

**Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I
des Universitätsklinikums Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. Georg Ertl**

**Pentaerythryltetranitrat-Therapie bei experimentellem
chronischem Herzinfarkt durch Koronarligatur in Ratten**

Einfluss auf Remodeling, Hämodynamik und Redox-Stoffwechsel

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Jonas Georg Neuser

aus Langenfeld

Würzburg, September 2014

Referent: PD Dr. med. Julian Widder

Koreferent: Prof. Dr. rer . nat. Kai Schuh

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 5. September 2014

Der Promovend ist Arzt.

Diese Arbeit ist Julia und meinen Eltern gewidmet.

Inhaltsverzeichnis

1. <u>EINLEITUNG</u>	1
2. <u>MATERIAL UND METHODEN</u>	16
2.1 STUDIENPROTOKOLL	16
2.2 MYOKARDINFARKTOPERATION	16
2.3 HÄMODYNAMIK-MESSUNGEN	18
2.4 ORGANENTNAHME	19
2.5 INFARKTGRÖßENBESTIMMUNG	20
2.6 MYOZYTENGRÖßENBESTIMMUNG	21
2.7 KOLLAGENGEHALTBESTIMMUNG	22
2.8 BESTIMMUNG DER ANGIOGENESE	23
2.9 PROTEINEXTRAKTION	24
2.10 ISOLATION DER MYOZYTÄREN MITOCHONDRIEN	25
2.11 BESTIMMUNG DER SUPEROXIDANIONEN	27
2.12 PROTEINMENGENBESTIMMUNG	30
2.13 GELELEKTROPHORESE	31
2.14 WESTERN BLOTTING	32
2.15 STATISTISCHE AUSWERTUNG	35
3. <u>ERGEBNISSE</u>	36
3.1 INFARKTGRÖÖE, MYOKARDIALE HYPERTROPHIE UND LUNGENÖDEM	36
3.2 HÄMODYNAMISCHE MESSUNGEN	38
3.3 KOLLAGEN IM MYOKARD	39
3.4 ANGIOGENESE	40
3.4 REAKTIVE SAUERSTOFFSPEZIES	40
3.5 PROTEINEXPRESSIONSMUSTER	42
4. <u>DISKUSSION</u>	44
5. <u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	58
6. <u>ABKÜRZUNGEN</u>	59
7. <u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	61

1. Einleitung

Kardiovaskuläre Erkrankungen werden von der WHO als Erkrankungen des Herzens und der Blutgefäße definiert und stellen weltweit die führende Todesursache dar. So verstarben im Jahr 2008 17,3 Millionen Menschen an kardiovaskulären Erkrankungen und ihren Folgen [9]. Diese Zahl wird voraussichtlich bis zum Jahr 2030 auf über 23 Millionen steigen [9]. Zu den kardiovaskulären Erkrankungen werden die koronare Herzkrankheit (KHK), zerebrovaskuläre Erkrankungen, die periphere arterielle Verschlusskrankheit, rheumatische Herzerkrankungen, kongenitale Herzvitien sowie die tiefe Beinvenenthrombose mit möglicher pulmonaler Embolisation gezählt. Den Großteil der Mortalität verursacht die KHK [9, 10]. Sofern diese nicht zum Tode führt, kann sie eine Ursache für die Entwicklung einer Herzinsuffizienz sein [11].

Herzinsuffizienz wird definiert als „myokardiale Dysfunktion mit der kardialen Unfähigkeit, eine den Anforderungen entsprechende Förderleistung zu erbringen“ [12]. Patienten mit einer Herzinsuffizienz „entwickeln eine Konstellation klinischer Symptome (Dyspnoe, Erschöpfung) und Krankheitszeichen (Ödeme, Rasselgeräusche)“ [11]. Aktuell liegt die Prävalenz in Deutschland bei 1,8 Millionen beziehungsweise bei $\geq 10\%$ der über 70-Jährigen, die Inzidenz beläuft sich auf rund 300.000 [1, 13]. Die Wahrscheinlichkeit, an den Folgen einer Herzinsuffizienz zu sterben, ist sehr hoch. Unabhängig vom Schweregrad der Herzinsuffizienz liegt die 5-Jahres-Sterblichkeit laut Goldberg et al. bei 62,5% [14].

Herzinsuffizienz ist ein Symptomkomplex der nach verschiedenen Konzepten charakterisiert werden kann: So werden nach der Auswurfleistung des Herzens ein Low-output-failure und ein High-output-failure, nach dem beeinträchtigten Ventrikel eine Rechts-, Links- beziehungsweise Globalherzinsuffizienz, nach der zeitlichen Entwicklung eine akute oder chronische Herzinsuffizienz und nach der betroffenen Herzaktionsphase eine systolische, eine

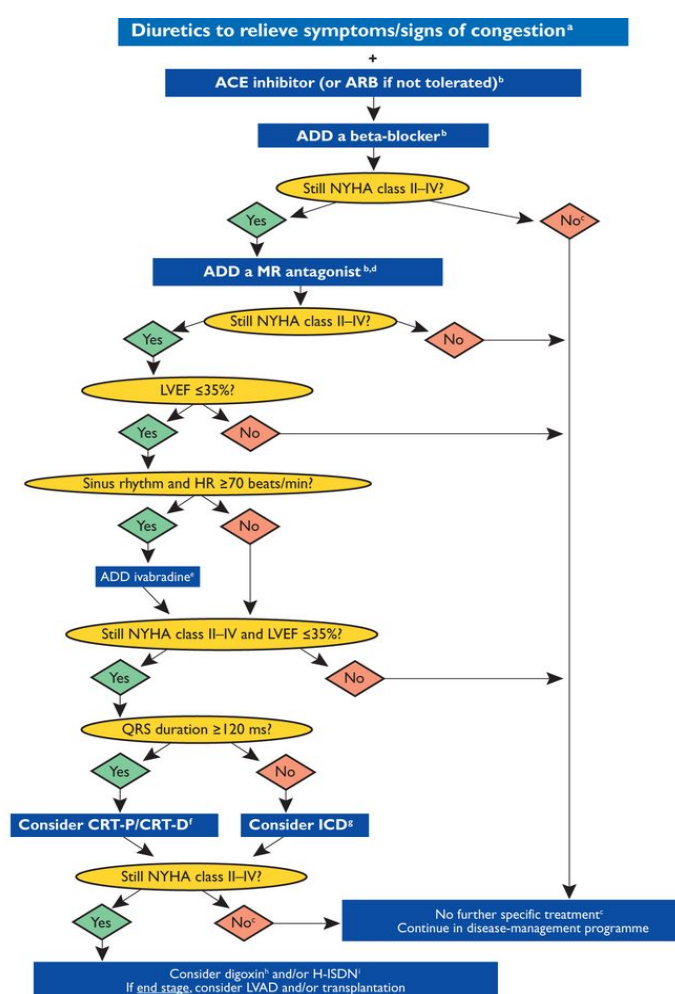
diastolische oder eine kombiniert systolisch-diastolische Herzinsuffizienz unterschieden. Auch kann zwischen einer asymptomatischen, kompensierten und einer symptomatischen, dekompenzierten Herzinsuffizienz differenziert werden. Nach der Klassifikation der New York Heart Association (NYHA) ist eine Einteilung nach Intensität der Belastung die zu Dyspnoe, Ermüdung und Palpitationen führt, möglich [12, 15].

Zum Symptomkomplex einer Herzinsuffizienz zählen unter anderem Dyspnoe, Leistungsminderung beziehungsweise schnelle Ermüdung und periphere Ödeme. Aber auch Nykt- und Proteinurie sowie Stauungshepatitiden oder –gastritiden, werden je nach Art der im Vordergrund stehenden Insuffizienz beschrieben [16, 17].

Herzinsuffizienz kann als progressive Erkrankung nach einem Indexereignis angesehen werden. Ein derartiges Indexereignis kann eine Verletzung oder ein Stressereignis des Myokards sein, das zu einem strukturellen Umbau des Myokards, dem Remodeling, führt [11, 18, 19]. Ursachen der Herzinsuffizienz können Funktionsstörungen des Perikards, des Endokards, der großen Blutgefäße und vor allem des Myokards sein. So zählen zu den häufig koexistierenden Erkrankungen, die eine Herzinsuffizienz ätiologisch bedingen können, die arterielle Hypertonie, die dilatative Kardiomyopathie und Herzvitien [20, 21]. Die bei weitem häufigste Ursache einer systolischen Herzinsuffizienz ist die koronare Herzkrankheit, die in über zwei Drittel der Fälle die Grunderkrankung für die Ausbildung einer systolischen Herzinsuffizienz darstellt, wenn auch die arterielle Hypertonie und der Diabetes mellitus in vielen Fällen die Entwicklung begünstigen [1].

Fortschritte in der Akutbehandlung des Herzinfarktes durch perkutane Intervention mit Ballondilatation und Stentimplantationen sowie Verbesserungen in der pharmakologischen Therapie, haben die Zahl der Patienten, die einen Herzinfarkt überleben steigen lassen. In Folge hat sich aber auch die Zahl der an einer Herzinsuffizienz leidenden Patienten erhöht [22].

Ziele der Therapie herzinsuffizienter Patienten sind die Abmilderung der Symptome, die Verminderung von Krankenhausaufenthalten sowie eine Lebensverlängerung. Eingesetzt werden neurohumorale Antagonisten wie ACE-Hemmer oder Angiotensin-1-Rezeptor-Blocker, β -Rezeptoren-Blocker und Mineralkortikoid-Rezeptor-Antagonisten, denen eine krankheitsmodifizierende Bedeutung zukommt. Kombiniert werden sie mit Diuretika zur Linderung der Symptome. Des Weiteren finden Ivabradin, Herzglykoside und linksventrikuläre Assistenzsysteme Verwendung [1]. Abbildung 1 zeigt die Therapieempfehlungen der European Society of Cardiology in einem Flussdiagramm.



ACE = angiotensin-converting enzyme; ARB = angiotensin receptor blocker; CRT-D = cardiac resynchronization therapy defibrillator; CRT-P = cardiac resynchronization therapy pacemaker; H-ISDN = hydralazine and isosorbide dinitrate; HR = heart rate; ICD = implantable cardioverter-defibrillator; LBBB = left bundle branch block; LVAD = left ventricular assist device; LVEF = left ventricular ejection fraction; MR antagonist = mineralocorticoid receptor antagonist; NYHA = New York Heart Association.

^a Diuretics may be used as needed to relieve the signs and symptoms of congestion (see Section 7.5) but they have not been shown to reduce hospitalization or death.

^b Should be titrated to evidence-based dose or maximum tolerated dose below the evidence-based dose.

^c Asymptomatic patients with an LVEF $\leq 35\%$ and a history of myocardial infarction should be considered for an ICD.

^d If mineralocorticoid receptor antagonist not tolerated, an ARB may be added to an ACE inhibitor as an alternative.

^e European Medicines Agency has approved ivabradine for use in patients with a heart rate ≥ 75 b.p.m. May also be considered in patients with a contraindication to a beta-blocker or beta-blocker intolerance.

^f See Section 9.2 for details—indication differs according to heart rhythm, NYHA class, QRS duration, QRS morphology and LVEF.

^g Not indicated in NYHA class IV.

^h Digoxin may be used earlier to control the ventricular rate in patients with atrial fibrillation—usually in conjunction with a beta-blocker.

ⁱ The combination of hydralazine and isosorbide dinitrate may also be considered earlier in patients unable to tolerate an ACE inhibitor or an ARB.

Abbildung 1 – Flussdiagramm der aktuellen Empfehlungen der European Society of Cardiology zur Behandlung der Herzinsuffizienz [1]

Der Herzinfarkt ist eine „Nekrose eines umschriebenen Herzmuskelbezirks (...) durch anhaltende kritische myokardiale Minderperfusion bei Koronarinsuffizienz“ [12]. Das Auftreten eines Infarktes geht mit einer hohen Gefahr des Verlustes der Kontraktilität einher. Laut einer Studie von Ezekowitz et al. entwickeln rund drei Viertel aller Patienten innerhalb von 5 Jahren nach dem ersten Herzinfarkt, eine Herzinsuffizienz [23]. Andere Faktoren, die eine Rolle in der Entwicklung einer Herzinsuffizienz auf Basis einer KHK spielen, sind Stunning und Hibernation. Eine Einschränkung des Kontraktionsvermögens durch wiederkehrende kurze Ischämien wird als Stunning bezeichnet. Hibernation wiederum nennt man den hypokontraktile Zustand des Myokards, bei dem durch Anpassung an eine Minderversorgung zwar die Zellvitalität gesichert wird, jedoch keine suffiziente Kontraktion möglich ist [24].

Neben dem physiologischen Remodeling, das eine Anpassung des Herzens im Rahmen des körperlichen Wachstums darstellt, kann es auf dem Boden eines Myokardinfarkts, einer Hypertonie, einer Myokarditis, einer Myopathie oder eines Klappenitiums zum pathologischen Remodeling kommen. Gehen zum Beispiel nach einem Infarkt des Myokardiums kontraktile Anteile des Myokards verloren und die Belastung des übrigen Myokards steigt an, so werden sowohl das Infarktareal und dessen Randbezirk als auch das übrige Myokard Umbauprozessen unterworfen [21, 25]. Diese Prozesse umfassen eine „myozytäre Hypertrophie, Veränderungen der kontraktile Eigenschaften der Myozyten, einen progressiven Verlust von Myozyten durch Nekrose, Apoptose und Zelltod durch Autophagozytose, eine β -adrenerge Desensitivierung, gestörte myokardiale Vitalität und Stoffwechsel und Reorganisation der extrazellulären Matrix mit Auflösung der organisierten strukturellen Kollagenmatrix, welche die Myozyten umgibt, und Ersatz durch eine interstitielle Kollagenmatrix, die den Myozyten nicht als strukturelle Unterstützung dient“ [11].

Zu den biologischen Stimuli, welche die Prozesse des Remodelings nach sich ziehen, zählt die mechanische Dehnung der Myozyten [11]. Bei Verlust kontraktile Myokards und Dilatation des verbliebenen Gewebes erhöht sich der

Wandstress. Dieser Zusammenhang ist im Laplace-Gesetz festgehalten und mittels Formel 1 und Abbildung 2 nachvollziehbar. Das Laplace-Gesetz besagt auch, dass einer erhöhten Wandspannung durch Vergrößerung der Wandstärke entgegengewirkt werden kann [26].

$$K = P_{tm} \frac{r}{2d}$$

Formel 1 – Laplace-Gesetz; K = Wandspannung [N/m²],
P_{tm} = transmuraler Druck [Pa], r = Innenradius [m], d = Wanddicke[m]

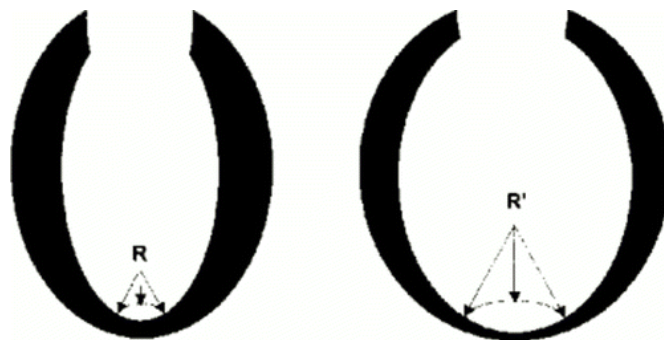


Abbildung 2 – Schema des Laplace-Gesetzes zur Darstellung der Auswirkung einer Ventrikeldilatation auf den Wandstress [7]

Weitere Stimuli sind „zirkulierende Neurohormone, inflammatorische Zytokine, andere Peptide und Wachstumsfaktoren sowie reaktive Sauerstoffspezies“ [11].

Unterschieden werden ein frühes Remodeling des infarzierten Areals, das sich dem Infarkt ereignis anschließt und innerhalb der ersten Tage stattfindet, und ein spätes Remodeling. Beim frühen Remodeling kommt es zur Nekrose der Myozyten und zu einer Beeinträchtigung des myokardialen Kollagennetzwerks, was zu einer Infarktexpansion, einer Ausdünnung der Ventrikelwand, sowie einer regionalen Dilatation führt [22, 27, 28]. Dabei sind die Lokalisation, die ursprüngliche Größe sowie die transmurale Ausdehnung des Infarkts entscheidend für das Ausmaß der ventrikulären Dilatation [7, 29]. Unabhängig von den negativen Folgen der Dilatation stellt diese eine Maßnahme zur initialen

Wiederherstellung des Schlagvolumens bei bleibend reduzierter Ejektionsfraktion dar [29].

Die zweite Phase des Remodeling erstreckt sich über Wochen und Monate und betrifft das gesamte Ventrikelmyokard [22, 25]. Eine weitere Dilatation des Ventrikels basiert nicht auf einer Infarktausdehnung, sondern geht auf Verlängerung der kontraktile Segmente und Änderungen der Ventrikelgeometrie von ellipsoid zu zylindrisch zurück [30, 31]. Die initiale Dilatation zum Erhalt des Schlagvolumens wirkt sich im weiteren Verlauf negativ auf die Pumpfunktion aus. Während im gesunden Ventrikel der steigende transmurale Druck in der isovolumetrischen Anspannungsphase mit einer Zunahme der Ventrikelwandstärke und einer Reduktion des Innenradius kompensiert wird, kommt es im Ventrikel nach Myokardinfarkt zu steigendem Wandstress [31, 32]. Vorgänge wie Hypertrophie der Myozyten, Ablagerung von Kollagen und Veränderungen der Ventrikelarchitektur haben zum Ziel, den Wandstress besser auf das verbliebene Myokard zu verteilen [25, 33]. Vermittelt durch Myofibroblasten im Infarktareal und durch Fibroblasten im übrigen Myokard erhöht sich die Expression von Kollagen I und III nach Myokardinfarkt [34]. Wenngleich die Ablagerung von Kollagen in der Infarktzone unablässig für den Erhalt der Ventrikelarchitektur ist, führt eine Fibrosierung des überlebenden Myokards zu einer Einschränkung der Funktionalität [35]. Kann der erhöhte Wandstress jedoch durch oben genannte Mechanismen nicht ausreichend kompensiert werden, kommt es im Verlauf zur fortschreitenden Dilatation des Ventrikels sowie zu einer weiteren Beeinträchtigung der Kontraktilität [25]. Die geschilderten Vorgänge sind in Abbildung 3 schematisch erfasst.

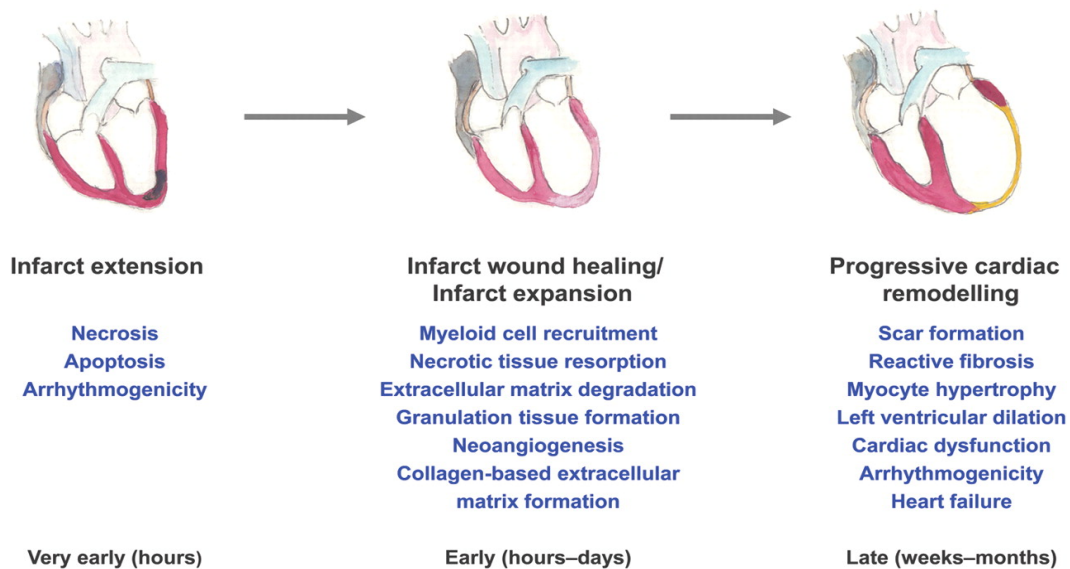


Abbildung 3 – Graphische Abbildung der kardialen Umbauvorgänge in der Folge eines Myokardinfarktes. Nach ischämisch bedingter Nekrose kommt es zunächst zur Infarktausdehnung, gefolgt von einer Phase der Wundheilung, welche schließlich in einem progressiven Remodeling endet [5]

Zwar ist die Limitierung der Infarktausdehnung mittels frühzeitiger Katheterintervention von unbestrittener Bedeutung, dennoch zeigen die beschriebenen Remodeling-Veränderungen den Stellenwert einer das Remodeling modifizierenden Therapie.

Das Endothel der Koronararterien spielt eine wichtige Rolle in der Progression der Herzinsuffizienz[36]. Bei der endothelialen Dysfunktion, der Kernursache der KHK, geht die Balance von vasokontraktiven und -relaxierenden Faktoren verloren. So kommt es zu einer Abnahme von relaxierenden Faktoren wie Stickstoffmonoxid (NO), Prostacyclin und den Endothelium-derived Hyperpolarizing Factors, während kontrahierende Faktoren wie Endothelin, Thromboxan A₂, Prostaglandin H₂ und auch Superoxidanionen zunehmen [37].

Neben der Regulation des Blutflusses und der Permeabilität beeinflusst das Endothel auf verschiedenen Wegen auch die Funktion und Struktur des Myokards [38]. NO hat dabei eine zentrale Rolle in den Signalwegen inne und wirkt sowohl auf autokrinem als auch auf parakrinem Weg auf die Funktionen des kardiovaskulären Systems. Vor der strukturellen Identifizierung wurde NO als „Endothelium Derived Relaxing Factor“ bezeichnet [39]. NO reguliert neben der

Vasomotorik, der Inhibition der Plättchenaggregation und der Neutrophilenadhäsion und -aktivierung auch die kontraktile Funktion der Myozyten [8, 40].

