungen anderer Gruppen, die mit dem selben Modell arbeiteten [35-38].

Der erste Teil der Studie konzentriert sich auf hämodynamische und morphologische Veränderungen nach Myokardinfarkt. Um die Effekte einer Reperfusion nach Infarkt zwischen den unterschiedlichen Gruppen vergleichen zu können, wurden nur Tiere mit großen Infarkten ausgewählt und zu weiteren Untersuchungen herangezogen. Wie bereits weiter oben beschrieben wurde, ist die Infarktausdehnung bei diesem Tiermodel

bereits innerhalb einer Stunde nach Verschluss der Arterie abgeschlossen und eine Reperfusion nach diesem Zeitpunkt hat auf die Infarktgröße keinen Einfluss mehr.

Die Umbauprozesse des linken Ventrikels nach Myokardinfarkt wurden bereits im Detail beschrieben [7, 35] und unter verschiedensten pharmakologischen Behandlungsregimen in unserer Gruppe studiert [47-54]. Auch unsere Beobachtungen dieser Umbauprozesse nach Infarkt, gefolgt von einer Reperfusion nach 2 Stunden, sind vergleichbar mit früheren Beschreibungen [36-38] und zeigen keinen Effekt auf die Infarktgröße, aber eine deutliche Abnahme des rechtsventrikulären Remodelings, des Lungengewichts, des Infarktexpansions-Index sowie der totalen linksventrikulären Fläche; des weiteren zeigte sich eine Zunahme der Narbendicke des linken Ventrikels 12 Wochen nach Infarkt.

Die hämodynamischen Veränderungen wurden durch eine Reperfusion nach 2 Stunden nicht so deutlich beeinflusst, aber es zeigte sich auch nach 12 Wochen zumindest ein Trend in Richtung einer Verbesserung im Vergleich zu der Gruppe mit permanentem Infarkt.

Jedoch waren im Gegensatz zu den frühen Ergebnissen nach 1 Woche (vgl. Kurzzeitstudie) 12 Wochen nach Infarkt die meisten unvorteilhaften Effekte einer späten Reperfusion nach 3 Tagen aufgehoben und wurden sogar vergleichbar mit den vorteilhaften Effekten einer Reperfusion nach 2 Stunden. Dies war vor allem im Bezug auf die Infarktausdehnung, die linksventrikuläre Fläche und das Verhältnis von Lungengewicht zu Körpergewicht der Fall. Im Speziellen wurde der Infarktexpansions-Index, welcher 12 Wochen nach Infarkt in beiden Reperfusiongruppen (2h/3d) signifikant reduziert war, zu einem wichtigen Marker für den chronischen Umbauprozess [36, 37] und mit einer Verbesserung der Überlebenschance in Verbindung gebracht [55].

Diese Daten unterstützen sehr stark die These, dass selbst eine späte Reperfusion nach 3 Tagen noch hilfreiche Effekte auf den chronischen Umbauprozess nach Myokardinfarkt hat und legt daher nahe, das momentan gängige Zeitfenster für eine Reperfusion nach Infarkt auch in der klinischen Praxis auszudehnen.

Als Versuch den möglichen Mechanismus zu verstehen, auf welche Weise sich eine Reperfusion günstig auf den chronischen Umbauprozess auswirkt und somit zu einer Verringerung der Infarktausdehnung führt, haben wir die Expression verschiedener

Proteine untersucht, von denen man weiß, dass sie an den Umbauprozessen nach Myokardinfarkt beteiligt sind. Ähnliche Versuche wurden auch schon früher von anderen Gruppen unternommen [21, 39-43]. Hierbei wurde ein modulierender Effekt durch eine Reperfusion nach 150 min mit einer Reduktion der Aktivität von MMP 1, 2 und 9, sowie ein Anstieg der Expression von Fibronectin in der Infarktzone selbst beschrieben, welcher aber nur für weitere 7 Tage nach Infarkt untersucht wurde und den größten Effekt nach 7 Tagen für MMP 1 und 2 zeigte [19].

Obwohl einige Infarkt-Studien einen Anstieg in der Aktivität von MMP's und eine Reduktion der Expression von TIMP [56] sowohl für die Infarktzone als auch für das Restmyokard, welches sich ebenso einer Hypertrophie und einem Remodeling unterzieht, zeigen konnte, existieren bis heute keine Daten über die Auswirkungen einer Reperfusion auf das Restmyokard.

Was man bis heute kennt, ist die Relation und Abhängigkeit der MMP Expression und Aktivität im hypertrophen Myokard mit der Entwicklung einer linksventrikulären Dilatation und Herzinsuffizienz. Dies wurde bereits in mehreren Studien durch die Verwendung von MMP Inhibitoren oder MMP Knockouts hervorragend gezeigt [39-41, 56, 57].

Bei einer Studie mit einer sehr kurzen Zeitphase zwischen Ischämie und Reperfusion (30min/24h) wurde vermutet, dass MMP 9 eine Rolle in der frühen Phase des Remodelingprozesses am Herzen nach Ischämie spielt, hauptsächlich durch eine Invasion von neutrophilen Granulozyten und einer Freisetzung von MMP 9 in das Ischämie-Areal [40].

In der vorliegenden Studie hatte die Reperfusion keinen Einfluß auf den Expressionslevel von TIMP 1+2 12 Wochen nach Infarkt. Bei der Expression von TIMP 1 war 12 Wochen nach Infarkt keine Veränderungen sichtbar. TIMP 2 war ebenfalls nicht signifikant downreguliert, zeigte aber einen Trend zur Downregulation nach 12 Wochen. Obwohl eine Reperfusion die Expressionslevel zwischen den einzelnen Gruppen nicht beeinflusste, scheint sich eine zeitliche Regulation und vorübergehende Rolle des TIMP 1+2 im Restmyokard des linken Ventrikels abzuzeichnen. Die Regressionsanalyse unterstützte die Ansicht, dass TIMP 1 das hauptsächlich regulierte TIMP eine Woche nach Infarkt (vgl. Kurzzeitstudie) mit einer signifikant negativen Korrelation zum LVEDP war, währenddessen TIMP 2 nur 12 Wochen nach Infarkt eine

ähnlich negative Korrelation zu LVEDP zeigte. Des Weiteren konnte für beide MMP's keine räumliche Neuverteilung in der zytoplasmatischen oder Zytoskelet-Gewebefraktion beobachtet werden.

Ähnliches konnte Podesser et al zeigen. Er berichtete über eine Aktivierung von MMP 1, 2 + 9 gekoppelt mit einer Downregulation von TIMP 1 im Restmyokard des linken Ventrikels 6 Wochen nach Infarkt, wohingegen TIMP 2 unverändert blieb [58].

Auch in der vorliegenden Studie zeigte sich 12 Wochen nach Infarkt eine starke Hochregulation von MMP 2. Der stärkste Anstieg zeigte sich 12 Wochen nach permanentem Infarkt. Eine Reperfusion nach 3 Tagen zeigte bereits eine Reduktion, eine Reperfusion nach 2 Stunden hingegen eine starke Reduktion. Obwohl diese Veränderungen kein Signifikanzniveau erreichten, scheint MMP 2 auf eine Reperfusion anzusprechen und wurde deshalb weiter analysiert.

Die Regressionsanalyse zeigte eine signifikant positive Korrelation mit dem Infarktexpansions-Index 12 Wochen nach Infarkt.

Ähnliche Beobachtungen über die Rolle von MMP 2 machte Cheung et al in einer Akutstudie zur Ischämie und Reperfusion bei Mäusen [44], wo eine Hemmung oder zusätzliche Gabe von MMP2 mit der Infarktexpansion korrelierte.

Um die intrazelluläre Lokalisation von MMP 2 festzustellen wurde frisch eingefrorenes Gewebe immunhistochemisch analysiert.

Nach Myokardinfarkt zeigte sich bei Sham Tieren und Tieren mit Reperfusion nach 2 Stunden eine cytoplasmatische Lokalisation von MMP-2, bei permanent infarzierten Tieren sowie Tieren mit Reperfusion nach 3 Tagen hingegen eine Umverteilung zur Oberfläche der Plasmamembran der Kardiozyten. Diese Lokalisation entsprach weiter der Bindungsseite der extrazellulären Matrixproteine Fibronectin, Collagen-1 und Collagen-3, was eine Proteolyse und ein Remodeling der Extrazellulärmatrix ermöglicht.