Adäquate Stimuli für die Freisetzung von NO aus intaktem Endothel sind vor allem die mechanische Reizung durch Scherkräfte oder pulsatile Dehnung, aber auch eine Acetylcholin-, Serotonin-, Bradykinin- oder Histamin-Rezeptoraktivierung [39-41]. Abgesehen von den bereits genannten Wirkungen hat NO in vielen Organsystemen eine Funktion in der intra- und interzellulären Kommunikation. Es fungiert als Bronchodilatator, spielt eine Rolle in der unspezifischen Immunabwehr, in der Neurotransmission, in der posttranslationalen Modifikation und wirkt auch auf die Expression, beispielsweise mindernd auf die Expression des interzellulären Adhäsionsmoleküls 1 (ICAM-1) [41-43].

NO wird durch das Hämprotein NO-Synthase (NOS) gebildet, von dem drei Isoformen beschrieben werden. Neben der neuronalen (nNOS) und der induzierbaren (iNOS) existiert die endotheliale NO-Synthase (eNOS), welche in zahlreichen kardiovaskulären Geweben exprimiert wird [40, 44]. Allen dreien ist gemeinsam, dass sie NO aus der Guanidino-Gruppe des L-Arginins und molekularem Sauerstoff unter Zuhilfenahme der Kofaktoren Nicotinamidadenindinucleotidphosphat (NADPH), Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD), Flavin-Mononukleotid (FM) und 5,6,7,8-Tetrahydrobiopterin (BH₄) synthetisieren [39, 42].

NO ist in der Lage, die Kontraktilität der Myozyten sowie deren Metabolismus, Wachstum und Rhythmus positiv zu beeinflussen. Fraccarollo et al. konnten zeigen, dass eine Stimulierung der eNOS bei durch experimentellen Infarkt verursachter Herzinsuffizienz mit einer Verbesserung des linksventrikulären Remodelings und der Kontraktilität einhergeht [38, 45, 46]. Des Weiteren ist die Unterbindung der kardialen Fibrose beziehungsweise der myozytären Hypertrophie nach Myokardinfarkt von NO abhängig [47, 48]. Auch

scheint NO ein Mediator der Angiogenese zu sein, sodass zu geringe NO-Spiegel die Neovaskularisation limitieren beziehungsweise hohe Spiegel diese fördern [49].

Seine Wirkung entfaltet NO auf verschiedenen Wegen. Einerseits aktiviert es die lösliche Guanylatcyclase (sGC), die daraufhin die Umwandlung von Guanosintriphosphat (GTP) in den second messenger zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) katalysiert, der wiederum zur Aktivierung der cGMP-abhängigen Protein-Kinase G (PKG1) führt [50]. Andererseits werden zahlreiche Vorgänge und Größen wie Gefäßtonus, Apoptose, Inflammation, elektro-mechanische Kopplung und Angiogenese im kardiovaskulären Gewebe durch S-Proteinnitrosylierung moduliert [44]. Im Falle der Regulation des stress-induzierten kardialen Remodelings scheint die Wirkung von NO sowohl über die NO-cGMP-PKG1-Achse als auch über S-Nitrosylierungen vermittelt zu werden [44].

Eine Verminderung der Bioverfügbarkeit von NO kann verschiedene Ursachen haben: eine verringerte Expression der NOS, fehlende Substrate oder Kofaktoren oder eine fehlerhafte Signalübertragung, welche in einer zu geringen Aktivierung der eNOS endet. Darüber hinaus spielen reaktive Sauerstoffspezies (ROS) eine wichtige Rolle [51, 52]. So reagieren Superoxidanionen (O_2^-) dreimal schneller mit NO zu Peroxynitrit ($ONOO^-$) als beispielsweise mit der sie inaktivierenden Superoxiddismutase [53, 54]. $ONOO^-$ kann oxidative Schäden in der Zelle sowie Nitrierung und S-Nitrosylierung von DNA, Proteinen und Fetten verursachen [42].

Die Gruppe der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) umfasst Produkte des normalen Zellmetabolismus, die sich vom Sauerstoff ableiten und eine hohe Reaktivität aufweisen. Zu diesen ROS gehören unter anderem O_2^- , das Hydroxyl-Radikal (OH) und Wasserstoffperoxid (H_2O_2), wobei das O_2^- das Primärradikal ist, aus dem die anderen ROS in Reaktionen wie der Haber-Weiss- oder der Fenton-Reaktion geformt werden [21]. ROS haben in der Zellabwehr und inter- wie intrazellulären Kommunikation durchaus physiologische Funktionen. Oxidation beziehungsweise Reduktion von Zielmolekülen können auch als Redox-Signaling

und ROS als second messenger verstanden werden. Die Spezifität der Oxidation wird durch die Reaktionsfähigkeit der ROS mit den Zielmolekülen, durch die zelluläre Kompartimentierung beziehungsweise durch den Produktionsort und nicht zuletzt durch die Konzentration der ROS gewährleistet [55, 56]. Physiologisches Redox-Signaling kommt im Herzen im Rahmen der elektromechanischen Kopplung, der Zelldifferenzierung, der Homöostase und der Stressanpassung zur Anwendung. Aber auch bei pathologischen Mechanismen, die im Zusammenhang mit der Herzinsuffizienz stehen, wie die kontraktile Dysfunktion, die Calciumdysfunktion, Hypertrophie, Zelltod, Herzrhythmusstörungen, Fibrose und Dilatation, ist das Redox-Signaling involviert [56].

Kommt es zu einer pathologischen Akkumulation der ROS, zum Beispiel bei der schweren Herzinsuffizienz, entweder durch erhöhte Produktion oder verminderte antioxidative Abwehr der Zelle, spricht man vom oxidativen Stress, welcher eine oxidative Dysbalance darstellt [21]. In diesem Zusammenhang nehmen die unspezifischen Effekte der ROS zu, und Zellbestandteile wie DNA, Lipide und Proteine können beschädigt werden [21, 56, 57]. Zu den Folgen erhöhter ROS-Spiegel zählen Zelltod, aber auch Anpassungsreaktionen wie Hypertrophie, Migration und Proliferation [58].

Zu den wichtigsten der zahlreichen ROS-bildenden Enzymen beziehungsweise Zellstrukturen gehören die mitochondriale Elektronentransportkette, die NAD(P)H-Oxidase, die Xanthine-Oxidase und die NO-Synthase (NOS) [21, 36]. Hierunter stellt die mitochondriale Atmungskette eine bedeutende ROS-Quelle dar, da sie von den 85% des vom Körper insgesamt aufgenommenen Sauerstoffs mindestens 0,1% zu Superoxidanionen verstoffwechselt [59, 60].

Um schädigende Einflüsse abzuwenden, haben die Zellen des Myokards nicht-enzymatische wie auch enzymatische Abwehrmechanismen. Unter Ersteren werden endogene Antioxidantien wie Glutathion, Vitamin E und Ascorbinsäure

genannt [21]. Zu letzteren zählen unter anderem die Magnesium- beziehungsweise Kupfer-Zink-Superoxiddismutase (MnSOD, CuZnSOD), die Katalase, die Gluthationperoxidase beziehungsweise -reduktase und die Häm-Oxygenase [21, 61-65]. Nach Myokardinfarkt scheint dabei vor allem die in den Mitochondrien lokalisierte MnSOD eine führende Rolle in der ROS-Abwehr einzunehmen [66]. Allerdings kann eine verstärkte Degradierung von O_2^- durch die SOD zu vermehrter Produktion von H_2O_2 führen [21].

Im Rahmen der Herzinsuffizienz kommt es sowohl im betroffenen Areal als auch im übrigen vitalen Myokard durch Aktivierung ROS-produzierender Enzyme und Minderung der antioxidativen Abwehr zum oxidativen Stress mit erhöhten ROS-Spiegeln, wobei vor allem die Zunahme der ROS-Produktion ins Gewicht zu fallen scheint [21, 35, 67-70]. Diese Prozesse finden in den Myozyten, den Endothelzellen und auch in eingewanderten Neutrophilen statt [21]. Die Ursachen für eine vermehrte ROS-Produktion sind nicht abschließend geklärt, jedoch stellen mechanische Überdehnung sowie Katecholamine, der Tumor-Nekrose-Faktor α (TNF α), Angiotensin II und Endothelin 1 adäquate Stimuli dar [71-75]. Ide et al. konnten zeigen, dass es im Zuge der Herzinsuffizienz zu einer vermehrten ROS-Produktion durch eine Aktivitätsminderung des NADH-Ubiquinon-Reduktase-Komplexes (Komplex I der Atmungskette) kommt [76, 77]. Diese Ergebnisse lassen eine Regulation der Atmungskette durch die oben genannten Stimuli vermuten [73]. Da die Konzentration an ROS in den Mitochondrien konsequenterweise besonders hoch ist, stellen die Mitochondrien auch ein besonders gefährdetes Ziel für oxidative Schäden dar. Diese Schäden können wiederum zu einer weiteren Dysfunktion der Mitochondrien führen [76]. Neben den genannten Einflüssen auf die Atmungskette steigern die oben genannten Stimuli durch posttranslationale Modifikation regulierender Untereinheiten und translationale Signalwege auch die Aktivität der NAD(P)H-Oxidase, was in der Folge eine vermehrte O_2^- -Produktion nach sich zieht [21, 78-80]. Es ist anzunehmen, dass die ROS eines ROS-produzierenden Systems andere ROS-produzierende Systeme schädigen und somit zur vermehrten ROS-Generierung im Sinne eines *circulus vitiosus* führen können.

Vielfach wurde eine Dysbalance im oxidativen Stoffwechsel in Zusammenhang mit Remodelingvorgängen wie Fibrose, Hypertrophie und Inflammation gebracht [21, 35, 56, 63, 72, 73]. Dies kann auch als fehlgeleitetes Redox-Signaling verstanden werden. Die Remodelingvorgänge werden durch ROS auf verschiedenen Wegen beeinflusst und können zur Entwicklung und Progression der Herzinsuffizienz beitragen [8, 21]. Neben der Aktivierung von Signalkaskaden und Transkriptionsfaktoren, die eine Hypertrophie nach sich ziehen, kommt es ebenfalls zur Oxidation wesentlicher Bestandteile der an der elektromechanischen Kopplung beteiligten Proteine [21]. Die Bioaktivität von NO an Proteinbindungsstellen kann, mittels direkter Inaktivierung oder kompetitiver Verdrängung durch ROS, gemindert werden [81]. Des Weiteren konnten Beeinträchtigungen der myozytären Zellfunktion durch Modifikation der am intrazellulären Kalziumhaushalt beteiligten Proteine nachgewiesen werden [82]. Aber auch die extrazelluläre Matrix steht unter dem Einfluss erhöhter ROS-Spiegel, was sich durch Anregung der Proliferation kardialer Fibroblasten beziehungsweise durch Aktivierung von Matrix-Metallo-Proteasen (MMPs) zeigt [21, 58, 83, 84]. Abbildung 4 zeigt die beschriebenen und weitere intrazelluläre Signalwege, welche durch ROS beeinflusst werden, graphisch auf.

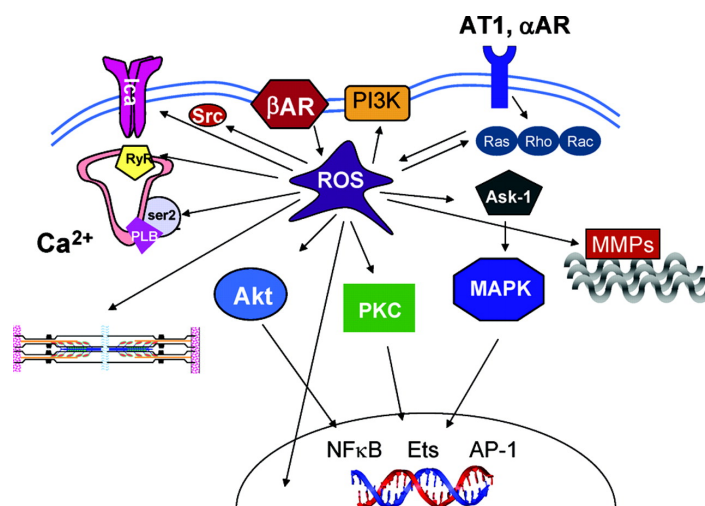


Abbildung 4 – Graphische Darstellung der vielfältigen Beeinflussung intrazellulärer Signalwege durch ROS [8]

Organische Nitrate wie Glycerintrinitrat (GTN), Pentaerythrithyltetranitrat (PETN) oder Isosorbidmononitrat (ISNM) und Isosorbiddinitrat (ISDN) sowie Molsidomin werden vor allem als Antianginosa in der Therapie der koronaren Herzkrankheit verwendet [39, 41]. Ziel der Therapie ist eine verbesserte myokardiale Sauerstoffbilanz mit erhöhtem Sauerstoffangebot durch intensivierete Koronarperfusion bei gleichzeitig vermindertem Sauerstoffbedarf durch gesenkte Vor- und Nachlast [39, 40]. Diese Wirkungen entstehen auf Basis einer Vasodilatation der Koronarien und der arteriellen und venösen Kapazitätsgefäße. Nur in höheren Dosen wird auch eine Dilatation von Widerstandsgefäßen in Form von Arteriolen bewirkt [85]. Die Wirkselektivität ist auf eine unterschiedliche Enzymausstattung zurückzuführen [39]. Es ist davon auszugehen, dass die Vasodilatation über eine NO-abhängige Aktivierung der sGC vermittelt wird, welche eine Steigerung der intrazellulären Konzentration von cGMP zu Folge hat. Eine erhöhte cGMP-Konzentration wiederum führt zu einem Absinken des zytoplasmatischen Kalziumspiegels und auf diesem Wege zu einer Relaxation der glatten Muskulatur [40, 41, 86, 87]. Neuere Erkenntnisse lassen darüber hinaus vermuten, dass zumindest im Fall von GTN eine NO-unabhängige Wirkung möglich scheint, da der Anstieg der NO-Konzentration bei therapeutischen Dosen in mehreren Studien nicht mit dem vasodilatativen Effekt korrelierte [88, 89].

Die organischen Nitrate werden als sogenannte Prodrugs appliziert und müssen somit im Körper durch eine Metabolisation aktiviert werden, um ihre Wirkung entfalten zu können [41]. Im Hinblick auf die Bioaktivierung wurden zwei Wege beschrieben: ein hochaffiner Reaktionsweg unter Einbeziehung der Aldehyd-Dehydrogenase-2 (ALDH-2) sowie ein niedrigaffiner, weniger potenter Mechanismus, der auch nicht-enzymatisch katalysierte Reaktionen beinhaltet [87, 90]. Letzterer ist vor allem für die Aktivierung der Isosorbitnitrate ISMN und ISDN verantwortlich [87].

Ein bekanntes Problem bei der Therapie mit organischen Nitraten ist die Toleranzentwicklung [40, 41, 86]. Bereits innerhalb von 24 Stunden können sich die hämodynamischen Effekte unter fortgesetzter GTN-Therapie abschwächen [40,

91]. Dies scheint zum Teil mit der Bioaktivierung verknüpft zu sein: Chen et al. konnten zeigen, dass die Reaktion von GTN zu Nitrit und Glycerindinitrat durch die Esteraseaktivität der ALDH-2 katalysiert wird, und eine Toleranz gegenüber GTN in Blutgefäßen mit einer Inhibition der ALDH-2 einhergeht [92, 93]. Eine mögliche Ursache der ALDH-2-Hemmung stellt die durch die Nitrat-Therapie induzierte Produktion von ROS dar [40, 41, 94]. Neben den bereits erwähnten negativen Effekten von ROS kann es durch Stoffe wie ONOO⁻ oder H₂O₂ zu einer oxidativen Inaktivierung von Cysteinresten im aktiven Zentrum der ALDH-2 kommen [95]. Weitere Theorien der Nitrattoleranzentwicklung umfassen die Neutralisation von NO durch ROS, eine reaktiv erhöhte Angiotensin-II-Bildung mit verstärkter Freisetzung von Endothelin und einen Mangel an SH-Gruppen, welche für die Bioaktivierung benötigt werden [39, 40, 96].

Ein weiterer unerwünschter Effekt der dauerhaften Therapie mit organischen Nitraten ist die endotheliale Dysfunktion, die sich unter anderem in einer erhöhten Sensibilität auf vasokonstriktorische Faktoren sowie einer Verschiebung des Verhältnisses von Matrix-Metallo-Proteasen (MMPS) und ihren Gewebe-Inhibitoren (TIMPs) zu Gunsten der TIMPs äußert [41, 97, 98].

Im Gegensatz zur hämodynamischen Toleranzentwicklung lassen sich die Induktion der ROS-Bildung und die damit verbundene Endothelschädigung durch Nitrat-freie Intervalle nicht vermeiden [40].

PETN findet als Koronartherapeutikum ausschließlich als Langzeitnitrat Verwendung. Die Ausgangssubstanz PETN wird zum Großteil bereits im Verdauungstrakt durch unspezifische Esterasen in den aktiven Metaboliten Pentaerythryltrinitrat (PETriN) gespalten. Im Anschluss an die intestinale Resorption wird PETriN zu den ebenfalls aktiven Metaboliten Pentaerythryldi- und -mononitrat weiter verstoffwechselt [40]. Die wichtigste Bioaktivierungsreaktion wird bei organischen Nitraten mit mindestens drei Nitro-Gruppen (GTN, PETN, PETriN) auf gleichem Weg durch die Katalyse der ALDH-2 vermittelt [95, 99]. In ALDH-2-defizienten Tieren oder bei medikamentöser

Inhibierung der ALDH-2 zeigten sich Effekte von PETN und GTN deutlich reduziert [95, 99]. Dabei ist die Bioaktivierung von PETN vom Kofaktor der ALDH-2 Nicotinamidadenindinukleotid (NAD) und der Superoxid-Dismutase (SOD) abhängig [87].

Wie bereits erwähnt, ist ein Nebeneffekt der Aktivierung von PETN und GTN die Induktion von oxidativem Stress, wobei eine mitochondriale Dysfunktion von Bedeutung zu sein scheint [100, 101]. PETN ist jedoch in der Lage, die Aktivität beziehungsweise die Spiegel der Häm-Oxygenase-I (HO-I) sowie von Bilirubin und Ferritin zu erhöhen [99, 101-103]. Wenn somit die Aktivierung von PETN im Gegensatz zu GTN weniger oxidativen Stress induziert, führt dies wiederum zu einer verringerten Inaktivierung der ALDH-2 und wirkt somit einer Toleranzentwicklung entgegen [95]. Darüber hinaus treten als Folge der verminderten ROS-Produktion endotheliale Dysfunktionen inklusive der Entkopplung der eNOS und die Aktivierung anderer ROS-generierender Enzyme vermindert auf [65].

Ziel dieser Arbeit ist es, Erkenntnisse über die Effekte der PETN-Langzeittherapie bei Herzinsuffizienz nach Myokardinfarkt zu gewinnen. Um eine größtmögliche Übertragbarkeit in den klinischen Alltag zu gewährleisten, wurde ein Tiermodell mit Herzinsuffizienz nach experimentellem Infarkt verwendet. Ermittelt wurden neben hämodynamischen Parametern die Ventrikelmorphologie und das Ausmaß des oxidativen Stress in Gefäßen und im Herzen. Darüber hinaus wurde die Expression ausgewählter in den Reduktions-Oxidations-Stoffwechsel eingebundener Enzyme erforscht.

2. Material und Methoden

2.1 Studienprotokoll

Es wurden erwachsene, männliche Wistar-Ratten (Harlan-Winkelmann, Kirchborchen, Deutschland) mit einem Gewicht von 200 bis 240g verwendet. Sie wurden in Käfigen mit maximal fünf Tieren bei einem 12-stündigen Hell-Dunkel-Rhythmus, einer Temperatur von $23\pm 1^\circ\text{C}$ und einer Luftfeuchtigkeit von $55\pm 5\%$ gehalten, wobei jederzeit Wasser und Standardfutter zur Verfügung standen.

Zwei Drittel der Tiere wurden mittels Ligatur des Ramus interventricularis anterior (RIVA) experimentell infarziert und anschließend in zwei Gruppen randomisiert. Den Tieren der PETN-Therapiegruppe wurde zwei Mal täglich das organische Nitrat PETN (Actavis, Langenfeld, NRW, Deutschland) in der Dosierung 90mg/kg Körpergewicht enteral appliziert, während die zweite Gruppe Wasser als Placebo erhielt. Zusätzlich wurde eine dritte Gruppe mit scheinoperierten (sham) Tieren geführt, welche ebenfalls Wasser als Placebo bekamen. Als Startpunkt der Therapie wurde der siebte Tag nach Myokardinfarktoperation ausgewählt, um Einflüsse auf die erste, frühe Phase zu vermeiden und die Wirkungen des PETNs auf die zweite Phase des Remodeling zu untersuchen. Nach neun Wochen Therapie wurden die Tiere nach Hämodynamik-Messungen getötet und Gewebeproben von Herz und Lunge entnommen. Mit diesem Material wurden Untersuchungen zum Redox-Stoffwechsel sowie molekularbiologische Analysen durchgeführt

2.2 Myokardinfarktoperation

Der experimentelle Herzinfarkt wurde nach der Methode von Pfeffer et al. an der linken Koronararterie durchgeführt [104]. Als volatiles Anästhetikum wurde Isofluran (Baxter, Höchststadt, Bayern, Deutschland) verwendet. Die narkotisierten Tiere wurden gewogen, nach Fixierung der Extremitäten auf einer

beheizten Unterlage endotracheal intubiert und mittels Respirator (Rodent Ventilator 7025; Ugo Basile, Comerio VA, Italien) volumenkontrolliert beatmet. Dabei wurde ein Atemzugsvolumen von 2,5ml bei einer Frequenz von 90/min gewählt.