Studien anderer Gruppen konnten den Integrin Rezeptor alpha5/beta3 als Bindepartner für MMP 2 identifizieren, welcher bei der Aktivierung des MMP 2 durch ein Recruitment an die Zelloberfläche in Interaktion mit MT-1 MMP beteiligt ist; ein Mechanismus, der entscheidend ist für Tumormetastasierung und Ausbreitung [59]. Seit das linksventrikuläre Remodeling nach Infarkt mit dem Wachstum und der Ausdehnung von Kardiozyten und mit einer veränderten Zusammensetzung der umgebenden

Extrazellulärmatrix assoziiert ist, könnte die Interaktion zwischen MMP's, Integrinrezeptoren und Matrixproteinen an der Oberfläche der Kardiozyten ein denkbarer Mechanismus während des chronischen Remodeling-Prozesses sein. Dennoch ist der Mechanismus noch spekulativ, auf welche Weise eine Reperfusion die MMP Expression im Restmyokard beeinflusst.

Da die Infarktgröße durch eine späte Reperfusion nicht beeinflusst wurde, die Narbendicke, das linksventrikuläre Hohlraumvolumen sowie die linksventrikuläre Fläche aber signifikant auf eine Reperfusion reagierten, könnte der wiederhergestellte lokale Blutfluss in der Infarkt- und Grenzzone zu einer Bewahrung einiger Zellen vor Nekrose und Apoptose beigetragen haben und somit das überlebende Gewebe und die Ventrikelgeometrie erhalten haben. Der Verlust von Myokard und sein Ersatz durch Narbengewebe führt zu einer Dilatation und Ausdehnung des Ventrikels, was wiederum den gesamten Wandstress ansteigen lässt. Das Ergebnis ist eine Dilatation mit gesteigertem Volumen und einer Ausdünnung der Ventrikelwand. Dies führt zu einer Aktivierung wandstress-sensitiver Signalcascaden und verschiedener mitogener Signalwege einschließlich der Hochregulation von Extrazellulärmatrix Produkten wie Fibronektin. Fibronektin kann wiederum die Expression von MMP's triggern, was zu einer Vergrößerung des Ventrikels und zu einer Ausdehnung des Infarkts führt. Durch eine Reperfusion konnte ebenso das Arbeitsvolumen als indirektes Maß für Wandstress reduziert werden (leider gerade nicht mehr signifikant) und damit die Aktivierung der Stress- bzw. Dehnungssensitiven Signalwege, wie z.B. der Integrin-vermittelte oder durch mitogene Kinasen vermittelte Signalweg, verändert werden, was einen direkten Effekt auf die Expression der Extrazellulärmatrix Proteine und MMP's hat.

Zusammenfassend ergeben sich zwei Hauptergebnisse aus dieser Studie.

Erstens, eine sehr späte Reperfusion 3 Tage nach Infarkt hat durch eine signifikante Reduktion des Infarktexpansionsindex günstige Effekte auf die chronischen Umbauprozesse nach Infarkt.

Zweitens, die Abschwächung der MMP 2 Expression durch Reperfusion und die Translokation von fokalen Adhäsionsmolekülen an die Oberfläche der Kardiozyten könnten ihren Beitrag zu der positiven Korrelation von MMP 2 mit dem

Infarktexpansionsindex während des chronischen Umbauprozesses nach Infarkt erklären.

Literaturverzeichnis

1. Szucs TD, S.E., *Economic significance of heart failure. An overview of costs and economics of therapy.* Herz, 2000. 25(5): p. 538-46.
2. Yusuf S, T.T., *Changes in hypertension treatment and in congestive heart failure mortality in the United States.* Hypertension, 1989. **13**: p. 174-179.
3. Association, A.H., *Heart and stroke facts and statistics.* 1992 Dallas.
4. Eriksson H, *Heart failure: a growing public health problem.* J Intern Med, 1995. **237**: p. 135-141.
5. G. Ertl, D.F., P. Gaudron, K. Hu, A. Laser, S. Neubauer, W. Schorb, *Übergang von Myokardischämie in Herzinsuffizienz.* Z Kardiol, 1998. **87**: p. 667-675.
6. 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.
7. Sutton Martin G. St. J., S.N., *Left ventricular remodeling after myocardial infarction.* Circulation, 2000(101): p. 2981-2988.
8. Renz-Polster H., B.J., *Innere Medizin.* Urban und Fischer Verlag München/Jena., 2001. **2. Auflage**: p. 70.
9. Solomon A., G.B., *The open artery hypothesis.* Annu. Rev. Medicine, 1998(49): p. 63-76.
10. 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.
11. Montalescot G, F.M., *Myocardial viability in patients with Q wave myocardial infarction and no residual ischemia.* Circulation, 1992. **86**: p. 47-55.
12. 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.
13. Oberholzer Martin J, *Pathologie verstehen.* Georg Thieme Verlag, 2001: p. 274.
14. 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.
15. White, H.D. and F.J. Van de Werf, *Thrombolysis for acute myocardial infarction.* Circulation, 1998. **97**(16): p. 1632-46.
16. Morrison, L.J., et al., *Mortality and prehospital thrombolysis for acute myocardial infarction: A meta-analysis.* Jama, 2000. **283**(20): p. 2686-92.
17. 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.
18. Pachinger O, *Der akute Herzinfarkt: Optimale Reperfusionstrategie 2002?* J Kardiol, 2002. **9**(6): p. 225-226.
19. 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.
20. Mann DL, S.F., *Aktiviation of matrix metalloproteinases in the failing human heart: breaking the tie that binds.* Circulation, 1998. **98**: p. 1699-1702.
21. 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.
22. Van de Werf, F., et al, *Management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation.* Eur Heart J, 2003. **24**(1): p. 28-66.
23. Weaver, W.D., et al., *Comparison of primary coronary angioplasty and intravenous thrombolytic therapy for acute myocardial infarction: a quantitative review.* Jama, 1997. **278**(23): p. 2093-8.
24. Schomig, A., et al., . . . (): p. . *Coronary stenting plus platelet glycoprotein IIb/IIIa blockade compared with tissue plasminogen activator in acute myocardial infarction. Stent versus Thrombolysis for Occluded Coronary Arteries in Patients with Acute Myocardial Infarction Study Investigators.* N Engl J Med, 2000. **343**(6): p. 385-91.