Der Zugang zum Herzen wurde nach alkoholischer Desinfektion linksthorakal geschaffen. Hierfür mussten das Fell, der Musculus pectoralis sowie die Interkostalmuskulatur und das Perikard durchtrennt werden. Der Operationssitus wurde mittels eines Wundspreizers offengehalten. Nach Dislokation des Herzens aus dem Thorax konnte die linke Koronararterie dargestellt, der Ramus interventricularis anterior mit einem Prolene monofil 5-0-Faden (Ethicon, Norderstedt, Schleswig-Holstein, Deutschland) proximal umstochen und ligiert werden. Nach Reponation des Herzens und Verschluss der Pectoralismuskulatur mittels Tabaksbeutelnaht wurden die Tiere kurzfristig mit hohem positiven endexpiratorischen Druck beatmet, um eine vollständige Entfaltung der Lunge zu gewährleisten. Nach erneuter Desinfektion mit Alkohol wurde der operative Zugang qua Klammernähten geschlossen. Bevor die Tiere bei ausreichender Spontanatmung extubiert werden konnten, wurde zunächst die Inhalationsnarkose beendet und für den Zeitraum von 5-10min eine Beatmung mit Carbogen, einem Sauerstoff(95%)-Kohlendioxid(5%)-Gemisch durchgeführt. Zur Identifikation wurde der proximale Schwanz mittels eines Permanentmarkers numerisch markiert. Für die anschließenden fünf Stunden wurden die Tiere engmaschig beobachtet und gegebenenfalls mit einer Herzdruckmassage wiederbelebt.

Das Procedere der Scheinoperation glich dem der experimentellen Infarktion, bis auf die nicht durchgeführte Ligatur des Ramus interventrikularis anterior.

2.3 Hämodynamik-Messungen

Nach neunwöchiger Therapie wurden die Hämodynamik-Messungen durchgeführt. Hierfür wurden die Tiere erneut mit Isofluran narkotisiert, anschließend gewogen und, nach Fixierung der Extremitäten auf einer beheizten Unterlage, endotracheal intubiert. Sämtliche Messungen wurden unter leichter Isoflurannarkose bei Spontanatmung durchgeführt.

Zur Platzierung eines mit isotonischer Kochsalzlösung gefüllten Katheters (PE 50; Portex, Kent, England) im linken Ventrikel wurde die Arteria carotis punktiert. Hierfür musste diese dargestellt und distal wie proximal mit Permaseidenfäden 4-0 (Ethicon, Norderstedt, Schleswig-Holstein, Deutschland) ligiert werden. Nach Arteriotomie zwischen den Ligaturen konnte über eine PE-50-Schleuse der Katheter vorgeschoben werden, wobei die Lage der Katheterspitze anhand der Druckkurven überprüft wurde. Die Impulsaufnahme wurde mittels eines Mikromanometers (Millar Instruments, Houston, TX, USA) und eines Druckwandlers (Modell P-50, Statham, Gould, Cleveland, OH, USA) gewährleistet, die über einen Dreivegehahn mit dem Katheter verbunden wurden. In diesem Versuchsaufbau konnten der linksventrikuläre systolische Druck (LVSP), der linksventrikuläre enddiastolische Druck (LVEDP) sowie die Druckdifferenz in Abhängigkeit der Zeit (dp/dt) ermittelt werden. Anhand letzterer lässt sich auf die Kontraktilität des myokardialen Gewebes schließen.

Über die PE-50-Schleuse konnte nach Abschluss der oben genannten Messungen ein Conductance-Katheter (SPR-774, Millar Instruments, Houston, TX, USA) in den linken Ventrikel vorgeschoben werden. Mit Hilfe dieses Katheters und der PVAN 2.8 Software (Millar Instruments, Houston, TX, USA) konnten das linksventrikuläre endsystolische sowie enddiastolische Volumen (LVESV beziehungsweise LVEDV) mittels Messung der elektrischen Impedanz bestimmt werden. Diese Methode basiert auf abweichenden elektrischen Leitfähigkeiten unterschiedlich großer Volumina. Zur Darstellung der Druck beziehungsweise Druck-Volumen-Diagramme wurde die Software BioBench (National Instrument,

Austin, Tx, USA) verwendet. Aufgrund der Leitfähigkeit des das Ventrikelvolumen umschließenden Herzgewebes werden bei der Messung mit dem Conductance-Katheter falsch hohe Werte ermittelt. Zur Korrektur wurde von den gemessenen Volumina das Parallel-Volumen (V_P) subtrahiert. Die Bestimmung des V_P gelang mit Hilfe einer kurzfristigen Änderung der Leitfähigkeit des Blutes durch Injektion von 15-20 μ l hypertoner Kochsalzlösung in die Vena jugularis ohne signifikante Folgen auf die Druck- beziehungsweise Volumenverhältnisse.

Wie in Formel 2 dargestellt ist, bildet die Differenz der gemessenen Volumina in Relation zur EDV die linksventrikuläre Ejektionsfraktion (EF) ab.

$$EF [\%] = \frac{EDV - ESV}{EDV} \cdot 100$$

Formel 2 - Berechnung Ejektionsfraktion [EF] aus Enddiastolisches Volumen [EDV] und endsystolisches Volumen [ESV]

2.4 Organentnahme

Mit Ende der Hämodynamik-Messungen wurde die Inhalationsnarkose vertieft, um nach Eröffnung des Thorax das Herz und die Lunge zu entnehmen. Hierzu wurde den Tieren eine kardioplege Kaliumchlorid(KCl)-Lösung injiziert und das Herz für zwei Minuten in 4°C temperierter KCl-Lösung gebadet. Nach Abtrennung der Vorhöfe und des rechten Ventrikel wurde der linke Ventrikel für die weiteren Untersuchungen aufgeteilt: Mittlere Ringe von ca. 3 mm Dicke wurden zur Bestimmung der Infarktgröße sowie für immunhistochemische Untersuchungen verwendet. Teile der Apicum wie der Herzbasis wurden für Untersuchungen bezüglich des oxido-reduktiven Haushalts und für molekularbiologische Analysen bei -80°C aufbewahrt. Biopsien der Septum im Bereich der Apicum in unmittelbarer Nähe zu den mittleren Ringen wurden für Kollagenbestimmungen über 48 Stunden in Formalin (Merck, Darmstadt, Deutschland) fixiert.

Die Lungen wurden nach der Entnahme zunächst feucht gewogen und nach Trocknung bei Raumtemperatur erneut. Durch Subtraktion der Trockenmasse von der Feuchtmasse konnte der Flüssigkeitsgehalt im Lungengewebe ermittelt werden.

2.5 Infarktgrößenbestimmung

Zur Bestimmung der Infarktgröße wurden aus dem mittleren Anteil des linken Ventrikels mit Hilfe eines Schlitten-Mikrotoms (Leica CM 1850, Bensheim, Hessen, Deutschland) in 100µm großen Abschnitten 7µm dicke Ringe geschnitten. Nach Übertragung auf einen Objektträger wurden diese mit einer Picriosus-Red-Färbung (1g Direct Red 80 pro 1l gesättigter Picrinsäure, Fluka, Sigma-Aldrich, Steinheim, BW, Deutschland) gefärbt. Mittels dieser Färbung konnte dunkelrotes, nekrotisches Gewebe von vitalem, ockergelb gefärbtem unterschieden werden. Nach Waschung der Schnitte wurden diese mit Ekuitt® (Fluka, Sigma-Aldrich, Steinheim, BW, Deutschland) fixiert.

Zur Digitalisierung wurde eine auf einem Mikroskop bei 25-facher Vergrößerung (Axioskop 2, Zeiss, Jena, Thüringen, Germany) angebrachte Kamera (DLX-930, Sony, Tokio, Japan) verwendet.

Die planimetrische Vermessung wurde mittels der SigmaScan Pro Software (Sigma Scan Pro 5.0, Systat Software Inc., San Jose, CA, USA) durchgeführt. Hierfür wurden die epi- und endokardiale Infarktarnbenlänge nebst linksventrikulärem epi- und endokardialen Gesamtumfang vermessen. Unter Zuhilfenahme dieser Werte konnte das Infarktareal als prozentualer Anteil des Gesamtumfangs errechnet und im Anschluss der Mittelwert aller Schnitte nach Formel 3 für jedes der Tiere bestimmt werden.

$$\text{Infarktgröße}[\%] = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \left(\frac{\text{epikard.Narbenlänge}}{\text{epikard.Gesamtumfang}} + \frac{\text{endokard.Narbenlänge}}{\text{endokard.Gesamtumfang}} \right)_i$$

Formel 3 – Mittelwertberechnung der relativen Infarktgröße in Prozent, n= Anzahl der ausgewerteten Ventrikelschnitte

Für alle weiteren Untersuchungen wurde lediglich Gewebe von Ratten mit extensivem Infarkt des linken Ventrikels von mindestens 40% bis maximal 60% eingesetzt.

2.6 Myozytengrößenbestimmung

Die Myozytengrößenbestimmung erfolgte via Epifluoreszenzmikroskopie. Geachtet wurde hierbei auf eine gute Sichtbarkeit der Zellgrenzen und des Zellkerns, um eine klare Unterscheidung von Blutgefäßen oder Artefakten zu gewährleisten.

Zur Vorbereitung der Gefrierschnitte für die Färbung mussten diese im Wärmeschrank bei 37°C langsam aufgetaut werden, nach dreiminütiger Fixierung in reinem Aceton (Sigma-Aldrich, Steinheim, BW, Deutschland) fünf Minuten luftgetrocknet und anschließend dreimal in PBS-Puffer (0,01M) (P3813 PBS Puder, Sigma-Aldrich, Steinheim, BW, Deutschland) gewaschen werden. Die Darstellung der Zellgrenzen erfolgte mit Alexa Fluor® 594 (1mg/ml) (Alexa Fluor® 594 wheat germ agglutinin, Invitrogen, Karlsruhe, BW, Deutschland), dessen Anregungsbeziehungsweise Emissionsmaximum bei 591 beziehungsweise 618nm liegt. Der DNA-spezifische Farbstoff Hoechst 33342 (Invitrogen, Karlsruhe, BW, Deutschland), der ein Anregungsbeziehungsweise Emissionsmaximum von 350 beziehungsweise 461 aufweist, fand zur Markierung der Zellkerne Verwendung. Die Färbung der Schnitte mit beiden Farbstoffen konnte zeitgleich erfolgen. Die in PBS-Puffer (0,01M) gelösten Farbstoffe wurden hierfür in Konzentrationen von 4µM Hoechst 33342 beziehungsweise 10µg/ml Alexa Fluor® für 15 Minuten auf die Präparate gegeben. Nach viermaligem Waschen mit PBS-Puffer (0,01M)

wurden die Schnitte mit Vectashield® Mounting Medium (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) fixiert.

Die Digitalisierung erfolgte bei 200-facher Vergrößerung mittels einer auf einem Fluoreszenzmikroskop (Eclipse TE 2000-S, Nikon, Tokio, Japan) angebrachten Kamera (DLX-390, Sony, Tokio, Japan). Dabei wurden jeweils drei bis vier Aufnahmen von Myozytengruppen aus epikardial beziehungsweise endokardial gelegenen Anteilen des Myokards gemacht, um die Errechnung eines repräsentativen Mittelwertes zu ermöglichen.

Die weitere Verarbeitung am Computer erfolgte mit der SigmaScan Pro beziehungsweise Adobe Photoshop 6.0 (Adobe Systems Inc., San Jose, CA, USA) Software. Pro Aufnahme wurden die Zellgrenzen von mindestens 20 Myozyten mittels des Photoshop-Tools „Magnetisches Lasso“ markiert. Des Weiteren wurden die Zellkerne der markierten Zellen gezählt und die Pixelzahl der markierten Flächen ausgelesen. Zur Berechnung der durchschnittlichen Myozytengröße wurden, wie in Formel 4 festgehalten, die Pixel aller markierten Flächen durch die Anzahl der Zellkerne dividiert.

$$\text{Myozytenfläche } A[\text{Pixel}] = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \left(\frac{\text{Markierte Flächen}}{\text{Anzahl der Zellkerne}} \right)_i$$

Formel 4 - Durchschnittliche Myozytengröße in Pixel, n= Anzahl der ausgewerteten Aufnahmen

2.7 Kollagengehaltbestimmung

Unter Einsatz der Hellfeldmikroskopie wurde der quantitative Kollagengehalt im überlebenden Myokard ermittelt. Die in Formalin fixierten Gewebeproben wurden mit Picrius-Red-Färbung (1g Direct Red 80 pro 1l gesättigter Picrinsäure, Fluka, Sigma-Aldrich, Steinheim, BW, Deutschland) gefärbt und anschließend in Paraffin eingebettet.

Drei zufällig ausgewählte Ausschnitte der gefärbten Schnitte wurden bei 10-facher Vergrößerung mittels einer auf einem Mikroskop (Axioskop 2, Zeiss, Jena, Thüringen, Germany) angebrachten Kamera (DLX-930, Sony, Tokio, Japan) zwei Mal digital abfotografiert. Das erste Mal durch einen, das rote Farbspektrum absorbierenden Blaufilter (Schott BG23 3.0, Itos, Mainz, Rheinland-Pfalz, Deutschland), wodurch die rot gefärbten Kollagenfasern im Vergleich zu den hellen Myozyten dunkel abgebildet wurden. Die zweite Aufnahme wurde in polarisierendem Licht gemacht, welches die Kollagenfasern hell und das übrige Gewebe dunkel erscheinen ließ. Durch Subtraktion der Helligkeitswerte jedes einzelnen Pixels konnten diejenigen Pixel identifiziert werden, welche in ihrem Graustufenwert vom Schwarzcode 0 abwichen. Diese wurden in einer Binärumwandlung auf den Weißcode 1 gesetzt. Somit entstand ein Schwarz-Weiß Bild mit weißen, dem Kollagen entsprechenden Flächen. Die Pixelzahl dieser Flächen konnte mit Hilfe der Software Scion Image (Scion Image for Windows Version Beta 4.0.2, Scion Corporation, Frederick, MD, USA) bestimmt werden. Anschließend wurden, wie aus Formel 5 ersichtlich, die ermittelte Pixelzahl ins Verhältnis zur Gesamtpixelzahl gesetzt und der Mittelwert generiert.

$$Kollagengehalt [\%] = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \left(\frac{\text{Anzahl wei\ss e Pixel}}{\text{Gesamtpixelzahl}} \right)_i$$

Formel 5 – Durchschnittliche Kollagengehaltbestimmung; n= Anzahl der ausgewerteten Aufnahmen

2.8 Bestimmung der Angiogenese

Zur Bestimmung der Angiogenese wurde eine immunhistochemische Färbung mit einem CD31-Antikörper (MCA 2388, ABD Serotec, Düsseldorf, NRW, Deutschland) eingesetzt.

Die gefrorenen, in Tissue Tek® (Sakura Finetek, Alphen aan den Rijn, Niederlande) fixierten Schnitte wurden im Wärmeschrank bei 37°C langsam aufgetaut. Zur Blockierung unspezifischer Antikörperbindungsstellen wurden die Schnitte mit 2%igem Pferdeserum (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) für

30min geblockt. Im Anschluss daran fand die Inkubation mit dem primären Antikörper für zwei Stunden bei Raumtemperatur statt. Nach Waschung mit PBS-Puffer (0,01M) (P3813 PBS Puder, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) wurde der sekundäre biotinylierte Antikörper für 30min bei Raumtemperatur auf die Schnitte gegeben. Als Detektionsreagenz fand Fluorescein Avidid DCS (M.O.M Immundetektion Kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) Verwendung.

Zur digitalen Aufnahme der Schnitte wurde auch hier die Kombination aus einem Mikroskop bei 10-facher Vergrößerung (Axioskop 2, Zeiss, Jena, Thüringen Germany) und einer Kamera (DLX-930, Sony, Tokio, Japan) verwendet.

Die Auswertung am Computer wurde mithilfe der Software SigmaScan Pro beziehungsweise Adobe Photoshop 6.0 durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden die CD31-positiven Zellen pro Mikroskopfeld ausgezählt.

2.9 Proteinextraktion

Um Analysen des Expressionsmusters verschiedener Gewebe mittels Western Blotting durchführen zu können, mussten die Proteine aus dem Gewebe in Suspension gebracht werden.

Zunächst wurde hierfür das Gewebe mittels Mörser und Stößel unter Verwendung von flüssigem Stickstoff zu einem Pulver zerrieben. Zum Erreichen des Zellaufschlusses wurde dem Pulver ein Disruption-Puffer (Tris-Chlorwasserstoff (HCl) 30mmol/l, pH 7,6; MgCl₂ 5mmol/l; Dithiothreitol 1mmol/l; Natriumcholat 1%; Triton-X-100 1%; Natriumdodecylsulfat 0,025%; Saccharose 250mmol/l; PMSF 1mM + Complete, Mini, Ethylendiamintetraessigsäurefrei (EDTA-free) mit Protease Inhibitor Cocktail Tablets (Roche Applied Science, Basel, Schweiz)) beigemischt. Von dieser Suspension wurde ein Teil in ein Reaktionsgefäß (2ml Safe-Lock Reaktionsgefäß, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) abpipettiert, um eine Trennung in Membran- und Zytoplastfraktion zu

erzielen. Der Rest wurde mit einem Tensid-haltigen Disruption-Puffer vermengt, um so die Membranen der Zellen zu zerstören, und anschließend ebenfalls in ein Reaktionsgefäß übertragen.

Nach zehnminütiger Zentrifugation bei 8000 x g und 4°C (Hettich Universal 320R) wurde der das Gesamtprotein enthaltende Überstand abpipettiert und bei -80°C in Reaktionsgefäßen eingefroren. Das aus Kollagen und anderen, nicht in eine homogene Suspension zu bringenden Gewebebestandteilen bestehende Pellet wurde verworfen.

2.10 Isolation der myozytären Mitochondrien

Wie erwähnt, stellen die Mitochondrien die größte Quelle der reaktiven Sauerstoffspezies dar. Die Isolation der Mitochondrien aus dem Gewebe des linken Ventrikels ermöglichte genauere Analysen bezüglich der Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies sowie der Veränderungen im Proteinexpressionsmuster der Mitochondrien.

Für die Isolation fand das Qproteome Mitochondria Isolation Kit (QIAGEN, Hilden, NRW, Deutschland) Verwendung. Alle im beigefügten Protokoll beschriebenen Arbeitsschritte wurden bei 4°C durchgeführt. Nach Massenbestimmung mittels Analysenwaage wurde das Gewebe mit Skalpell und Tissue Ruptors (QIAGEN, Hilden, NRW, Deutschland) in einem Reaktionsgefäß (2ml Safe-Lock Reaktionsgefäß, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) zerkleinert und mit Lysis Buffer (0,033ml/mg Gewebemasse) homogenisiert. Hierdurch wurde eine Kontinuitätsunterbrechung der Zellmembran ohne Auflösung selbiger erreicht. Dies ermöglichte die Extraktion zytosolischer Proteine bei intakten Zellkompartimenten und Zytomembranen. Nach zehnminütiger Inkubation sowie Zentrifugation für 10min bei 1000 x g und 4°C (Hettich Universal 320R, Tuttlingen, BW, Deutschland), konnten der Überstand mit überwiegend zytosolischen Proteinen verworfen und das Pellet in Disruption Buffer (0,025 ml/mg

Gewebemasse) suspendiert werden. Zum Schutz der in Lösung gebrachten Proteine wurde jeweils kurzfristig vor Verwendung sowohl dem Lysis Buffer als auch dem Disruption Buffer eine Protease Inhibitor Solution zugegeben. Zur Unterstützung der Zellzeretzung durch den Disruption Buffer wurde die Lösung in einem Glasmörser (Kimble Chase Life Science, Vineland, NJ, USA) homogenisiert. Nach zentrifugaler Auftrennung in Reaktionsgefäßen für 10min bei 1000 x g wurde der überwiegend aus Mitochondrien und Mikrosomen bestehende Überstand abgenommen. Durch erneute Zentrifugation für 10min bei 6000 x g konnte die Suspension in einen die Mikrosomen enthaltenden Überstand und ein Mitochondrien-Pellet getrennt werden. Zur Purifikation der Mitochondrien wurde das Pellet mit Mitochondria Storage Buffer (0,017 ml/mg Gewebemasse) resuspendiert und erneut für 20min bei 6000 x g zentrifugiert. Die isolierten Mitochondrien wurden in 2 µl Hydroxyethylpiperazinyethansulfonsäure-(HEPES)-Puffer pro mg ursprünglicher Gewebemasse resuspendiert und in Reaktionsgefäßen bei -80°C eingefroren.

Um Konzentrationsunterschiede in den Mitochondriensuspensionen verschiedener Proben auszugleichen, wurden eine Proteinmengenbestimmung mit Hilfe der Bradford-Methode (s.u.) durchgeführt und die Konzentrationen mit HEPES-Puffer angepasst.

Die Reinheit der isolierten Mitochondrien wurde mithilfe eines Western Blots überprüft. Hierfür wurden Antikörper gegen BiP (Cell Signaling, Beverly, MA, USA), welches als Chaperone-Protein die korrekte Faltung von Proteinen innerhalb des endoplasmatischen Retikulum unterstützt, sowie gegen Histon H3 (Cell Signaling, Beverly, MA, USA), einem Proteinbestandteil der Nukleosomen, verwendet.

2.11 Bestimmung der Superoxidanionen

Zur Quantifikation der Superoxidanionen in vitalem Myokardium wurde nach der von Fraccarollo et al. modifizierten Dihydroethidium-basierten HPLC-Methode verfahren [105]. Die Menge der oxidativen Metaboliten in der gesamten Zelle wurde mittels des Superoxidindikators Dihydroethidium (DHE, Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) detektiert. Um eine genauere Differenzierung des Produktionsortes zu erreichen, wurde MitoSOX™ Red (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) verwendet, welches sich durch Kopplung eines lipophilen, positiv geladenen Benzolrestes an das DHE in Membranen der Mitochondrien einlagert und so einen Rückschluss auf die mitochondriale reaktive Superoxidanionen-Menge ermöglicht [106].