25. study, L., *Late Assessment of Thrombolytic Efficacy (LATE) study with alteplase 6-24 hours after onset of acute myocardial infarction*. Lancet, 1993. **342**(8874): p. 759-66.
26. EMERAS, *Randomised trial of late thrombolysis in patients with suspected acute myocardial infarction*. EMERAS (Estudio Multicentrico Estreptoquinasa Republicas de America del Sur) Collaborative Group. Lancet, 1993. **342**(8874): p. 767-72.
27. Karlson, B.W., et al., *Eligibility for intravenous thrombolysis in suspected acute myocardial infarction*. Circulation, 1990. **82**(4): p. 1140-6.
28. French, J.K., et al., *Prospective evaluation of eligibility for thrombolytic therapy in acute myocardial infarction*. Bmj, 1996. **312**(7047): p. 1637-41.
29. Cannon, C.P., et al., *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**(22): p. 2941-7.
30. Zahn, R., et al., *Impact of prehospital delay on mortality in patients with acute myocardial infarction treated with primary angioplasty and intravenous thrombolysis*. Am Heart J, 2001. **142**(1): p. 105-11.
31. Zahn, R., et al., *Primary angioplasty versus no reperfusion therapy in patients with acute myocardial infarction and a pre-hospital 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.
32. Yousef, Z.R., et al., *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**(5): p. 869-76.
33. Ishikawa, K., *Benefits of late reperfusion in the treatment of acute myocardial infarction*. J Thromb Thrombolysis, 2002. **13**(3): p. 191-200.
34. Brodie, B.R., et al., *Effect of treatment delay on outcomes in patients with acute myocardial infarction transferred from community hospitals for primary percutaneous coronary intervention*. Am J Cardiol, 2002. **89**(11): p. 1243-7.
35. Pfeffer, M.A. and E. Braunwald, *Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications*. Circulation, 1990. **81**(4): p. 1161-72.
36. 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.
37. McDonald, K., et al., *The effect of delayed reperfusion following infarction in the rat on structural changes in viable myocardium*. Cardiovasc Res, 1997. **36**(3): p. 347-53.
38. Hochman JS, C.H., *Limitation of myocardial infarct expansion by reperfusion independent of myocardial salvage*. Circulation, 1987. **75**: p. 299-306.
39. Ducharme, A., et al., *Targeted deletion of matrix metalloproteinase-9 attenuates left ventricular enlargement and collagen accumulation after experimental myocardial infarction*. J Clin Invest, 2000. **106**(1): p. 55-62.
40. Romanic, A.M., et al., *Myocardial protection from ischemia/reperfusion injury by targeted deletion of matrix metalloproteinase-9*. Cardiovasc Res, 2002. **54**(3): p. 549-58.
41. Lindsey, M.L., et al., *Selective matrix metalloproteinase inhibition reduces left ventricular remodeling but does not inhibit angiogenesis after myocardial infarction*. Circulation, 2002. **105**(6): p. 753-8.
42. Romanic, A.M., et al., *Matrix metalloproteinase expression in cardiac myocytes following myocardial infarction in the rabbit*. Life Sci, 2001. **68**(7): p. 799-814.
43. Rohde, L.E., et al., *Echocardiography-derived left ventricular end-systolic regional wall stress and matrix remodeling after experimental myocardial infarction*. J Am Coll Cardiol, 1999. **33**(3): p. 835-42.
44. Cheung, P.Y., et al., *Matrix metalloproteinase-2 contributes to ischemia-reperfusion injury in the heart*. Circulation, 2000. **101**(15): p. 1833-9.
45. Pfeffer JM, P.M., Fishbein MC, Fletcher PJ, et al., *Myocardial infarct size and ventricular function in rats*. Circ Res, 1979. **44**: p. 503-512.
46. Pfeffer JM, P.M., Fletcher PJ, *Progressive ventricular remodeling in rat with myocardial infarction*. Am. J. Physiol. (Heart Circ. Physiol. 29), 1991. **260**: p. H1406-H1414.
47. Ertl, G., P. Gaudron, and K. Hu, *Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental and clinical studies*. Basic Res Cardiol, 1993. **88** Suppl 1: p. 125-37.