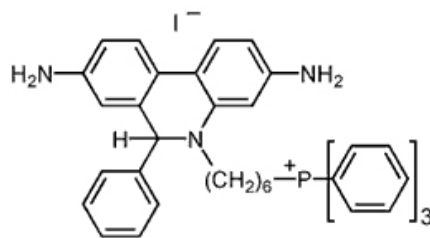


Abbildung 5 – Strukturformel des MitoSOX Red™. Durch Kopplung des Benzolrestes an das DHE-Molekül über eine Phosphatbindung lagert sich MitoSOX-Molekül in Doppellipidmembranen ein [3]

Bei einer Reaktion mit dem Superoxidanion ($O_2^{\cdot-}$) entsteht aus DHE der Metabolit 2-Hydroxyethidium (2-OH-E⁺), während die Reaktion mit anderen ROS sowie durch Licht den Metaboliten Ethidium (E⁺) hervorbringt [2, 107]. Abbildung 6 zeigt die Oxidation von DHE durch $O_2^{\cdot-}$ als Strukturformeln, Abbildung 7 die Strukturformeln der durch Oxidation entstehenden Metabolite von DHE.

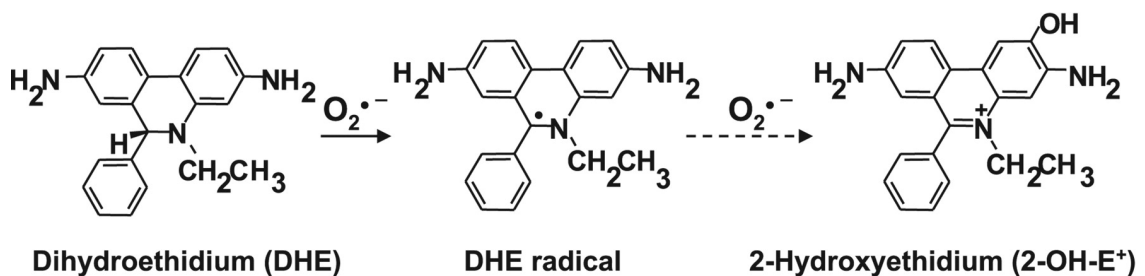


Abbildung 6 – Strukturformeln der Oxidation von DHE zu 2-OH-E⁺ durch $O_2^{\cdot-}$ [6]

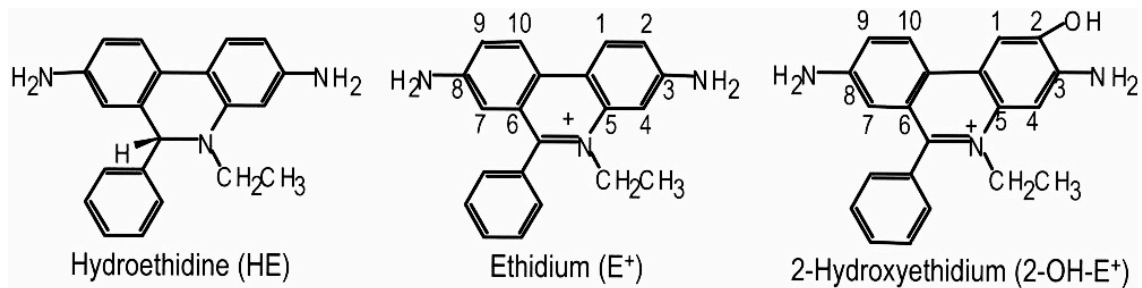


Abbildung 7 – Dihydroethidium mit seinem durch O_2^- oxidierten Metaboliten 2-Hydroxyethidium sowie dem zum Beispiel bei Lichtexposition entstehenden Metaboliten Ethidium [2]

Durch die unterschiedliche molekulare Masse der Metabolite ist eine Trennung in der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) mit anschließender Quantifizierung durch elektrochemische Detektion möglich [108].

Die von Bindegewebe freipräparierten, einen Millimeter langen Aortenringe wurden für 30min bei 37°C in 0,5 ml einer DHE-HEPES-Lösung (1,58mol/l) beziehungsweise MitoSOX™-HEPES-Lösung (6,33mol/l) in einem Thermoschüttelblock (Thermomixer comfort, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) inkubiert. Um einer Oxidation durch Licht vorzubeugen, wurden Reaktionsgefäße mit Lichtschutz (1,5 ml Safe-Lock Reaktionsgefäß, ambra, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) verwendet und, um weitere Reaktionen des DHE zu unterbinden, alle folgenden Schritte bei 4°C durchgeführt. Nach zweimaliger Waschung in Hepes-Puffer, um nicht oxidiertes DHE zu entfernen wurden die Aortenringe in einem Glasmörser (Kimble Chase Life Science, Vineland, NJ, USA) mit 80µl einer Methanol-Lösung homogenisiert. Nach Zentrifugation für 12min bei 14000 x g wurde dem Homogenisat als internem Standard 1ng/ml konzentrierte Kaffeesäure in Methanol zugegeben. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß transferiert und für die Auftrennung und Analyse via HPLC beziehungsweise elektrochemischer Detektion bei -80°C gelagert. Rückstände im Glasmörser sowie das Pellet wurden mit 200 µl einer 1 M NaOH-Lösung resuspendiert und für eine Proteinbestimmung nach der Bradford-Methode für 24h in einem End-Over-Shaker inkubiert.

Ebenso wurden 80µl der in HEPES-Puffer suspendierten, isolierten Mitochondrien des linken Ventrikels in einem Reaktionsgefäß mit Lichtschutz in

0,5 ml MitoSOX™-HEPES-Lösung (6,33mol/l) für 20min bei 37°C inkubiert und anschließend für 10min bei 6000 x g zentrifugiert. Nach Waschung des Mitochondrien-Pellets mit 200 µl HEPES-Puffer und erneuter Zentrifugation bei gleichen Vorgaben wurden die Mitochondrien in 80 µl einer Methanol-Lösung resuspendiert und bei -20°C eingefroren. Auch hier enthielt die Methanollösung als internen Standard 1ng/ml Kaffeesäure. Nach 24 Stunden wurden die isolierten Mitochondrien mit kleinen Plastikpastillen zerstoßen und für 12min bei 14000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß mit Lichtschutz transferiert und für die Analyse mittels HPLC und elektrochemischer Detektion bei -80°C gelagert.

Zur Auftrennung des DHE beziehungsweise MitoSOX™-DHE, des durch Superoxidanionen oxidierten 2-OH-E⁺ beziehungsweise MitoSOX™-2-OH-E⁺ und des durch andere ROS und Licht oxidierten E⁺ beziehungsweise MitoSOX™-E⁺ wurde eine HPLC angewendet. Die stationäre Phase stellte eine LC-Säule (Synergi 4µ Polar- FP 80A, 250 x 460 mm, 00G-4336-E0, Phenomenex, Aschaffenburg, Bayern, Deutschland) dar. Als mobile Phase wurde ein Puffer auf Wasserbasis (Octansulfonsäure (30mg/l), NaH₂PO₄ (7g/l) und 35 % Acetonitril) verwendet, welcher mit Phosphorsäure (85 %) auf pH 2,7 titriert wurde. Für die Separation des MitoSOX™ und seiner Oxidationsprodukte wurde der Acetonitrilanteil auf 40% erhöht. Der HPLC-Puffer als mobile Phase wurde filtriert (0.45µm, Millipore, Merk Group, Billerica, MA, USA) und mit einer Flussrate von 0,9ml/min durch die stationäre Phase gepumpt (Pharmacia LKB HPLC-Pump 2248, Uppsala, Schweden).

Zur Detektion wurde ein ESA Coulchem II Detektor (Thermo Scientific, Sunnyvale, USA) mit einer analytischen Zelle (ESA Modell 5011, Thermo Scientific, Sunnyvale, USA) verwendet. In der Zelle werden vorbeifließende Metabolite reduziert. Die entstehende Stromstärke ist zur Metabolitenmenge proportional. Während der Analysen war die erste Elektrode auf 0,00 V, die zweite auf 0,35 V eingestellt. Die Darstellung und Auswertung der Kurven wurden mittels der Software Pharmacia (Pharmacia, Uppsala, Schweden) durchgeführt.

Die Bildung des Quotienten der Flächen unterhalb der Kurven von 2-OH-DHE⁺ beziehungsweise MitoSOX™-2-OH-DHE⁺ und der Kaffeesäure ermöglichte eine Fehlerkorrektur bezüglich möglicherweise variierender Injektionsmengen in das HPLC-EC-System. Wie aus Formel 6 ersichtlich, wurden die oxidierten Mengen in willkürlichen Einheiten (arbitrary units, a.u.) angegeben

$$\text{Menge } 2 - \text{OH} - \text{DHE}^+ [\text{a.u.}] = \frac{2 - \text{OH} - \text{DHE}^+ [A]}{\text{Kaffeesäure} [A]}$$

Formel 6 – Berechnung der 2-OH-DHE⁺ Menge als arbitrary units. Durch Bildung eines Quotienten der Flächen unterhalb der Kurve von 2-OH-DHE⁺ und der Kaffeesäure konnten variierende Injektionsmengen korrigiert werden

2.12 Proteinmengenbestimmung

Um Auswertungsfehler durch unterschiedliche Proteinkonzentrationen in den verschiedenen Proben zu korrigieren, wurde die Proteinmenge mittels Photospektrometrie bestimmt. Im Anschluss wurden Konzentrationsunterschiede für die elektrophoretische Auftrennung und das Western Blotting durch Addition von HEPES-Puffer angeglichen.

Es fand der Protein Assay (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) auf Basis des Bradford-Tests Verwendung. Diesem Test liegt eine Verschiebung des Absorptionsmaximums von $\lambda = 465\text{nm}$ auf $\lambda = 595\text{nm}$ des sauren Farbstoffes Coomasie® Brilliant Blue (Protein Standard I, Bio-Rad, Hercules, USA) durch Proteinbindung zu Grunde. Mit Hilfe von bovinem γ -Globulin (Protein Standard I, Bio-Rad, Hercules, USA) wurde eine Standard-Kurve erstellt. Die Standardreihe sowie die zu analysierenden Proben wurden in 5 ml Protein Assay Dye Reagent (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) suspendiert.

Die Extinktion wurde mit Hilfe eines Spektrophotometers (Urospec 3100 pro, GE Healthcare, Chalfont St Giles, GB) bei $\lambda = 595\text{nm}$ gemessen.

2.13 Gelelektrophorese

Um Veränderungen im Proteinexpressionsmuster mittels Western Blotting feststellen zu können, wurden die Proteine der Proben zunächst via Gelelektrophorese ihrer Größe nach aufgetrennt.

In einem elektrischen Feld wirken verschiedene Kräfte auf geladene Moleküle. Hierzu zählen unter anderem die Beschleunigungskraft ($F_e = \text{Ladung } q \times \text{elektrische Feldstärke } E$) und die Reibungskraft ($F_{fr} = \text{Reibungskoeffizient } f_c \times \text{Wanderungsgeschwindigkeit } v$). Beeinflusst von molekularer Größe, Ladung und Gestalt bewegen sich Moleküle im elektrischen Feld unterschiedlich schnell. Dieser Vorgang wird auch als zonenelektrophoretisches Trennprinzip bezeichnet.

Um eine Auftrennung ausschließlich nach der molekularen Masse zu erreichen, wurde den Proben das anionische Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) zugegeben. Es bricht bei Erwärmung auf 95°C die Sekundär- und Tertiärstruktur der Peptidketten auf und überlagert durch seine negative Ladung die Eigenladung der Proteine. Da kleinemolekulare Proteine schneller durch die Poren eines Polyacrylamidgels zur Anode wandern als großmolekulare, legen sie im gleichen Zeitintervall eine größere Strecke zurück. Um eine optimale Auftrennung der Proteine zu erreichen, wurde die Dichte des Polyacrylamidgels durch Variation des Polyacrylamidanteils angepasst. Je dichter die Matrix des Gels, desto langsamer die Auftrennung, was vor allem bei kleinemolekularen Peptidketten von Vorteil ist.

Die Bandenschärfe wurde unter Verwendung der diskontinuierlichen Gelelektrophorese erhöht. Dieses Verfahren basiert auf dem Prinzip der Anordnung eines großporigen Sammelgels mit pH 6,8 vor einem kleinporigen Trenngel mit pH 8,8 sowie dem Einsatz eines Trishydroxymethylaminomethan (TRIS)-Chlorid/TRIS-Glycin-Puffers. Der isoelektrische Punkt des Glycins liegt bei pH 5,97, sodass das Glycin im Sammelgel zum Teil als Zwitterion vorliegt und als sogenanntes „Folge-Ion“ langsam wandert. Die negativ geladenen Chlorid-Ionen

besitzen indes eine sehr hohe elektrophoretische Mobilität und werden infolgedessen auch „Leit-Ion“ genannt. Die elektrophoretische Mobilität der Proteine liegt zwischen denen des Folge- beziehungsweise des Leit-Ions. Bei Anlage eines elektrischen Feldes kommt es durch Ausbildung eines Feldstärkegradienten zur Isotachophorese. Schnell wandernde Proteine befinden sich in einem schwachen elektrischen Feld und folgen direkt auf das Leit-Ion, wohingegen sich im Bereich der langsam wandernden Proteine beziehungsweise des Folge-Ions eine starke Feldstärke einstellt. Demzufolge werden langsam wandernde, große Proteine durch das Folge-Ion vor sich hergeschoben. Dadurch bewegen sich alle Proteine unabhängig von ihrer eigenen elektrophoretischen Mobilität gleich schnell. Während des Laufs durch das Sammelgel kommt es zum „Stacking“-Effekt, einer stapelhaften Anordnung der Protein-Ionen nach ihrer elektrophoretischen Mobilität. Einerseits gelingt so eine Vorsortierung und Konzentration der Proteine, andererseits wird die Aggregation verhindert. Nach dem Übergang der Ionen in das kleinporige Trenngel wirken Reibungskräfte auf die Proteine, wodurch diese aufgehalten werden. Dies trifft nicht auf das niedermolekulare Glycin zu, das zudem nun nicht mehr als Zwitterion vorliegt und an den übrigen Proteinen vorbeiziehen kann. Dadurch sind diese von einem homogenen Puffer umgeben und trennen sich nach dem zonenelektrophoretischen Prinzip auf [109].

2.14 Western Blotting

Zur qualitativen und quantitativen Auswertung der aufgetrennten Proteine wurde sich des Western Blotting Verfahrens mit einer lumineszierenden Darstellung der Proteinbanden bedient.

Die in der Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine wurden unter Verwendung eines Tankblottingsystems (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) auf eine Polyvinylidenfluoridmembran (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) transferiert. In Transferkassetten wurden das Gel und die Membran zwischen jeweils zwei

Filterpapiere und Schwämme gelegt und senkrecht in einen Tank mit Puffer geklemmt. Während des Transfers wurde für eine ausreichende Kühlung und Durchmischung des Puffers gesorgt, wobei die angelegte Spannung die Transferdauer beeinflusste. Durch ein senkrecht zum Gel und der Membran stehendes elektrisches Feld wurden die Proteine auf die Membran transferiert und vom schneller wandernden SDS getrennt. Nur durch diese Trennung ist eine Wechselwirkung der Proteine mit der Transfermembran möglich. Das dem Puffer zugesetzte Methanol verstärkt diesen Trennvorgang, indem es die Wechselwirkungen zwischen Proteinen und SDS verringert und gleichzeitig die Wechselwirkungen zwischen Proteinen und Membranoberfläche verstärkt [109]. Im Anschluss an den Transfer der Proteine wurde die Membran für eine Stunde mit einem „Blocking Agent“ (ECL Blocking Agent, GE Healthcare, Chalfont St Giles, GB) inkubiert, um unspezifische Antikörperbindungsstellen zu eliminieren.

Die Inkubation mit dem in TBS-Tween-Puffer gelösten primären Antikörper erfolgte bei 4°C über 24 Stunden. Die Antigen-Antikörper-Reaktion beruht auf sterischer Komplementarität, Wasserstoffbrücken- sowie Ionenbindungen, Van-der-Waals-Kräften und hydrophoben Wechselwirkungen. Tabelle 1 zeigt die als primäre Antikörper verwendeten Immunglobuline sowie deren Verdünnung.

Bip	1:1000	Cell Signaling, Danvers, MA, USA
eNOS	1:2500	BD, Franklin Lakes, NJ, USA
GAPDH	1:100000	Abcam, Cambridge, MA, USA
Histon H3	1:1000	Cell Signaling, Danvers, MA, USA
HO-1	1:1000	Cell Signaling, Danvers, MA, USA
MnSOD	1:10000	Abcam, Cambridge, MA, USA

Tabelle 1 – Verwendete Antikörper mit Angabe der angewandten Verdünnung sowie der Hersteller

Nach der Inkubation wurden die Membranen auf Raumtemperatur erwärmt und zur Elimination ungebundener Antikörper fünf Mal mit TBS-Tween-Puffer gewaschen. Die Inkubation mit dem sekundären Antikörper wurde über eine Stunde bei Raumtemperatur durchgeführt. Als sekundäre Antikörper kamen, je

nach Quelle des primären Antikörpers, ein monoklonaler (Anti-mouse IgG, HRP-linked Antibody, Cell Signaling, Danvers, MA, USA) beziehungsweise ein polyklonaler (Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody, Cell Signaling, MA, Danvers, USA) Antikörper zum Einsatz. Das an die sekundären Antikörper gebundene Marker-Enzym Meerrettichperoxidase katalysiert die Oxidation von chemilumineszierenden Substraten wie z.B. Luminol. Um nicht gebundene sekundäre Antikörper zu entfernen, wurde die Membran im Anschluss an die Inkubation erneut 5 Mal mit TBS-Tween-Puffer gewaschen.

Als Detektionsreagenz wurde Amersham™ ECL™ beziehungsweise Amersham™ ECL™ Plus Western Blotting Detection Reagents Amersham (GE Healthcare, Chalfont St Giles, GB) verwendet. Die Membranen wurden bei Verwendung von ECL™ 1min beziehungsweise von ECL™ Plus 5min inkubiert.

Die Lumineszenz wurde, nach Absaugen des Detektionsreagenz, mithilfe von Filmen (Amersham Hyperfilm ECL, GE Healthcare, Chalfont St Giles, GB) detektiert [109]. Abbildung 8 zeigt das Prinzip der Bandendetektion.

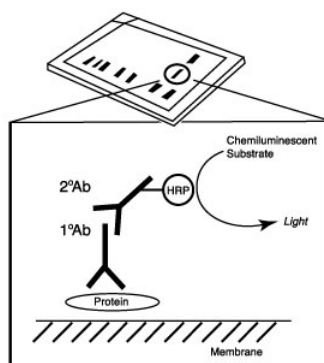


Abbildung 8 – Schematische Darstellung des Prinzips der Bandendetektion mittels primärem und sekundärem Antikörper. Das an den sekundären Antikörper gekoppelte Enzym Meerrettichperoxidase katalysiert die Oxidation eines chemilumineszierenden Reagenz. Das entstehende lumineszierende Licht kann mit Filmen detektiert werden. [4]

Nach Digitalisierung mittels eines Durchlichtscanners (JX 330, Sharp, Osaka, Japan) erfolgte die Auswertung am Computer mithilfe der Software Scion Image (Scion Image for Windows Version Beta 4.0.2, Scion Cooperation, Maryland, USA).

Dabei wurde die ermittelte Signalstärke eines detektierten Proteins stets durch ein konstant und ubiquitär exprimiertes Protein wie beispielsweise Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) dividiert, um mögliche Unterschiede in der Ladungsmenge der Gelelektrophoresetaschen auszugleichen.

2.15 Statistische Auswertung

Die Angabe sämtlicher Ergebnisse erfolgt als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts (mean+SEM). Zur Prüfung der Nullhypothese H_0 - „es besteht kein Unterschied in den Ergebnissen der verschiedenen Gruppen“ - wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse herangezogen. Paarweise Mittelwertvergleiche erfolgten mit dem Fisher's Protected Least Significant Difference Test. Als statistisch signifikant beziehungsweise höchst signifikant wurde eine Wahrscheinlichkeit p für H_0 von $p < 0,05$ beziehungsweise $p < 0,01$ gewertet. Als Statistiksoftware für alle Auswertungen wurde StatView (StatView for Windows 5.0.1, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) verwendet.

3. Ergebnisse

3.1 Infarktgröße, myokardiale Hypertrophie und Lungenödem

Zwischen den Gruppen infarktoperierter Tiere konnte kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der endo- beziehungsweise epikardialen Ausbreitung des Infarkts im Verhältnis zum Gesamtumfang festgestellt werden (Pla $0,527\pm 0,012$, PETN $0,511\pm 0,011$). Aus Abbildung 9 ist ersichtlich, dass die Herzen scheinoperierter Tiere erwartungsgemäß keinen Infarkt aufwiesen.

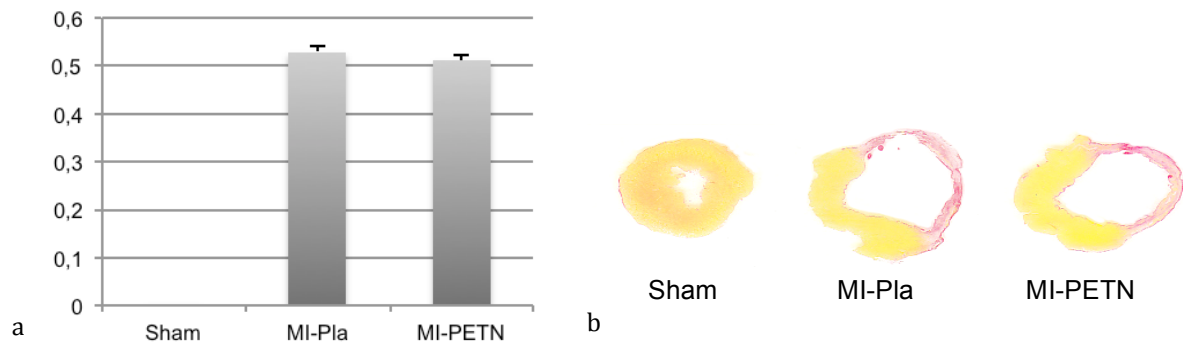


Abbildung 9 – a Anteil des linksventrikulären Infarktareals am Gesamtumfang plus Standardabweichung. b Exemplarische Schnitte des linken Ventrikels aus den Studiengruppen. Jeweils 10 Wochen nach Operation – Scheinoperierte Tiere (Sham), Tiere mit Infarkt und 9-wöchiger Placebogabe (MI-Pla), Tiere mit Infarkt und 9-wöchiger Therapie mit PETN (MI-PETN); n=11-14.

Abbildung 10 ist zu entnehmen, dass die Ratio aus Gewicht des linksventrikulären Myokards und des Körpergewichtes keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen vorwies. Die Betrachtung der absoluten Myozytengröße zeigte jedoch einen signifikanten Unterschied zwischen scheinoperierten Tieren ($5823,0\pm 210,033$ Pixel) und herzinsuffizienten Tieren unter Placebogabe ($6651,769\pm 151,250$ Pixel). Die Nitrat-Therapie konnte eine Hypertrophie nicht signifikant verhindern, es kam jedoch unter der Therapie im Vergleich mit scheinoperierten Tieren zu keiner signifikant verstärkten Hypertrophie ($6383,273\pm 226,504$ Pixel).

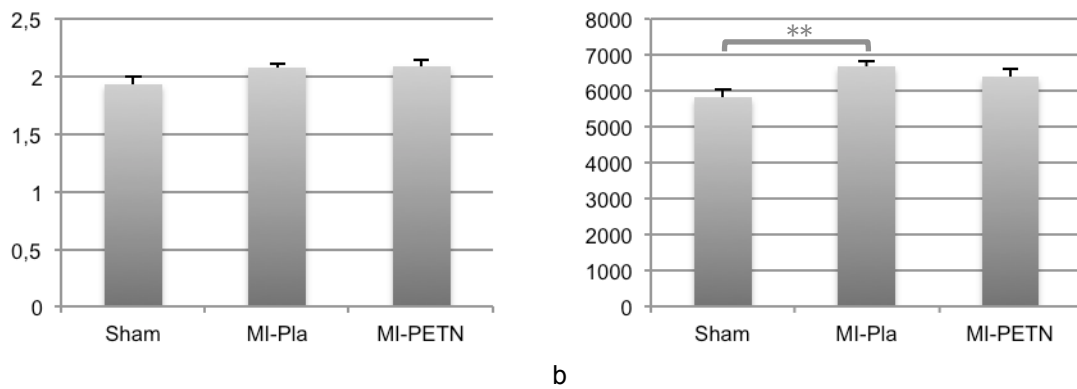


Abbildung 10 – a Mittelwerte des Verhältnisses der linksventrikulären Masse zur Körpermasse plus Standardabweichung bei n=11-15. b Mittelwert der Myozytengröße in Pixel plus Standardabweichung; n=11-13, ** = p < 0,01. Jeweils 10 Wochen nach Operation – Scheinoperierte Tiere (Sham), Tiere mit Infarkt und 9-wöchiger Placebogabe (MI-Pla), Tiere mit Infarkt und 9-wöchiger Therapie mit PETN (MI-PETN).

Ein Lungenödem entsteht durch pulmonalvenöse Stauung im Sinne eines Rückwärtsversagens und spiegelt dann die linksventrikuläre Insuffizienz klinisch in Form einer Dyspnoe wieder [110]. Die Gewichtsunterschiede zwischen frisch entnommenem und getrocknetem Lungengewebe lassen einen Rückschluss auf das Ausmaß des Lungenödems zu. Wie Abbildung 11 zu entnehmen, zog ein Myokardinfarkt in signifikantem Maße ein Lungenödem nach sich (Sham 1,066±0,028 mg, MI-Pla 2,278±0,342 mg). Die Therapie mit PETN hatte keinen Einfluss auf die Ausbildung eines Lungenödems (MI-PETN 2,388±0,436 mg).

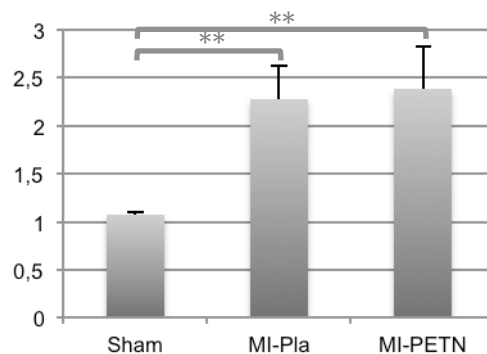


Abbildung 11 – Mittelwerte der Differenz des feuchten und getrockneten Lungengewebes in mg plus Standardabweichung; 10 Wochen nach Operation – Scheinoperierte Tiere (Sham), Tiere mit Infarkt und 9-wöchiger Placebogabe (MI-Pla), Tiere mit Infarkt und 9-wöchiger Therapie mit PETN (MI-PETN); n=11-15; ** = p<0,01.

3.2 Hämodynamische Messungen

Die Messungen der Hämodynamik zeigten ein diverses Bild, wie aus Tabelle 2 ersichtlich ist.

	Sham	MI-Pla	MI-PETN
MAP [mmHg]	101,650±4,568	92,329±2,860	89,418±4,568 ^b
LVSP [mmHg]	159,875±7,076	117,907±5,120 ^a	126,391±6,234 ^b
LVEDP [mmHg]	4,567±0,366	25,793±3,123 ^a	27,173±4,836 ^b
RAP [mmHg]	6,254±0,604	11,038±1,996 ^a	6,092±0,707 ^c
dP/dt max	11191,727±381,373	5372,600±313,673 ^a	7268,000±902,186 ^{b,c}
EF [%]	52,527±2,826	38,551±1,900 ^a	50,272±4,349 ^c
LVESV [μl]	32,285±0,132	49,827±2,468 ^a	37,879±3,383 ^c
LVEDV [μl]	49,930±1,524	70,911±3,470 ^a	61,770±3,319

Tabelle 2 – Hämodynamische Messungen, Mittelwerte plus Standardabweichung; mittlerer Druck in der Aorta (MAP), linksventrikulärer systolischer Druck (LVSP), linksventrikulärer enddiastolischer Druck (LVEDP), Vorlast (RAP), Kontraktilität (dP/dt max), Ejektionsfraktion (EF), linksventrikuläres endsystolisches Volumen (LVESV), linksventrikuläres enddiastolisches Volumen; n=11-15, a = p<0,05 Sham – MI-Pla, b = p<0,05 Sham – MI-PETN, c = p<0,05 MI-Pla – MI-PETN; 10 Wochen nach Operation – Scheinoperierte Tiere (Sham), Tiere mit Infarkt und 9-wöchiger Placebogabe (MI-Pla), Tiere mit Infarkt und 9-wöchiger Therapie mit PETN (MI-PETN).

So wurde der arterielle Mitteldruck (MAP) durch die PETN-Therapie im Vergleich zu scheinoperierten Tieren unter Placebogabe signifikant erniedrigt.

Auch hinsichtlich der linksventrikulären Drücke ergaben sich signifikante Unterschiede im Vergleich der scheinoperierten zu den Tieren mit Myokardinfarkt. Scheinoperierte Tiere erreichten höhere linksventrikuläre systolische Drücke, bei gleichzeitig niedrigeren enddiastolischen Drücken. In den Gruppen der infarzierten Tiere zeigten sich jedoch keine signifikanten Unterschiede.

Der rechtsatriale Druck, als Parameter der Vorlast, konnte durch PETN-Therapie unterhalb jenes Drucks in den scheinoperierten Tieren gehalten werden. Im Unterschied dazu kam es bei infarzierten Tieren unter Placebo zu einer signifikanten Erhöhung der Vorlast.

Die Messungen der Kontraktilität ergaben eine signifikant bessere Leistung der scheinoperierten Tiere. Innerhalb der Gruppe der infarzierten Tiere konnte die PETN-Therapie eine signifikant verbesserte Kontraktilität bewirken. Die verbesserte Kontraktilität offenbarte sich auch in der gemessenen Ejektionsfraktion (EF), die zur Quantifizierung einer Herzinsuffizienz herangezogen werden kann [15].

Bezüglich der linksventrikulären Volumina konnte die Gabe von PETN-Therapie die Steigerung des endsystolischen Volumens nach Myokardinfarkt im Vergleich zur Placebogabe signifikant abschwächen. Dies lässt sich mit der erhaltenen Auswurffraktion in Verbindung bringen. Nach Myokardinfarkt kam es unabhängig von der Substratgabe zu einer Dilatation, welche sich in einem vergrößerten enddiastolischen Volumen zeigte.

3.3 Kollagen im Myokard

Die Untersuchung des Kollagengehalts innerhalb des Myokards zeigte unter Placebogabe eine deutlich erhöhte Kollagenablagerung in den Herzen der infarzierten Tiere. Die PETN-Behandlung konnte eine Fibrosierung effektiv unterbinden, sodass der Kollagengehalt der therapierten Tiere nahezu auf dem Niveau der scheinoperierten lag. Abbildung 12 zeigt exemplarische Beispiele aus den Studiengruppen.

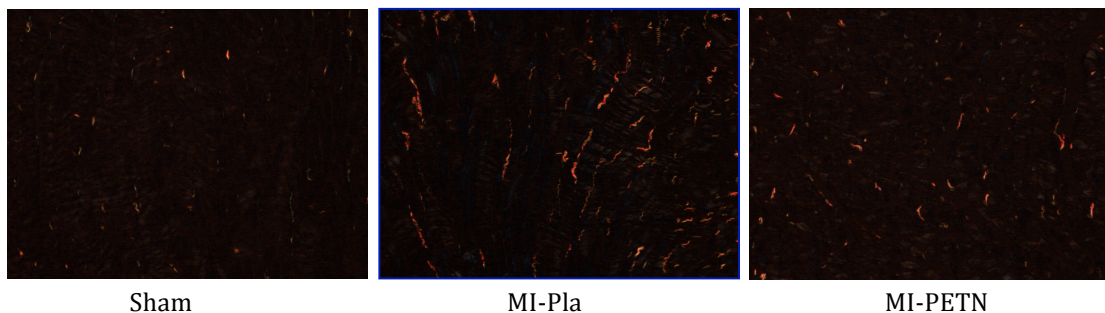


Abbildung 12 – Exemplarische Schnitte in der Hellfeldmikroskopie zeigen den Kollagengehalt 10 Wochen nach Operation – Scheinoperierte Tiere (Sham), Tiere mit Infarkt und 9-wöchiger Placebo-Gabe (MI-Pla), Tiere mit Infarkt und 9-wöchiger Therapie mit PETN (MI-PETN).

3.4 Angiogenese

Das Ausmaß der Angiogenese zeigte in der Folge eines Myokardinfarktes einen signifikanten Abfall (Sham $12,086 \pm 0,837$ CD31/Feld, MI-Pla $10,046 \pm 0,474$ CD31/Feld). Die Therapie mit PETN konnte diesen Abfall vollständig unterbinden, sodass die Angiogenese auf Niveau der scheinoperierten Tiere ($12,096 \pm 0,713$ CD31/Feld) lag, was aus Abbildung 13 hervorgeht.

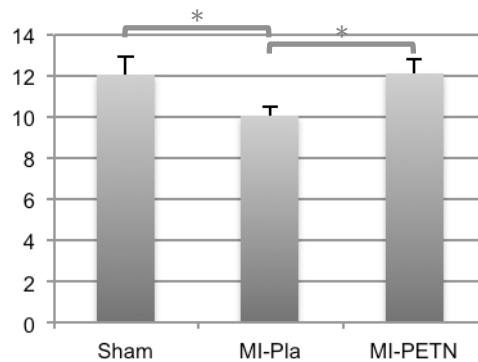


Abbildung 13 - Mittelwert der CD31-positiven Zellen pro Mikroskopfeld plus Standardabweichung zur Quantifizierung Angiogenese [CD31/Feld]; 10 Wochen nach Operation - Scheinoperierte Tiere (Sham), Tiere mit Infarkt und 9-wöchiger Placebogabe (MI-Pla), Tiere mit Infarkt und 9-wöchiger Therapie mit PETN (MI-PETN); n=8-11; * = p<0,05

3.4 Reaktive Sauerstoffspezies

Die Konzentration von Superoxidanionen wurde sowohl im Gewebe der Aorta als auch direkt im Myokard ermittelt. Die Messungen im Aortengewebe ergaben höchst signifikant erhöhte Superoxidspiegel bei Tieren mit Myokardinfarkt unter Placebogabe ($0,07 \pm 0,012$ a.u. (arbitrary unit)) im Verhältnis zu scheinoperierten Tieren ($0,041 \pm 0,003$ a.u.). Unter dem Einfluss von PETN ($0,045 \pm 0,005$ a.u.) konnte dieser Anstieg nach Myokardinfarkt signifikant unterbunden werden, wie Abbildung 14 darstellt. Ein vergleichbares Ergebnis konnte für die mitochondriale Superoxidanionkonzentrationen gezeigt werden.

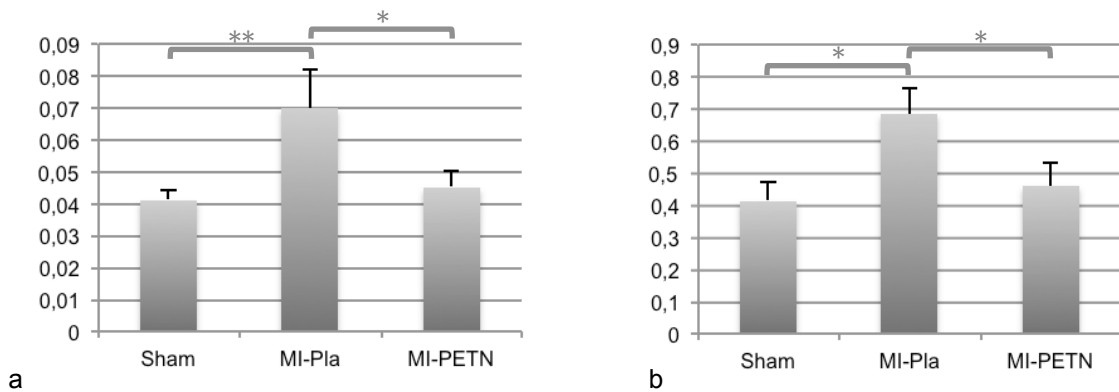


Abbildung 14 – a Mittelwert der ROS im Gewebe der Aorta in a.u. plus Standardabweichung; n=6-14. b Mittelwert der mitochondrialen ROS im Gewebe der Aorta korrigiert in a.u. plus Standardabweichung n= 12-16. * = p<0,05, ** = p<0,01; Jeweils 10 Wochen nach Operation – Scheinoperierte Tiere (Sham), Tiere mit Infarkt und 9-wöchiger Placebogabe (MI-Pla), Tiere mit Infarkt und 9-wöchiger Therapie mit PETN (MI-PETN).

Auch bei Messungen der Menge mitochondrialer reaktiver Sauerstoffspezies im Myokard präsentierte sich ein vergleichbares Bild. Abbildung 15 beschreibt, dass die scheineroperierten (0,021±0,002 a.u.) und PETN-therapierten, infarzierten Tiere (0,023±0,003 a.u.) ähnlich niedrige Konzentrationen aufwiesen, die Spiegel bei Tieren mit Myokardinfarkt unter Placebogabe (0,033±0,003 a.u.) aber signifikant erhöht waren.

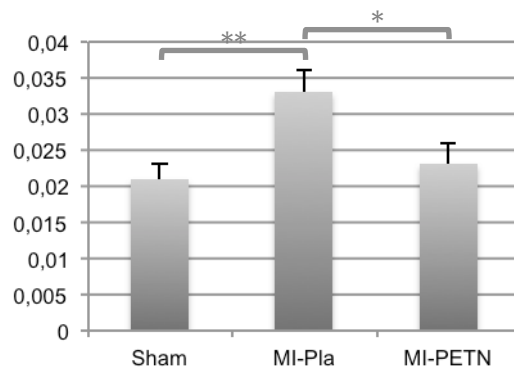


Abbildung 15 - Mittelwert der mitochondrialen ROS im linksventrikulären Myokard in a.u. plus Standardabweichung 10 Wochen nach Operation – Scheinoperierte Tiere (Sham), Tiere mit Infarkt und 9-wöchiger Placebogabe (MI-Pla), Tiere mit Infarkt und 9-wöchiger Therapie mit PETN (MI-PETN); n=8-10; * = p<0,05, ** = p<0,01.

3.5 Proteinexpressionsmuster

Ergänzend zu den Untersuchungen der Superoxidspiegel wurden verschiedene Proteine mit Einfluss auf die Redox-Homöostase im Gewebe der Aorta untersucht.

So zeigten sich beispielsweise Unterschiede in der Expression des Enzyms MnSOD im Gewebe der Aorta, welche in Abbildung 16 zu sehen sind. Der Myokardinfarkt führte in Tieren unter Placebogabe ($0,284 \pm 0,046$ a.u.) zu einer erniedrigten Expression der MnSOD im Vergleich zu scheinoperierten Tieren ($0,391 \pm 0,034$ a.u.), während die Therapie mit PETN die Expression der MnSOD im aortalen Gewebe aufrecht erhielt ($0,514 \pm 0,031$ a.u.).

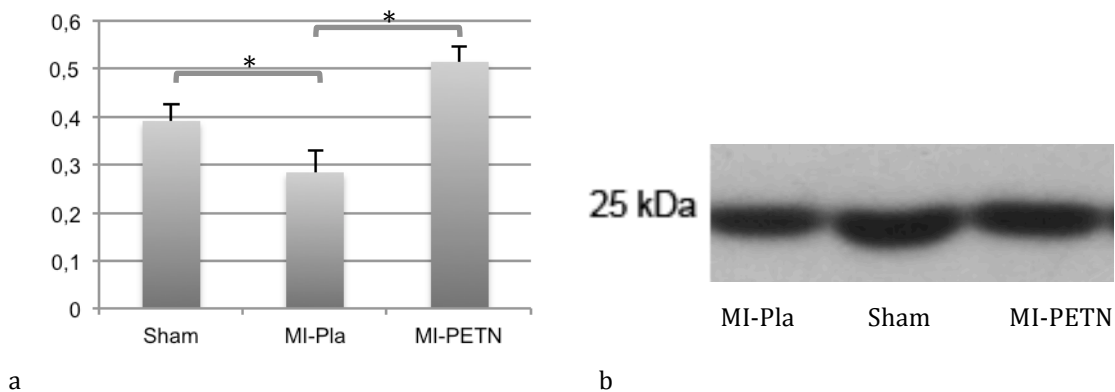
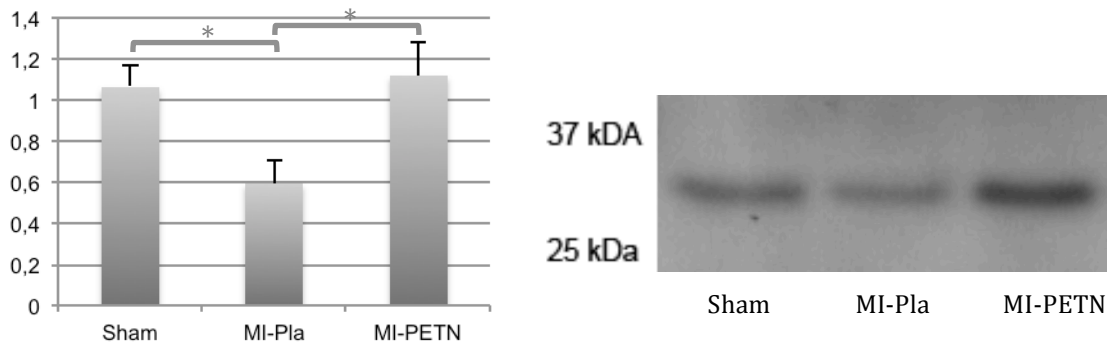


Abbildung 16 – a Mittelwert der Expression von MnSOD normalisiert durch die ubiquitär konstant exprimierte GAPDH plus Standardabweichung 10 Wochen nach Operation – Scheinoperierte Tiere (Sham), Tiere mit Infarkt und 9-wöchiger Placebogabe (MI-Pla), Tiere mit Infarkt und 9-wöchiger Therapie mit PETN (MI-PETN); , n=8-9, * = $p < 0,05$. b Exemplarischer Western Blot.

Ähnliches konnte auch für die HO-1 beobachtet werden, was aus Abbildung 17 zu ersehen ist. Im Vergleich mit den scheinoperierten Tieren ($1,063 \pm 0,101$ a.u.) kam es unter der Nitratgabe ($1,116 \pm 0,163$ a.u.) zu einer Induktion der Expression im Gewebe der Aorta. Im Gegensatz dazu führte der Myokardinfarkt unter Placebo ($0,591 \pm 0,116$ a.u.) zu einer signifikant verminderten Expression.

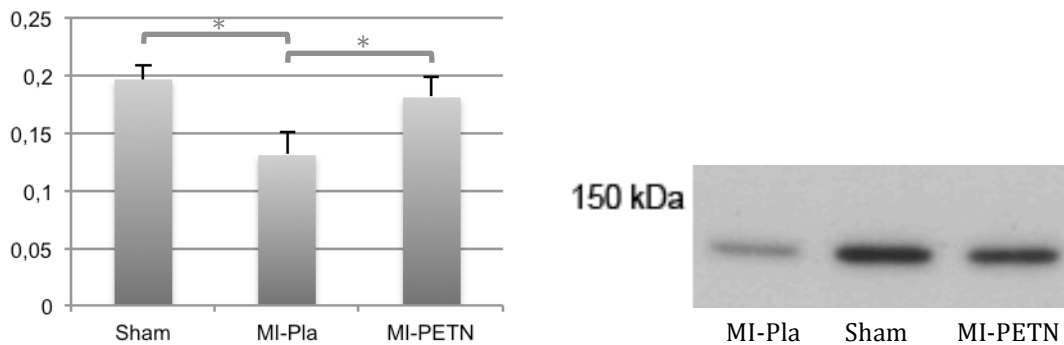


a

b

Abbildung 17 – a Mittelwerte der Expression von HO-1 normalisiert durch die ubiquitär konstant exprimierte GAPDH plus Standardabweichung 10 Wochen nach Operation – Scheinoperierte Tiere (Sham), Tiere mit Infarkt und 9-wöchiger Placebogabe (MI-Pla), Tiere mit Infarkt und 9-wöchiger Therapie mit PETN (MI-PETN); , n=5, * = p<0,05. b Exemplarischer Western Blot.