48. Fraccarollo, D., et al., *Cardioprotection by long-term ET(A) receptor blockade and ACE inhibition in rats with congestive heart failure: mono- versus combination therapy*. Cardiovasc Res, 2002. **54**(1): p. 85-94.
49. Nahrendorf, M., et al., *Time course of right ventricular remodeling in rats with experimental myocardial infarction*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2003. **284**(1): p. H241-8.
50. Bauersachs, J., et al., *Improvement of left ventricular remodeling and function by hydroxymethylglutaryl coenzyme a reductase inhibition with cerivastatin in rats with heart failure after myocardial infarction*. Circulation, 2001. **104**(9): p. 982-5.
51. Bauersachs, J., et al., *Addition of spironolactone to angiotensin-converting enzyme inhibition in heart failure improves endothelial vasomotor dysfunction: role of vascular superoxide anion formation and endothelial nitric oxide synthase expression*. J Am Coll Cardiol, 2002. **39**(2): p. 351-8.
52. Wagner, J.A., et al., *Endogenous cannabinoids mediate hypotension after experimental myocardial infarction*. J Am Coll Cardiol, 2001. **38**(7): p. 2048-54.
53. Hu, K. and G. Ertl, *Potential role of mixed ACE and neutral endopeptidase inhibitor in the treatment of heart failure*. Cardiovasc Res, 1999. **41**(3): p. 503-5.
54. Hu, K., P. Gaudron, and G. Ertl, *Long-term effects of beta-adrenergic blocking agent treatment on hemodynamic function and left ventricular remodeling in rats with experimental myocardial infarction: importance of timing of treatment and infarct size*. J Am Coll Cardiol, 1998. **31**(3): p. 692-700.
55. Mallavarapti, C., et al., *Effects of Late Coronary Artery Reperfusion on Left Ventricular Remodeling Persist for 10 Weeks After Experimental Rat Myocardial Infarction and Are Associated with Improved Survival*. J Thromb Thrombolysis, 1994. **1**(1): p. 55-62.
56. Creemers, E.E., et al., *Matrix metalloproteinase inhibition after myocardial infarction: a new approach to prevent heart failure?* Circ Res, 2001. **89**(3): p. 201-10.
57. Rohde, L.E., et al., *Matrix metalloproteinase inhibition attenuates early left ventricular enlargement after experimental myocardial infarction in mice*. Circulation, 1999. **99**(23): p. 3063-70.
58. Podesser, B.K., et al., *ET(A)-receptor blockade prevents matrix metalloproteinase activation late postmyocardial infarction in the rat*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2001. **280**(3): p. H984-91.
59. Brooks, P.C., et al., *Localization of matrix metalloproteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by interaction with integrin alpha v beta 3*. Cell, 1996. **85**(5): p. 683-93.
60. Morita M, K.S., et al., *Effects of late reperfusion on infarct expansion and infarct healing in conscious rats*. Am J Pathol, 1993. **143**(2): p. 419.
61. Laser A, I.J.S., et al., *Regional Biochemical Remodeling in Non-infarcted Tissue of Rat Heart post-myocardial Infarction*. J Mol Cell Cardiol., 1996. **28**: p. 1531-1538.
62. Drexler H, H.J., et al., *Atrial natriuretic peptide in a rat model of cardiac failure. Atrial and ventricular mRNA, atrial content, plasma levels, and effect of volume loading*. Circulation, 1989. **79**: p. 620-633.
63. Braunwald E, *The Heart*. 430-488.
64. Kim CB, B.E., *Potential benefits of late reperfusion of infarcted myocardium. The open artery hypothesis*. Circulation, 1993. **88**: p. 2426-36.
65. Sutton Martin G. St. J., *Left ventricular Remodelling after acute myocardial infarction*. Science Press. 1996. 30-38.
66. Weisman HF, B.D., Mansini JA, et al., *Cellular mechanisms of myocardial infarct expansion*. Circulation, 1988. **78**: p. 186-201.
67. Hutchkins GM, B.B., *Infarct expansion versus extension: two different complications of acute myocardial infarction*. Am J Cardiol, 1978. **41**: p. 1127.
68. Eaton LW, W.J., et al., *Regional cardiac dilatation after acute myocardial infarction*. N Engl J Med, 1979. **300**: p. 57.
69. McKay RG, P.M., et al., *Left ventricular remodeling after myocardial infarction: a corollary to infarct expansion*. Circulation, 1986. **74**(No. 4): p. 693-702.
70. Ceremuzynski L, *Hormonal and metabolic reactions evoked by acute MI*. Circ Res, 1981. **48**: p. 767-773.
71. Ertl G, H.K., Bauer WR, Bauer B., *The renin angiotensin system and coronary vasomotion*. Heart, 1996. **76** (Suppl 3): p. 45-52.
72. Anversa P, O.G., Capasso JM., *Cellular Basis of ventricular remodeling after myocardial infarction*. Am J Cardiol, 1991. **Nov 18**(68(14)): p. 7D16D.

73. Fletcher PJ, P.J., Pfeffer MA, Braunwald E, *Left ventricular diastolic pressure-volume relations in rats with healed myocardial infarction*. Circ Res, 1981. **49**: p. 618-626.
74. Pfeffer JM, P.M., Braunwald E., *Influence of chronic captopril therapy on the infarcted left ventricle of the rat*. Circ Res, 1985. **57**: p. 84-95.
75. Maclean D, F.M., Maroko PR, Braunwald E, *Hyaluronidase-induced reductions in myocardial infarct size*. Science, 1976. **194**: p. 199.