Die Therapie mit PETN hielt die Expression der eNOS auch nach Myokardinfarkt ($0,181 \pm 0,017$ a.u.) annähernd auf dem Niveau von scheinoperierten Tieren ($0,196 \pm 0,012$ a.u.), wohingegen es zu einem Abfall unter der Placebogabe kam ($0,131 \pm 0,019$ a.u.). Dies ist anhand der Abbildung 18 zu erkennen.



a

b

Abbildung 18 – a Mittelwerte der Expression von eNOS normalisiert durch die ubiquitär konstant exprimierte GAPDH plus Standardabweichung 10 Wochen nach Operation – Scheinoperierte Tiere (Sham), Tiere mit Infarkt und 9-wöchiger Placebogabe (MI-Pla), Tiere mit Infarkt und 9-wöchiger Therapie mit PETN (MI-PETN); , n=8-9, * = p<0,05. b Exemplarischer Western Blot.

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden die Effekte der Pharmakotherapie mit dem organischen Nitrat PETN bei chronischem experimentellem Herzinfarkt in Ratten untersucht. Es konnten neben einer Beeinflussung der Hämodynamik auch positive Effekte auf Fibrose und Angiogenese des vitalen Myokards festgestellt werden. Des Weiteren konnten im Myokard und im Gewebe der Aorta durch die PETN-Therapie Veränderungen der Redox-Homöostase und der an ihr beteiligten Enzyme beobachtet werden.

Abgesehen von der in dieser Arbeit gewählten Methode gibt es eine Vielzahl anderer Tiermodelle zur Erforschung der Herzinsuffizienz. Eine Herzinsuffizienz kann durch eine Koronararterienembolisation, durch eine tachykardie-induzierte Kardiomyopathie sowie durch Druck- und Volumenüberladung ausgelöst werden [111]. Da die systolische Herzinsuffizienz in etwa zwei Drittel ätiologisch auf die KHK zurückzuführen ist, spricht vieles für den Einsatz eines Modells mit Simulation einer KHK zur Erforschung der Herzinsuffizienz [1]. Im Modell der Koronararterienligatur führen die morphologischen Veränderungen des vitalen Myokards zu Dilatation und kompensatorischer Hypertrophie, welche wiederum eine Verminderung der linksventrikulären Funktion zur Folge haben [111].

Natürlich muss beachtet werden, dass die Koronararterienligatur in der Ratte die Pathogenese einer koronaren Herzerkrankung beziehungsweise einer Myokardischämie im Menschen nicht getreu widerspiegelt. Des Weiteren unterscheidet sich das kardiovaskuläre System der Ratte in der Elektrophysiologie ihres Myokards, der Koronardurchblutung und der kardialen Proteinexpression vom Menschen [111]. Dennoch konnten Fishbein et al. bereits 1978 eine ausreichende Vergleichbarkeit der histologischen Befunde belegen, wenn auch die Veränderungen des Myokards in der Ratte schneller vonstatten gehen [104, 112]. Im Umkehrschluss ist zu vermuten, dass somit die Dauer der Therapie im Tiermodell einem längeren Therapiezeitraum beim Menschen entspricht.

Ein führendes Argument gegen den Einsatz der Koronarligatur in der Erforschung der Herzinsuffizienz ist die hohe Letalität in den ersten

postoperativen Stunden. Vorbeschrieben sind Letalitätsraten von 35 bis 50% [111]. Durch eine schonende Operationsweise sowie eine engmaschige Überwachung in den ersten postoperativen Stunden und bedarfsgerechter Herzdruckreanimation wurde eine derartig hohe Letalität in der vorliegenden Arbeit vermieden.

Neben den morphologischen Veränderungen im Myokard wurden in dieser Arbeit auch die Auswirkungen der Herzinsuffizienz beziehungsweise der Therapie mit PETN auf das Gewebe der Aorta untersucht. Bekannt ist, dass die Koronararterienligatur Veränderungen in den Gefäßen, wie ein vermindertes Ansprechen auf vasodilatierende Faktoren, verursacht [113, 114].

Zusammenfassend scheint das Modell der Koronararterienligatur in der Ratte durchaus geeignet für die Erforschung der ischämisch bedingten chronischen Herzinsuffizienz und ihrer Therapiemöglichkeiten.

Erwartungsgemäß gab es hinsichtlich der Infarktgröße keine signifikanten Unterschiede innerhalb der Gruppe der Tiere mit experimentellem Myokardinfarkt. Der Therapiebeginn sieben Tage nach der Myokardinfarktoperation war ausreichend spät gewählt, um einen möglichen Einfluss des PETNs auf die erste Phase des Remodelings nach Myokardinfarkt, die vorzugsweise das Infarktareal involviert, zu verhindern. Anhand der gewonnenen Resultate lassen sich demnach die Wirkungen des PETNs auf die zweite, sich über Wochen bis Monate erstreckende und das gesamte linksventrikuläre Myokard betreffende Phase des Remodelings erfassen [22, 25].

Pfeffer et al. belegten, dass Infarkte, die weniger als 30% des linksventrikulären Myokards umfassen, in der Ratte zu keinerlei Beeinträchtigung der linksventrikulären Funktion führen, während größere Infarkte innerhalb von drei Wochen die Entwicklung einer Herzinsuffizienz nach sich ziehen [104]. Vor diesem Hintergrund wurden die weiteren Untersuchungen ausschließlich auf Tiere mit einer Infarktausdehnung von mindestens 40% bis maximal 60% des linksventrikulären Myokards beschränkt und damit gewährleistet, dass das Ziel, die Induktion einer Herzinsuffizienz, sicher erreicht wurde.

Das Verhältnis der Masse des linken Ventrikels zum Körpergewicht zeigte keine signifikanten Abweichungen zwischen den Gruppen. Jedoch konnten signifikant hypertrophierte Myozyten in der Gruppe der Placebo-behandelten, infarzierten Tiere im Vergleich zur Gruppe der scheinoperierten Tiere nachgewiesen werden. Da die Organentnahme nach der initialen postischämischen Inflammation durchgeführt wurde, stehen die Ergebnisse im Einklang mit älteren Veröffentlichungen. Pfeffer et al. beschrieben eine initiale Zunahme des linksventrikulären Gewichts nach Myokardinfarkt durch Inflammation und Ödem und nach Abklingen der Inflammation eine Normalisierung der linksventrikulären Masse bei kompensatorischer Hypertrophie der verbliebenen Myozyten [115].

Der Verlust kontraktiven Myokards führt zur Dilatation durch Ausdünnung der Ventrikelwand [110]. Diese Vergrößerung des linksventrikulären Innenradius führt, dem Laplace-Gesetz zur Folge, zu einer Steigerung der Wandspannung. Das Gesetz beschreibt jedoch auch den Ausgleich des erhöhten Wandstress infolge einer Vergrößerung des transmuralen Drucks und/oder Innendurchmessers, durch eine Zunahme der Wandstärke [26]. Eine solche Zunahme der Wandstärke als Folge einer ventrikulären Volumensteigerung spiegelt sich in der Myozytenhypertrophie im Myokard der herzinsuffizienten Tiere unter Placebogabe wieder. Unter der Therapie mit PETN konnte die Herzinsuffizienz weder eine signifikante Vergrößerung des linksventrikulären Volumens noch eine signifikante Hypertrophie der Myozyten hervorrufen. Die PETN-Gabe scheint somit einer Dilatation im Rahmen des myozytären Herzinsuffizienz-Remodelings entgegenzuwirken.

Als Konsequenz der eingeschränkten Pumpfunktion des Herzens kommt es im Zuge der neurohumoralen Aktivierung zu einer vermehrten Sekretion von Renin und dadurch zu einer Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS). Der in der Folge erhöhte Aldosteronspiegel führt in der Niere zu einer Salz- und Flüssigkeitsretention und so zu einer Vergrößerung des intravasalen Volumens. Damit erhöht sich vor allem der Druck im Niederdrucksystem, woraus sich eine Vorlaststeigerung ergibt [26]. Diese erhöhte Vorlast konnte bei herzinsuffizienten Tieren nach Myokardinfarkt an Hand erhöhter rechtsatrialer Drücke beobachtet werden. Unter der Therapie mit PETN

kam es in der Folge des Myokardinfarktes zu keiner Steigerung des Druckes im rechten Vorhof. Dies steht im Einklang mit der vorbeschriebenen vasodilatierenden Wirkung von PETN auf große venöse Gefäße [39, 40, 85].

Die Herzinsuffizienz wirkt sich auch auf den aortalen Mitteldruck und damit auf die Nachlast aus [1, 12]. Der MAP war in den herzinsuffizienten Tieren vermindert, wobei die PETN-Therapie im Vergleich mit der Placebogabe eine weitere, signifikante Senkung verursachte. Der Druck in der Aorta ist ein Produkt aus dem Schlagvolumen des linken Ventrikels und dem totalen peripheren Widerstand [26]. Im Fall der placebo-behandelten Gruppe, deren Tiere eine eingeschränkte Pumpfunktion aufwiesen, mag die Ejektionsfraktionseinschränkung ursächlich für die niedrigeren MAPs sein. Die Tiere der PETN-behandelten Gruppe wiesen jedoch lediglich einen minimalen, nicht signifikanten Ejektionsfraktionsverlust auf. Somit mag die MAP-Suppression Folge der dilatorischen Wirkung von PETN auf große arterielle Gefäße sein, könnte jedoch auch ein Zeichen hoher Nitrat-Wirkstoffspiegel sein, bei denen auch Widerstandsgefäße dilatiert werden [39, 40, 85].

Neben der Zunahme des linksventrikulären enddiastolischen Füllungsdrucks in infarzierten Tieren konnte auch die Entwicklung eines Lungenödems erfasst werden. Eine verminderte Compliance des Ventrikels durch Hypertrophie oder Fibrose sowie ein erniedrigtes systolisches Schlagvolumen bedingen eine Erhöhung des enddiastolischen Füllungsdrucks, wodurch es zum Rückstau in die Lunge mit der Folge erhöhter Kapillardrücke kommt [11, 116]. Diese Erhöhung des hydrostatischen Drucks führt im Interstitium des Lungengewebes zur Ansammlung seröser Flüssigkeit und bedingt das Symptom der Dyspnoe [11]. Da das Lungenödem ein typisches Symptom der Herzinsuffizienz ist, fügt sich die vermehrte Flüssigkeitsablagerung in den Lungen der infarzierten Tiere in das Bild einer erfolgreich induzierten Herzinsuffizienz ein. Obwohl PETN die Pumpfunktion erhalten konnte, hatte es keine Wirkung auf den enddiastolischen Druck und beeinflusste auch nicht das Ausmaß des Lungenödems. Allerdings wurde dieses nur mittels einer Methode bestimmt.

Ätiologisch lässt sich die verminderte linksventrikuläre Compliance unter anderem auf eine erhöhte Fibrosierung durch interstitielle Kollagenablagerungen

im Myokard herzinsuffizienter Tiere unter Placebogabe zurückführen. In den Tagen und Wochen nach einem Myokardinfarkt entwickelt sich im verbliebenen Myokard eine Fibrose, welche zu einer weiteren Verschlechterung der linksventrikulären Funktion führt [35, 117]. Unter der Therapie mit PETN konnte eine signifikant erniedrigte Kollagenablagerung im Interstitium des vitalen Myokardiums beobachtet werden. Fraccarollo et al. konnten zeigen, dass eine Induktion der eNOS zu signifikant verminderter Kollagendisposition im verbliebenen vitalen Myokard sowie zu einem erniedrigten enddiastolischen linksventrikulären Druck führt [45]. Im Einklang mit dieser Beobachtung besteht Evidenz dafür, dass die verringerte Kollagenablagerung auf erhöhten NO- beziehungsweise cGMP-Spiegeln basiert. So wird vermutet, dass der Einfluss von NO auf das Remodeling über eine Modulierung der Funktionalität verschiedener an der elektro-mechanischen Kopplung beteiligter Proteine durch die PKG1 und damit verbundenen Änderungen des Ca^{2+} -Haushalts und der Kontraktilität vermittelt wird. [44]. Ein Zusammenhang der verminderten Fibrose mit unter PETN-Therapie erhöhten NO-Spiegeln liegt somit nahe. Fraglich bleibt, weshalb die verminderte Fibrose sich nicht in einer erhaltenen Compliance mit niedrigem enddiastolischem Füllungsdruck widerspiegelt.

Als Zeichen einer linksventrikulären systolischen Dysfunktion lässt sich eine verminderte linksventrikuläre Kontraktilität (dp/dt max) sowie eine reduzierte Ejektionsfraktion herzinsuffizienter Tiere nachweisen. Diese Einschränkungen der Herzfunktion als Folge des Myokardinfarkts sind vorbeschrieben [45]. Im gesunden Herzen führt eine Erhöhung der Vorlast, also eine Vergrößerung des enddiastolischen Volumens in physiologischen Grenzen, zu einem vergrößerten Schlagvolumen. Dies hängt mit der als Frank-Starling-Mechanismus bezeichneten Kraft-Spannungs-Beziehung zusammen. Die erhöhte Vorspannung führt zu einer höheren Kalziumempfindlichkeit der kontraktilen Elemente des Myozyten, welche eine gesteigerte Kontraktilität im Verlauf der isovolumetrischen Anspannungsphase mit sich bringt [118]. Im Falle des Verlusts kontraktilen Gewebes und eines folglich erniedrigten Schlagvolumens kommt es zu einem gesteigerten enddiastolischen Volumen. Dieses kann jedoch aufgrund der eingeschränkten Pumpfunktion nicht adäquat ausgeworfen werden, was zu einem

vergrößerten endsystolischen Volumen und einer verminderten Ejektionsfraktion führt [118]. Eine erniedrigte Kontraktilität und eine verminderte Ejektionsfraktion konnten bei herzinsuffizienten Tieren unter Placebogabe beobachtet werden. Auch spiegelt sich die eingeschränkte myokardiale Funktion der infarzierten Tiere im erniedrigten linksventrikulären systolischen Druck wider. Die Therapie mit PETN vermochte zwar kaum den LVSP, jedoch die Kontraktilität eingeschränkt und die Ejektionsfraktion nahezu vollständig zu erhalten. Ursachen hierfür könnten eine verminderte Nachlast oder eine erhaltene myozytäre Funktion mit in Grenzen erhaltenem Frank-Starling-Mechanismus sein.

Der Begriff Angiogenese beschreibt den Prozess der „Neovaskularisation aus bereits bestehenden Blutgefäßen“ [12]. Zellproliferation, Migration und Kapillarbildung gehören zu den notwendigen Mechanismen der Angiogenese [119]. Eine vermehrte Angiogenese wird über eine bessere Versorgung des Gewebes mit einer verbesserten myokardialen Funktion in Verbindung gebracht. Da die O₂-Extraktion des Myokards in Ruhe bereits bei 60% liegt, wird die Kapazität der myokardialen Sauerstoffversorgung überwiegend durch die Kapillardichte bestimmt [120-122]. Mittels immunhistochemischer Färbung konnte gezeigt werden, dass die Angiogenese im vitalen Myokard herzinsuffizienter Tiere unter Placebogabe signifikant vermindert war. Ein solches Anpassungsdefizit des Kapillarnetzes an die Hypertrophie der Myozyten ist vorbeschrieben und scheint auf einer gleichbleibenden Kapillaranzahl bei steigendem myozytärem Zellvolumen zu basieren [121, 123, 124]. Die Funktion hypertrophierter Myozyten ist jedoch von einer ausreichend gesteigerten Angiogenese abhängig. Das Ausmaß der Neovaskularisation unterscheidet die physiologische, durch Training induzierte von der pathologischen Hypertrophie. Letztere, durch Herzinfarkt, Klappenerkrankungen oder arterielle Hypertonie hervorgerufene Hypertrophie geht mit einer beeinträchtigten koronaren Angiogenese einher [125]. Die ungenügende Neovaskularisation im Verlauf der Herzinsuffizienz konnte durch die Therapie mit PETN nahezu vollständig unterbunden werden. Möglicherweise trägt dies zu der erhaltenen Kontraktilität und Ejektionsfraktion bei.

Unabhängig von den Auswirkungen stellt sich die Frage, durch welchen Mechanismus die Therapie mit PETN die Kapillardichte erhält. Der Prozess der Angiogenese hängt von einer Aktivierung des Endothels von ruhenden, differenzierten Zellen zu proliferierenden, migrierenden Zellen ab [126, 127]. Ein Mediator der Prozesse von Proliferation und Migration ist NO, welches in Abhängigkeit seines Spiegels angiogen wirkt. [49, 128, 129]. Mehrere die Angiogenese induzierende Zytokine benutzen NO als second messenger. Hierzu zählen der Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), Angiotensin II und Prostaglandin E₂ [49, 130-132]. Auf molekularer Ebene scheint NO die Zellprozesse wie auch die Angiogenese zum Teil durch S-Nitrosylierung verschiedener Proteine zu steuern, zum anderen konnte die Abhängigkeit der Angiogenese vom NO/cGMP-Signalweg aufgezeigt werden [133, 134]. cGMP aktiviert Kinase-Kaskaden, die neben PKG-1 auch Mitogen Activated Protein Kinasen (MAPK) wie ERK, Raf1 und Ras beinhalten, und zeigt so eine Mitose-fördernde Wirkung [135].

Es lässt sich deshalb vermuten, dass die erhaltene Kapillardichte ein Effekt erhöhter myokardialer NO-Spiegel in Folge der PETN-Therapie ist. Jedoch ist es ebenfalls möglich, dass auch andere an der Angiogenese beteiligte Signalwege durch die Therapie mit PETN beeinflusst werden. So konnten Conner et al. aufzeigen, dass es in der Folge einer Überexpression der MnSOD zur Steigerung der Expression des VEGF und somit zur vermehrten Angiogenese kommt. Die Signalkette scheint dabei eine vermehrte Oxidation des Phosphatase-and-Tensin-Homologon (PTEN) durch erhöhte H₂O₂-Spiegel zu involvieren [119, 136]. Die Untersuchungen der Expressionsmuster auf Ebene der Proteine wies in dieser Arbeit eine erhöhte Konzentration der MnSOD in den Tieren unter der Therapie mit PETN auf. Dies lässt auf eine erhöhte Produktion von H₂O₂ durch die SOD schließen und damit auf die oben beschriebene Hypothese.

Die Messung der Superoxidanionen wurde mittels DHE beziehungsweise Mitosox-DHE sowohl im Gewebe der Aorta als auch mittels Mitosox-DHE im linksventrikulären Myokard durchgeführt. Somit konnten einerseits Effekte der

PETN-Therapie auf das Gefäßsystem, andererseits auf das Myokard nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse ergaben signifikant erhöhte ROS-Spiegel sowohl im Gewebe der Aorta als auch im linksventrikulären Myokard der herzinsuffizienten Tiere, sofern keine Therapie mit PETN erfolgt war. Eine derartige oxidative Dysbalance ist kennzeichnend für eine Vielzahl kardiovaskulärer Erkrankungen und auch Folge eines Myokardinfarkts [35, 67, 137].

Die erhöhten ROS-Spiegel in der Aorta weisen darauf hin, dass es im Rahmen der Folgeprozesse nach Myokardinfarkt mit Ausbildung der Herzinsuffizienz zu einer nicht auf das Myokard begrenzten systemischen Reaktion kommt. Dementsprechende Beobachtungen sind vorbeschrieben, wobei gezeigt werden konnte, dass vor allem die glatten Muskelzellen der Gefäßwand auf erhöhte Angiotensin-II-Spiegel mit einer Induktion der Expression der NAD(P)H-Oxidase reagieren [78, 138].

Um den Ort der Produktion der Superoxidanionen genauer einzugrenzen, wurde die Messung sowohl mit DHE, einem Indikator für Superoxidanionen in der ganzen Zelle, als auch mit Mitosox-DHE, das sich spezifisch in die Membranen der Mitochondrien einlagert, durchgeführt. Durch das negative Membranpotential, das durch die Reaktionen der Atmungskette entsteht, lagert sich der positiv geladene Mitosox-Komplex überwiegend in die mitochondrialen Membranen ein, sodass dort 100- bis 1000-fach höhere Konzentrationen erreicht werden [106]. Es ist möglich, dass die örtliche Spezifität des Mitosox sowohl durch Oxidation auf dem Weg zu den Mitochondrien im Zytosol als auch durch Diffusion der mitochondrial generierten Superoxidanionen ins Zytosol negativ beeinflusst wird. Jedoch lässt sich die auf diesem Weg oxidierte Mitosox-Menge im Vergleich zu der Oxidation im Mitochondrium auf Grund der starken Anreicherung laut Mukhopadhyay et al. vernachlässigen [139]. Demnach ist eine ausreichende örtliche Spezifität des Mitosox anzunehmen.

Vergleicht man nun den Anstieg der mitochondrialen ROS-Spiegel nach Myokardinfarkt mit dem Anstieg der ROS-Spiegel in der gesamten Zelle, so fällt auf, dass sich diese stark ähneln. Prinzipiell ist folglich zumindest im Gewebe der Aorta

eine überwiegend im Mitochondrium generierte Dysbalance des Redox-Stoffwechsels anzunehmen.

Unabhängig von der Örtlichkeit der Superoxidproduktion innerhalb der Zelle fällt auf, dass die Therapie mit PETN einen signifikanten Anstieg der Superoxidanionenkonzentration bei Herzinsuffizienz nach Myokardinfarkt unterbindet. Beobachtungen über antioxidative Effekte des PETN sind, meist im Vergleich mit einer Nitroglycerintherapie, vorbeschrieben. So erklärten Wenzel et al. die ausbleibende Toleranzentwicklung bei der Therapie mit PETN durch fehlende Induktion der Sauerstoffmetabolitenproduktion beziehungsweise durch Induktion antioxidativer Mechanismen [102]. Ein dementsprechender antioxidativer Effekt des PETN kann mit den vorliegenden Daten auch für eine Gabe bei Herzinsuffizienz nach Myokardinfarkt belegt werden.

Welchen Einfluss genau die Therapie mit PETN auf welche antioxidativen Mechanismen hat, ist aktuell unzureichend geklärt. Daiber et al. konnten eine Induktion der Expression von HO-1 durch PETN beobachten [65, 140]. Die Steigerung der HO-1-Expression scheint ein Schutzmechanismus der Zelle gegen oxidativen Stress zu sein [141, 142]. So führen beispielsweise erhöhte Angiotensin-II-Spiegel zu einer Induktion der HO-1. Während organische Nitrate wie ISMN eine Angiotensin-II-verursachte HO-1-Zunahme verhindern, kommt es im Rahmen einer PETN-Therapie zu einer darüber hinausgehenden Steigerung der HO-1-Expression, die über den Transkriptionsfaktor Nfr2 vermittelt zu werden scheint [143-145]. Zu den Produkten der HO-1 gehören Ferritin, Bilirubin und Kohlenmonoxid [145]. Die beiden letzteren sind Induktoren der GTP-Cyclohydrolase (GCH-1), die an der Synthese des Kofaktors der eNOS, BH₄, beteiligt ist. Üblicherweise kommt es bei Herzinsuffizienz im Rahmen der neurohumoralen Aktivierung über das RAAS durch Angiotensin-II zu einer Verminderung der Expression der GCH-1 und der Dihydrofolatreduktase (DHFR). Letztere ist auch ein Enzym der BH₄-Synthese [143]. Es gibt Hinweise, dass es im Zuge verminderter BH₄-Spiegel, als Folge der Oxidation zu Trihydrobiopterin (BH₃) durch Peroxynitrit oder der verringerten Synthese, leichter zu einer Entkopplung der eNOS mit

Superoxidanionenproduktion kommt [143, 145-147]. Darüber hinaus besitzen Bilirubin und Ferritin selbst antioxidative Eigenschaften [103, 143, 148-150].

Analog zu den oben beschriebenen Beobachtungen, welche überwiegend im Myokard diabetischer beziehungsweise hypertensiver herzinsuffizienter Ratten gemacht wurden, zeigte sich auch in dieser Arbeit in der Aorta von ischämisch bedingt herzinsuffizienten Tieren eine erhöhte Expression von HO-1 unter PETN-Therapie. Diese übertraf diejenige in scheinoperierten Tieren, während die Expression in Placebo-behandelten herzinsuffizienten Tieren supprimiert wurde. Bezüglich der antioxidativen Wirkungen durch die HO-1-Induktion kann von ähnlichen Vorgängen wie in den oben beschriebenen Modellen ausgegangen werden.

Neben der HO-1 wurden auch weitere antioxidativ wirkende Enzyme untersucht. Die drei unterschiedlichen Superoxiddismutasen wirken durch Umwandlung von O_2^- zu H_2O_2 , das wiederum durch die Katalase in H_2O und O_2 gespalten wird, antioxidativ [119]. Es zeigte sich, dass es im Rahmen der Herzinsuffizienz zu einer Supprimierung der MnSOD kam und die Therapie mit PETN dies verhindern konnte. Miller et al. konnten die zentrale Rolle der MnSOD im Zusammenhang mit der endothelialen Dysfunktion bei Herzinsuffizienz beschreiben: In MnSOD-defizienten Mäusen kam es zu einer verminderten Expression zahlreicher antioxidativ wirkender Enzyme [151]. Daraus lässt sich schließen, dass es im Rahmen verminderter MnSOD-Spiegel zu einem Überwiegen der oxidativ wirkenden Enzyme kommt, was durch die Therapie mit PETN via Induktion der MnSOD verhindert werden kann. Darüber hinaus konnte, wie bereits erwähnt, ein Zusammenhang zwischen erhöhtem MnSOD-Spiegel und einer Induktion der Angiogenese gefunden werden [119, 136]. Wie diese Steigerung der MnSOD-Expression vermittelt wird, bleibt unklar. Ein weiterer interessanter Aspekt ergibt sich beim Blick auf die zelluläre Lokalisation der MnSOD. Diese ist in der mitochondrialen Matrix zu finden und somit an dem Ort, wo die vorliegenden Daten die stärkste ROS-Generierung vermuten lassen [119].

Ein Enzym, das einerseits über die Synthese von NO an zahlreichen vasoprotektiven und anti-atherosklerotischen Mechanismen beteiligt ist, andererseits jedoch über eine Entkopplung auch häufig als Mitverursacher einer

oxidativen Dysbalance genannt wird, ist die eNOS [42]. Wie bereits beschrieben, kann es im Rahmen einer oxidativen Dysbalance durch Oxidation des Kofaktors BH₄ durch ONOO⁻ erleichtert zur Entkopplung der eNOS kommen [147]. Die eNOS ist nur als Dimer in der Lage, ihre physiologische Funktion, die Oxidation von L-Arginin zu L-Citrullin und NO, zu gewährleisten. Statt der Synthese von NO kommt es bei fehlender Dimerbildung zur Produktion von O₂⁻ durch die Monomere der eNOS [152].

Nun hat die Therapie mit PETN eine Induktion der eNOS zur Folge, was unter Umständen auch nachteilige Effekte, wie eine größere Zahl an eNOS-Monomeren durch Entkopplung, nach sich ziehen könnte. Vor dem Hintergrund der verminderten Superoxidationenspiegel unter PETN ist eher nicht von einer Entkopplung der eNOS, sondern vielmehr von der physiologischen Funktion auszugehen. Schuhmacher et al. konnten eine Prävention der eNOS-Entkopplung beziehungsweise eine Rekopplung durch Regulierung der Expression der GCH-1, der DHFR, der extrazellulären SOD sowie durch S-Glutathionylierung der eNOS durch die Therapie mit PETN aufzeigen [143, 145].

Zusammenfassend lässt sich also eine Expressionsinduktion der PETN-Therapie auf mindestens drei an der antioxidativen Abwehr beziehungsweise an der Gefäßprotektion beteiligten Enzyme erkennen. Interessanterweise scheinen eine Vielzahl der PETN-Wirkungen von der HO-1 abhängig. So konnten die Nitrattoleranz, die endotheliale Dysfunktion wie auch der kardiale oxidative Stress durch PETN in partial-HO-1-defizienten Mäusen nicht verhindert werden [143].

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit geben einen Einblick in die Wirkungen einer Therapie mit dem organischen Nitrat PETN bei Myokardinfarkt-induzierter Herzinsuffizienz.

Es konnte gezeigt werden, dass die PETN-Therapie nicht nur symptomlindernde Effekte wie eine Senkung der Vorlast mit vermutlich verminderten peripheren Ödemen oder einer verbesserten Ejektionsfraktion mit vermutlich verbesserter Belastbarkeit, sondern auch strukturelle Auswirkungen wie eine erhaltene Angiogenese, eine verminderte myozytäre Hypertrophie oder eine verminderte Fibrose hat. Ursächlich für diese über die hämodynamischen

Wirkungen hinausgehenden Effekte mag das verminderte Auftreten oxidativen Stresses sein.

In dieser Arbeit wurde PETN als Monotherapie appliziert, sodass sich zwangsläufig die Frage nach einem additiven Nutzen zusätzlich zu der aktuell etablierten Herzinsuffizienztherapie mit ACE-Hemmern, β -Blockern, Diuretika, Aldosteronantagonisten, Herzglykosiden und Ivabradin stellt [1]. Mullens et al. zeigten in ihrer non-randomized, single-center, case-control Study mit Patienten mit fortgeschrittener dekompensierter Herzinsuffizienz einen positiven Effekt hinsichtlich Re-Hospitalisierung und Mortalität durch eine ISDN-Hydralazin-Gabe zusätzlich zur etablierten Herzinsuffizienztherapie mit ACE-Hemmern oder Angiotensin-I-Rezeptor-Blockern, β -Blockern und Aldosteron-Antagonisten [153]. Hydralazin, dem neben den vasodilatorischen Effekten auch antioxidative Effekte nachgesagt werden, wird mit einer Verhinderung der Nitrattoleranz-Entwicklung sowie mit weiteren positiven Effekten bezüglich Belastbarkeit, linksventrikulärer Dilatation, systolischer Funktion, Ischämie und Remodeling in Verbindung gebracht [154, 155]. Gori et Münzel schildern in ihrem Single-Case-Report beim Einsatz einer Kombination von PETN und Hydralazin ähnliche Effekte wie Mullens et al., dabei postulieren sie, dass die Wirkungen mutmaßlich durch die Kombination der antioxidativen Effekte beider Substanzen zustande kommen [156]. Möglicherweise könnte aufgrund der intrinsischen antioxidativen Eigenschaften von PETN auf eine zusätzliche Gabe von Hydralazin verzichtet werden.

Eine weitere Frage, ob sich die Wirkungen der Therapie auf andere Ätiologien der Herzinsuffizienz übertragen lassen, bleibt in dieser Arbeit unbeantwortet. Da eine Vielzahl der Erkenntnisse über die Wirkungen von PETN in anderen Modellen gewonnen wurden, lassen sich entsprechende positive Effekte auch auf Herzinsuffizienzen anderer Ätiologie annehmen.

Wenn auch mit dieser Arbeit einige Erkenntnisse zur Therapie der ischämisch verursachten Herzinsuffizienz mit PETN geklärt werden konnten, so wurden dennoch mindestens ebenso viele neue Fragen aufgeworfen. Weitere Untersuchungen sollten sich mit der Aufklärung von Zusammenhängen wie der

Induktion von HO-1, MnSOD und eNOS durch PETN beschäftigen. Auch zeigten die hämodynamischen Untersuchungen zum einen erwartete Befunde wie eine erniedrigte Vor- und Nachlast, die im direkten Zusammenhang mit der vasodilatierenden Wirkung von organischen Nitraten stehen. Zum anderen scheinen Ergebnisse wie eine verminderte linksventrikuläre Compliance trotz verminderter Fibrose unter der PETN-Therapie widersprüchlich. Des Weiteren sollten Analysen zur Verifizierung der örtlichen Spezifität der Detektion von Superoxidanionen durch MitoSox, beispielsweise durch Analysen der Superoxidanionen nach Mitochondrienextraktion, erfolgen, um Gewissheit über den Ursprung der Superoxidanionen geben zu können. Ferner suggerieren die hier erhobenen Daten, dass zumindest in der Aorta der Großteil der Sauerstoffmetabolite im Mitochondrium generiert wurde. Diese Annahme kann zum Teil auf das linksventrikuläre Myokard übertragen werden, sollte jedoch durch Messung der ROS im Myokard weiter geprüft werden. Darüber hinaus wäre es interessant, die Entwicklung der oxidativen Dysbalance unter Inhibitoren der mitochondrialen beziehungsweise zytosolischen ROS-generierenden Enzyme zu untersuchen.

Nicht zuletzt muss beachtet werden, dass es sich bei der vorliegenden Arbeit um ein Tiermodell der Herzinsuffizienz handelt. Wie bereits geschildert, lässt sich eine Vielzahl der gewonnenen Erkenntnisse auf die menschliche Physiologie übertragen. Einschränkungen, besonders bezüglich möglicher unerwünschter Arzneimittelwirkungen durch die Therapie mit PETN, vor allem auch in Kombination zur etablierten Herzinsuffizienztherapie, bleiben jedoch bestehen und lassen sich nur mittels klinischer Studien analysieren. Ausreichende Sicherheit für den Einsatz der Substanz PETN sollte vor dem Hintergrund des jahrelangen Einsatzes vor allem in der ehemaligen DDR gegeben sein, wenn auch aktuell keine Zulassung des Präparats in Deutschland vorliegt [87, 157].

So lässt sich zusammenfassen, dass PETN mit seinen hämodynamischen und antioxidativen Wirkungen als zusätzliche Option in der Therapie der Herzinsuffizienz gesehen werden könnte. Um genauere Aussagen zur

Wirkungsweise sowie den Vorteilen der Therapie treffen zu können, sind weitere präklinische und klinische Untersuchungen nötig.

5. Zusammenfassung

Obwohl die Herzinsuffizienz eine sehr häufige Erkrankung darstellt, ist deren Entwicklung nicht vollständig verstanden und die Notwendigkeit für weitere Therapieoptionen gegeben. Die Forschungen der letzten Jahre haben dem Redox-Stoffwechsel eine führende Rolle zugeschrieben. Ziel dieser Arbeit war es, das kardiale Remodeling bei Herzinsuffizienz sowie die Möglichkeit der therapeutischen Beeinflussung mit dem organischen Nitrat Pentaerythrityltetranitrat zu untersuchen. Hierfür wurde bei Ratten ein Infarkt induziert und ab dem achten Tag nach der Infarzierung ein Placebo beziehungsweise das Verum Pentaerythrityltetranitrat verabreicht. Nach neun Wochen wurden hämodynamische Messungen durchgeführt, in einem Aortensegment die Superoxidanionenspiegel erfasst, Immunhistologische Studien des Myokards angefertigt und Aortengewebe mittels Gelelektrophorese und Western Blotting molekulargenetisch untersucht. Bei letzterem lag ein Schwerpunkt auf am Redox-Stoffwechsel beteiligten Enzymen. Bei den Ergebnissen der hämodynamischen Messungen wiesen die scheinoperierten Tiere in nahezu allen Parametern signifikant bessere Werte als die infarzierten Tiere auf. Jedoch zeigte sich, dass unter Verum Kontraktilität, Ejektionsfraktion sowie das LVESV der infarzierten Tiere signifikant besser waren als unter Placebo. Die Kollagenablagerung war durch die Pentaerythrityltetranitrattherapie vermindert, die Angiogenese erhöht. Die Superoxidanionenspiegel im Herzen und der Aorta lagen bei Verumgabe nahezu auf dem Niveau der scheinoperierten Tiere. Die Expression der antioxidativ wirkenden Enzyme HO-1, MnSOD und eNOS war durch Pentaerythrityltetranitrat signifikant gesteigert. Die erhobenen Daten lassen somit einen ergänzenden therapeutischen Effekt von Pentaerythrityltetranitrat in der Herzinsuffizienztherapie vermuten.

6. Abkürzungen

ALDH-2	Aldehyd-Dehydrogenase 2
a.u.	Arbitrary units – willkürliche Einheiten
BH3	Trihydrobiopterin
BH4	Tetrahydrobiopterin
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
Cl	Chlorid
CuZnSOD	Kupfer-Zink-Superoxiddismutase
DHE	Dihydroethidium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EF	Ejektionsfraktion
eNOS	endotheliale Stickstoff-Monoxid-Synthase
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FM	Flavin-Mononukleotid
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GCH-1	GTP-Cyclohydrolase
GTN	Glycerintrinitrat
GTP	Guanosintriphosphat
HCl	Chlorwasserstoff
HEPES	Hydroxyethylpiperazinylethansulfonsäure
HO-1	Häm-Oxygenase 1
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
iNOS	induzierbare Stickstoff-Monoxid-Synthase
ISDN	Isosorbiddinitrat
ISNM	Isosorbidmononitrat
K	Kalium
KHK	Koronare Herzkrankheit
LVEDP	Linksventrikulärer enddiastolischer Druck
LVEDV	Linksventrikuläres enddiastolisches Volumen
LVESV	Linksventrikuläres endsystolisches Volumen
LVSP	Linksventrikulärer systolischer Druck
MAP	aortaler Mitteldruck
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
MI	Myocardinfarkt
min	Minuten
MMP	Matrix-Metallo-Protease
MnSOD	Magnesium-Superoxiddismutase
NAD	Nicotinamidadenindinucleotid

NAD(P)H	Nicotinamidadeninucleotid(phosphat)
nNOS	neuronale Stickstoff-Monoxid-Synthase
NO	Stickstoff-Monoxid
NOS	Stickstoff-Monoxidsynthase
NYHA	New York Heart Association
ONOO-	Peroxynitrit
PETN	Pentaerythrityltetranitrat
PETriN	Pentaerythrityltrinitrat
PKG-1	cGMP-abhängige Protein-Kinase G
Pla	Placebo
PTEN	Phosphatase und Tensin Homologon
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RAD	rechtsatrialer Druck
RIVA	Ramus interventricularis anterior
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
SDS	Natriumdodecylsulfat
sGC	Guanylatcyclase
sham	scheinoperiert
SOD	Superoxiddismutase
TRIS	Trishydroxymethylaminomethan
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
WHO	World Health Organisation

7. Literaturverzeichnis

1. McMurray, J.J., et al., *ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association (HFA) of the ESC.* Eur Heart J, 2012. **33**(14): p. 1787-847.
2. Zhao, H., et al., *Detection and characterization of the product of hydroethidine and intracellular superoxide by HPLC and limitations of fluorescence.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(16): p. 5727-32.
3. Invitrogen, L.T.C.-. *MitoSox™ Red Mitochondrial Superoxide Indicator, for live cell imaging.* 2012; Available from: <http://probes.invitrogen.com/media/structure/36858.jpg>.
4. Cell Signaling Technology, I., *Western Blotting.*
5. Fraccarollo, D., P. Galuppo, and J. Bauersachs, *Novel therapeutic approaches to post-infarction remodelling.* Cardiovasc Res, 2012. **94**(2): p. 293-303.
6. Dikalov, S., K.K. Griendling, and D.G. Harrison, *Measurement of reactive oxygen species in cardiovascular studies.* Hypertension, 2007. **49**(4): p. 717-27.
7. Pfeffer, M.A., *Left ventricular remodeling after acute myocardial infarction.* Annu Rev Med, 1995. **46**: p. 455-66.
8. Takimoto, E. and D.A. Kass, *Role of oxidative stress in cardiac hypertrophy and remodeling.* Hypertension, 2007. **49**(2): p. 241-8.
9. WHO. *Cardiovascular diseases (CVDs) - Fact sheet No. 317.* 2012; Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/>.
10. WHO. *The top 10 causes of death - Fact sheet No. 310.* 2011; Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>.
11. Fauci, A.S., M. Dietel, and Charité-Universitätsklinikum, *Harrisons Innere Medizin.* 2009: McGraw-Hill.
12. Arnold, U., W. Pschyrembel, and P.R. Verlages, *Pschyrembel Klinisches Wörterbuch 2013.* 2012: Walter De Gruyter Incorporated.
13. Zugck, C., et al., *[Health economic impact of heart failure: An analysis of the nationwide German database].* Dtsch Med Wochenschr, 2010. **135**(13): p. 633-8.
14. Goldberg, R.J., et al., *Long-term survival after heart failure: a contemporary population-based perspective.* Arch Intern Med, 2007. **167**(5): p. 490-6.
15. B. Nowak, G.H.S.D.A.J.B.M.B.U.H.B.P.W.v.S.R.W., *Pocket-Leitlinien: Herzinsuffizienz Update 2012.* 2012.
16. Herold, G.u.M., *Innere Medizin.* 2010, Köln: Gerd Herold.
17. Swedberg, K., et al., *Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic heart failure: executive summary (update 2005): The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Chronic Heart Failure of the European Society of Cardiology.* Eur Heart J, 2005. **26**(11): p. 1115-40.
18. Hunt, S.A., et al., *2009 Focused update incorporated into the ACC/AHA 2005 Guidelines for the Diagnosis and Management of Heart Failure in Adults A Report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines Developed in Collaboration With the International Society for Heart and Lung Transplantation.* J Am Coll Cardiol, 2009. **53**(15): p. e1-e90.
19. Shah, A.M. and D.L. Mann, *In search of new therapeutic targets and strategies for heart failure: recent advances in basic science.* Lancet, 2011. **378**(9792): p. 704-12.
20. Nieminen, M.S., et al., *EuroHeart Failure Survey II (EHFS II): a survey on hospitalized acute heart failure patients: description of population.* Eur Heart J, 2006. **27**(22): p. 2725-36.
21. Tsutsui, H., S. Kinugawa, and S. Matsushima, *Oxidative stress and heart failure.* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2011. **301**(6): p. H2181-90.

22. Gajarsa, J.J. and R.A. Kloner, *Left ventricular remodeling in the post-infarction heart: a review of cellular, molecular mechanisms, and therapeutic modalities*. Heart Fail Rev, 2011. **16**(1): p. 13-21.
23. Ezekowitz, J.A., et al., *Declining in-hospital mortality and increasing heart failure incidence in elderly patients with first myocardial infarction*. J Am Coll Cardiol, 2009. **53**(1): p. 13-20.
24. Rahimtoola, S.H., *From coronary artery disease to heart failure: role of the hibernating myocardium*. Am J Cardiol, 1995. **75**(13): p. 16E-22E.
25. Sutton, M.G. and N. Sharpe, *Left ventricular remodeling after myocardial infarction: pathophysiology and therapy*. Circulation, 2000. **101**(25): p. 2981-8.
26. Klinker, R. and R. Bauman, *Physiologie*. 2009: Thieme.
27. Whittaker, P., D.R. Boughner, and R.A. Kloner, *Role of collagen in acute myocardial infarct expansion*. Circulation, 1991. **84**(5): p. 2123-34.
28. Erlebacher, J.A., et al., *Early dilation of the infarcted segment in acute transmural myocardial infarction: role of infarct expansion in acute left ventricular enlargement*. J Am Coll Cardiol, 1984. **4**(2): p. 201-8.
29. McKay, R.G., et al., *Left ventricular remodeling after myocardial infarction: a corollary to infarct expansion*. Circulation, 1986. **74**(4): p. 693-702.
30. Mitchell, G.F., et al., *Left ventricular remodeling in the year after first anterior myocardial infarction: a quantitative analysis of contractile segment lengths and ventricular shape*. J Am Coll Cardiol, 1992. **19**(6): p. 1136-44.
31. Capasso, J.M., et al., *Heterogeneity of ventricular remodeling after acute myocardial infarction in rats*. Am J Physiol, 1992. **262**(2 Pt 2): p. H486-95.
32. Weber, K.T. and J.S. Janicki, *The heart as a muscle--pump system and the concept of heart failure*. Am Heart J, 1979. **98**(3): p. 371-84.
33. Anversa, P., et al., *Myocardial response to infarction in the rat. Morphometric measurement of infarct size and myocyte cellular hypertrophy*. Am J Pathol, 1985. **118**(3): p. 484-92.
34. Cleutjens, J.P., et al., *Collagen remodeling after myocardial infarction in the rat heart*. Am J Pathol, 1995. **147**(2): p. 325-38.
35. Sun, Y., *Myocardial repair/remodelling following infarction: roles of local factors*. Cardiovasc Res, 2009. **81**(3): p. 482-90.
36. Bauersachs, J. and J.D. Widder, *Endothelial dysfunction in heart failure*. Pharmacol Rep, 2008. **60**(1): p. 119-26.
37. Boulanger, C.M., *Secondary endothelial dysfunction: hypertension and heart failure*. J Mol Cell Cardiol, 1999. **31**(1): p. 39-49.
38. Brutsaert, D.L., *Cardiac endothelial-myocardial signaling: its role in cardiac growth, contractile performance, and rhythmicity*. Physiol Rev, 2003. **83**(1): p. 59-115.
39. Lüllmann, H., K. Mohr, and L. Hein, *Pharmakologie und Toxikologie: Arzneimittelwirkungen verstehen - Medikamente gezielt einsetzen*. 2010: Thieme Georg Verlag.
40. Mutschler, E., et al., *Mutschler Arzneimittelwirkungen: Pharmakologie - Klinische Pharmakologie - Toxikologie*. 2012: Wissenschaftliche.
41. Karow, T. and R. Lang-Roth, *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie: Vorlesungsorientierte Darstellung und klinischer Leitfaden für Studium und Praxis 2012;[in Farbe; Markierung der Prüfungsfakten des"Hammerexamens" bis 04/2011, Therapieempfehlungen deutscher und internationaler Fachgesellschaften, umfassende Dosierungen]*. 2012: Selbstverl. des Verf.
42. Forstermann, U. and W.C. Sessa, *Nitric oxide synthases: regulation and function*. Eur Heart J, 2012. **33**(7): p. 829-37, 837a-837d.
43. Khan, B.V., et al., *Nitric oxide regulates vascular cell adhesion molecule 1 gene expression and redox-sensitive transcriptional events in human vascular endothelial cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(17): p. 9114-9.
44. Manoury, B., V. Montiel, and J.L. Balligand, *Nitric oxide synthase in post-ischaemic remodelling: new pathways and mechanisms*. Cardiovasc Res, 2012. **94**(2): p. 304-15.
45. Fraccarollo, D., et al., *Improvement in left ventricular remodeling by the endothelial nitric oxide synthase enhancer AVE9488 after experimental myocardial infarction*. Circulation, 2008. **118**(8): p. 818-27.

46. Scherrer-Crosbie, M., et al., *Endothelial nitric oxide synthase limits left ventricular remodeling after myocardial infarction in mice*. *Circulation*, 2001. **104**(11): p. 1286-91.
47. Ritchie, R.H., et al., *Angiotensin II-induced hypertrophy of adult rat cardiomyocytes is blocked by nitric oxide*. *Am J Physiol*, 1998. **275**(4 Pt 2): p. H1370-4.
48. Kim, N.N., et al., *Regulation of cardiac fibroblast extracellular matrix production by bradykinin and nitric oxide*. *J Mol Cell Cardiol*, 1999. **31**(2): p. 457-66.
49. Murohara, T., et al., *Nitric oxide synthase modulates angiogenesis in response to tissue ischemia*. *J Clin Invest*, 1998. **101**(11): p. 2567-78.
50. Prabhu, S.D., *Nitric oxide protects against pathological ventricular remodeling: reconsideration of the role of NO in the failing heart*. *Circ Res*, 2004. **94**(9): p. 1155-7.
51. Cai, H. and D.G. Harrison, *Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress*. *Circ Res*, 2000. **87**(10): p. 840-4.
52. Beckman, J.S. and W.H. Koppenol, *Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly*. *Am J Physiol*, 1996. **271**(5 Pt 1): p. C1424-37.
53. Thomson, L., et al., *Kinetics of cytochrome c2+ oxidation by peroxynitrite: implications for superoxide measurements in nitric oxide-producing biological systems*. *Arch Biochem Biophys*, 1995. **319**(2): p. 491-7.
54. Huie, R.E. and S. Padmaja, *The reaction of no with superoxide*. *Free Radic Res Commun*, 1993. **18**(4): p. 195-9.
55. Forman, H.J., J.M. Fukuto, and M. Torres, *Redox signaling: thiol chemistry defines which reactive oxygen and nitrogen species can act as second messengers*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2004. **287**(2): p. C246-56.
56. Burgoyne, J.R., et al., *Redox signaling in cardiac physiology and pathology*. *Circ Res*, 2012. **111**(8): p. 1091-106.
57. Fatehi-Hassanabad, Z., C.B. Chan, and B.L. Furman, *Reactive oxygen species and endothelial function in diabetes*. *Eur J Pharmacol*, 2010. **636**(1-3): p. 8-17.
58. Sorescu, D. and K.K. Griendling, *Reactive oxygen species, mitochondria, and NAD(P)H oxidases in the development and progression of heart failure*. *Congest Heart Fail*, 2002. **8**(3): p. 132-40.
59. Shigenaga, M.K., T.M. Hagen, and B.N. Ames, *Oxidative damage and mitochondrial decay in aging*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. **91**(23): p. 10771-8.
60. Fridovich, I., *Mitochondria: are they the seat of senescence?* *Aging Cell*, 2004. **3**(1): p. 13-6.
61. Vaziri, N.D., et al., *Superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase and NADPH oxidase in lead-induced hypertension*. *Kidney Int*, 2003. **63**(1): p. 186-94.
62. Young, I.S. and J.V. Woodside, *Antioxidants in health and disease*. *J Clin Pathol*, 2001. **54**(3): p. 176-86.
63. Sawyer, D.B., *Oxidative stress in heart failure: what are we missing?* *Am J Med Sci*, 2011. **342**(2): p. 120-4.
64. Clark, J.E., et al., *Dynamics of haem oxygenase-1 expression and bilirubin production in cellular protection against oxidative stress*. *Biochem J*, 2000. **348 Pt 3**: p. 615-9.
65. Daiber, A. and T. Munzel, *Characterization of the antioxidant properties of pentaerythryl tetranitrate (PETN)-induction of the intrinsic antioxidative system heme oxygenase-1 (HO-1)*. *Methods Mol Biol*, 2010. **594**: p. 311-26.
66. Assem, M., et al., *Pattern of superoxide dismutase enzymatic activity and RNA changes in rat heart ventricles after myocardial infarction*. *Am J Pathol*, 1997. **151**(2): p. 549-55.
67. Grieve, D.J., et al., *Role of oxidative stress in cardiac remodelling after myocardial infarction*. *Heart Lung Circ*, 2004. **13**(2): p. 132-8.
68. Hill, M.F. and P.K. Singal, *Antioxidant and oxidative stress changes during heart failure subsequent to myocardial infarction in rats*. *Am J Pathol*, 1996. **148**(1): p. 291-300.
69. Hill, M.F. and P.K. Singal, *Right and left myocardial antioxidant responses during heart failure subsequent to myocardial infarction*. *Circulation*, 1997. **96**(7): p. 2414-20.
70. Mallat, Z., et al., *Elevated levels of 8-iso-prostaglandin F2alpha in pericardial fluid of patients with heart failure: a potential role for in vivo oxidant stress in ventricular dilatation and progression to heart failure*. *Circulation*, 1998. **97**(16): p. 1536-9.
71. Cheng, W., et al., *Stretch-induced programmed myocyte cell death*. *J Clin Invest*, 1995. **96**(5): p. 2247-59.

72. Nakamura, K., et al., *Inhibitory effects of antioxidants on neonatal rat cardiac myocyte hypertrophy induced by tumor necrosis factor-alpha and angiotensin II*. *Circulation*, 1998. **98**(8): p. 794-9.
73. Sawyer, D.B. and W.S. Colucci, *Mitochondrial oxidative stress in heart failure: "oxygen wastage" revisited*. *Circ Res*, 2000. **86**(2): p. 119-20.
74. Opie, L.H., et al., *Adrenaline-induced "oxygen-wastage" and enzyme release from working rat heart. Effects of calcium antagonism, beta-blockade, nicotinic acid and coronary artery ligation*. *J Mol Cell Cardiol*, 1979. **11**(10): p. 1073-94.
75. Kukin, M.L., et al., *Prospective, randomized comparison of effect of long-term treatment with metoprolol or carvedilol on symptoms, exercise, ejection fraction, and oxidative stress in heart failure*. *Circulation*, 1999. **99**(20): p. 2645-51.
76. Ide, T., et al., *Mitochondrial electron transport complex I is a potential source of oxygen free radicals in the failing myocardium*. *Circ Res*, 1999. **85**(4): p. 357-63.
77. Ide, T., et al., *Direct evidence for increased hydroxyl radicals originating from superoxide in the failing myocardium*. *Circ Res*, 2000. **86**(2): p. 152-7.
78. Bauersachs, J., et al., *Endothelial dysfunction in chronic myocardial infarction despite increased vascular endothelial nitric oxide synthase and soluble guanylate cyclase expression: role of enhanced vascular superoxide production*. *Circulation*, 1999. **100**(3): p. 292-8.
79. Li, J.M. and A.M. Shah, *Mechanism of endothelial cell NADPH oxidase activation by angiotensin II. Role of the p47phox subunit*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(14): p. 12094-100.
80. Heymes, C., et al., *Increased myocardial NADPH oxidase activity in human heart failure*. *J Am Coll Cardiol*, 2003. **41**(12): p. 2164-71.
81. Hare, J.M. and J.S. Stamler, *NO/redox disequilibrium in the failing heart and cardiovascular system*. *J Clin Invest*, 2005. **115**(3): p. 509-17.
82. Zima, A.V. and L.A. Blatter, *Redox regulation of cardiac calcium channels and transporters*. *Cardiovasc Res*, 2006. **71**(2): p. 310-21.
83. Cheng, T.H., et al., *Involvement of reactive oxygen species in angiotensin II-induced endothelin-1 gene expression in rat cardiac fibroblasts*. *J Am Coll Cardiol*, 2003. **42**(10): p. 1845-54.
84. Siwik, D.A., P.J. Pagano, and W.S. Colucci, *Oxidative stress regulates collagen synthesis and matrix metalloproteinase activity in cardiac fibroblasts*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2001. **280**(1): p. C53-60.
85. Daiber, A., et al., *New insights into bioactivation of organic nitrates, nitrate tolerance and cross-tolerance*. *Clin Res Cardiol*, 2008. **97**(1): p. 12-20.
86. Ahlner, J., et al., *Organic nitrate esters: clinical use and mechanisms of actions*. *Pharmacol Rev*, 1991. **43**(3): p. 351-423.
87. Griesberger, M., et al., *Bioactivation of pentaerythrityl tetranitrate by mitochondrial aldehyde dehydrogenase*. *Mol Pharmacol*, 2011. **79**(3): p. 541-8.
88. Kleschyov, A.L., et al., *Does nitric oxide mediate the vasodilator activity of nitroglycerin?* *Circ Res*, 2003. **93**(9): p. e104-12.
89. Nunez, C., et al., *Discrepancies between nitroglycerin and NO-releasing drugs on mitochondrial oxygen consumption, vasoactivity, and the release of NO*. *Circ Res*, 2005. **97**(10): p. 1063-9.
90. Fung, H.L., *Biochemical mechanism of nitroglycerin action and tolerance: is this old mystery solved?* *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2004. **44**: p. 67-85.
91. Aktories, K., et al., *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie: für Studenten der Medizin, Veterinärmedizin, Pharmazie, Chemie und Biologie sowie für Ärzte, Tierärzte und Apotheker. mit 305 Tabellen*. 2009: Elsevier, Urban & Fischer.
92. Chen, Z., J. Zhang, and J.S. Stamler, *Identification of the enzymatic mechanism of nitroglycerin bioactivation*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(12): p. 8306-11.
93. Chen, Z., et al., *An essential role for mitochondrial aldehyde dehydrogenase in nitroglycerin bioactivation*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(34): p. 12159-64.
94. Munzel, T., et al., *Evidence for enhanced vascular superoxide anion production in nitrate tolerance. A novel mechanism underlying tolerance and cross-tolerance*. *J Clin Invest*, 1995. **95**(1): p. 187-94.

95. Daiber, A., et al., *Oxidative stress and mitochondrial aldehyde dehydrogenase activity: a comparison of pentaerythritol tetranitrate with other organic nitrates*. *Mol Pharmacol*, 2004. **66**(6): p. 1372-82.
96. Munzel, T., A. Daiber, and A. Mulsch, *Explaining the phenomenon of nitrate tolerance*. *Circ Res*, 2005. **97**(7): p. 618-28.
97. Heitzer, T., et al., *Long-term nitroglycerin treatment is associated with supersensitivity to vasoconstrictors in men with stable coronary artery disease: prevention by concomitant treatment with captopril*. *J Am Coll Cardiol*, 1998. **31**(1): p. 83-8.
98. Death, A.K., et al., *Nitroglycerin upregulates matrix metalloproteinase expression by human macrophages*. *J Am Coll Cardiol*, 2002. **39**(12): p. 1943-50.
99. Wenzel, P., et al., *Number of nitrate groups determines reactivity and potency of organic nitrates: a proof of concept study in ALDH-2^{-/-} mice*. *Br J Pharmacol*, 2007. **150**(4): p. 526-33.
100. Sydow, K., et al., *Central role of mitochondrial aldehyde dehydrogenase and reactive oxygen species in nitroglycerin tolerance and cross-tolerance*. *J Clin Invest*, 2004. **113**(3): p. 482-9.
101. Mollnau, H., et al., *Mitochondrial oxidative stress and nitrate tolerance--comparison of nitroglycerin and pentaerythritol tetranitrate in Mn-SOD^{+/-} mice*. *BMC Cardiovasc Disord*, 2006. **6**: p. 44.
102. Wenzel, P., et al., *Heme oxygenase-1: a novel key player in the development of tolerance in response to organic nitrates*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007. **27**(8): p. 1729-35.
103. Oberle, S., et al., *Endothelial protection by pentaerythritol trinitrate: bilirubin and carbon monoxide as possible mediators*. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2003. **228**(5): p. 529-34.
104. Pfeffer, M.A., et al., *Myocardial infarct size and ventricular function in rats*. *Circ Res*, 1979. **44**(4): p. 503-12.
105. Fraccarollo, D., et al., *Deletion of cardiomyocyte mineralocorticoid receptor ameliorates adverse remodeling after myocardial infarction*. *Circulation*, 2011. **123**(4): p. 400-8.
106. Robinson, K.M., M.S. Janes, and J.S. Beckman, *The selective detection of mitochondrial superoxide by live cell imaging*. *Nat Protoc*, 2008. **3**(6): p. 941-7.
107. Zhao, H., et al., *Superoxide reacts with hydroethidine but forms a fluorescent product that is distinctly different from ethidium: potential implications in intracellular fluorescence detection of superoxide*. *Free Radic Biol Med*, 2003. **34**(11): p. 1359-68.
108. Fink, B., et al., *Detection of intracellular superoxide formation in endothelial cells and intact tissues using dihydroethidium and an HPLC-based assay*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2004. **287**(4): p. C895-902.
109. Lottspeich, F. and H. Zorbas, *Bioanalytik*. 1998: Spektrum Akademischer Verlag.
110. Renz-Polster, H. and S. Krautzig, *Basislehrbuch Innere Medizin: Kompakt, greifbar, verständlich;[Online-Zugang+ interaktive Extras]*. 2008: Elsevier, Urban & Fischer.
111. Halapas, A., et al., *In vivo models for heart failure research*. *In Vivo*, 2008. **22**(6): p. 767-80.
112. Fishbein, M.C., D. Maclean, and P.R. Maroko, *Experimental myocardial infarction in the rat: qualitative and quantitative changes during pathologic evolution*. *Am J Pathol*, 1978. **90**(1): p. 57-70.
113. Lindsay, D.C., et al., *Impairment of endothelium dependent responses in a rat model of chronic heart failure: effects of an exercise training protocol*. *Cardiovasc Res*, 1992. **26**(7): p. 694-7.
114. Ontkian, M., R. Gay, and B. Greenberg, *Diminished endothelium-derived relaxing factor activity in an experimental model of chronic heart failure*. *Circ Res*, 1991. **69**(4): p. 1088-96.
115. Pfeffer, J.M., et al., *Progressive ventricular remodeling in rat with myocardial infarction*. *Am J Physiol*, 1991. **260**(5 Pt 2): p. H1406-14.
116. Böcker, W. and P.U. Heitz, *Pathologie*. 2008: Elsevier, Urban & Fischer.
117. Luther, D.J., et al., *Absence of type VI collagen paradoxically improves cardiac function, structure, and remodeling after myocardial infarction*. *Circ Res*, 2012. **110**(6): p. 851-6.
118. Herold, G., *Innere Medizin 2012: Eine vorlesungsorientierte Darstellung; unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges für die Ärztliche Prüfung; mit ICD 10-Schlüssel im Text und Stichwortverzeichnis*. 2012: Herold.

119. Fukai, T. and M. Ushio-Fukai, *Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases*. *Antioxid Redox Signal*, 2011. **15**(6): p. 1583-606.
120. Sladek, T., et al., *The effect of AT1 receptor antagonist on chronic cardiac response to coronary artery ligation in rats*. *Cardiovasc Res*, 1996. **31**(4): p. 568-76.
121. Van Kerckhoven, R., et al., *Pharmacological therapy can increase capillary density in post-infarction remodeled rat hearts*. *Cardiovasc Res*, 2004. **61**(3): p. 620-9.
122. Silbernagl, S., *Taschenatlas der Physiologie*. 2007: Thieme.
123. Anversa, P., et al., *Myocardial infarction in rats. Infarct size, myocyte hypertrophy, and capillary growth*. *Circ Res*, 1986. **58**(1): p. 26-37.
124. Anversa, P., et al., *Left ventricular failure induced by myocardial infarction. II. Tissue morphometry*. *Am J Physiol*, 1985. **248**(6 Pt 2): p. H883-9.
125. Shiojima, I., et al., *Disruption of coordinated cardiac hypertrophy and angiogenesis contributes to the transition to heart failure*. *J Clin Invest*, 2005. **115**(8): p. 2108-18.
126. Luque Contreras, D., et al., *The role of nitric oxide in the post-ischemic revascularization process*. *Pharmacol Ther*, 2006. **112**(2): p. 553-63.
127. Babaei, S., et al., *Role of nitric oxide in the angiogenic response in vitro to basic fibroblast growth factor*. *Circ Res*, 1998. **82**(9): p. 1007-15.
128. Murohara, T., et al., *Role of endothelial nitric oxide synthase in endothelial cell migration*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1999. **19**(5): p. 1156-61.
129. Jones, M.K., et al., *Dual actions of nitric oxide on angiogenesis: possible roles of PKC, ERK, and AP-1*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004. **318**(2): p. 520-8.
130. Hood, J.D., et al., *VEGF upregulates eNOS message, protein, and NO production in human endothelial cells*. *Am J Physiol*, 1998. **274**(3 Pt 2): p. H1054-8.
131. Tamarat, R., et al., *Endothelial nitric oxide synthase lies downstream from angiotensin II-induced angiogenesis in ischemic hindlimb*. *Hypertension*, 2002. **39**(3): p. 830-5.
132. Namkoong, S., et al., *Prostaglandin E2 stimulates angiogenesis by activating the nitric oxide/cGMP pathway in human umbilical vein endothelial cells*. *Exp Mol Med*, 2005. **37**(6): p. 588-600.
133. Zhang, R., et al., *Nitric oxide enhances angiogenesis via the synthesis of vascular endothelial growth factor and cGMP after stroke in the rat*. *Circ Res*, 2003. **92**(3): p. 308-13.
134. Schulman, I.H. and J.M. Hare, *Regulation of cardiovascular cellular processes by S-nitrosylation*. *Biochim Biophys Acta*, 2012. **1820**(6): p. 752-62.
135. Bir, S.C., et al., *Emerging role of PKA/eNOS pathway in therapeutic angiogenesis for ischaemic tissue diseases*. *Cardiovasc Res*, 2012. **95**(1): p. 7-18.
136. Connor, K.M., et al., *Mitochondrial H2O2 regulates the angiogenic phenotype via PTEN oxidation*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(17): p. 16916-24.
137. Griendling, K.K. and G.A. FitzGerald, *Oxidative stress and cardiovascular injury: Part II: animal and human studies*. *Circulation*, 2003. **108**(17): p. 2034-40.
138. Widder, J., et al., *Vascular endothelial dysfunction and superoxide anion production in heart failure are p38 MAP kinase-dependent*. *Cardiovasc Res*, 2004. **63**(1): p. 161-7.
139. Mukhopadhyay, P., et al., *Simple quantitative detection of mitochondrial superoxide production in live cells*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007. **358**(1): p. 203-8.
140. Daiber, A., et al., *Heme oxygenase-1 induction and organic nitrate therapy: beneficial effects on endothelial dysfunction, nitrate tolerance, and vascular oxidative stress*. *Int J Hypertens*, 2012. **2012**: p. 842632.
141. Immenschuh, S. and G. Ramadori, *Gene regulation of heme oxygenase-1 as a therapeutic target*. *Biochem Pharmacol*, 2000. **60**(8): p. 1121-8.
142. Yang, L., S. Quan, and N.G. Abraham, *Retrovirus-mediated HO gene transfer into endothelial cells protects against oxidant-induced injury*. *Am J Physiol*, 1999. **277**(1 Pt 1): p. L127-33.
143. Schuhmacher, S., et al., *Pentaerythritol tetranitrate improves angiotensin II-induced vascular dysfunction via induction of heme oxygenase-1*. *Hypertension*, 2010. **55**(4): p. 897-904.
144. Ishizaka, N. and K.K. Griendling, *Heme oxygenase-1 is regulated by angiotensin II in rat vascular smooth muscle cells*. *Hypertension*, 1997. **29**(3): p. 790-5.

145. Schuhmacher, S., et al., *Vascular dysfunction in experimental diabetes is improved by pentaerythryl tetranitrate but not isosorbide-5-mononitrate therapy*. Diabetes, 2011. **60**(10): p. 2608-16.
146. Bauersachs, J. and D. Fraccarollo, *Endothelial NO synthase target of aldosterone*. Hypertension, 2006. **48**(1): p. 27-8.
147. Landmesser, U., et al., *Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension*. J Clin Invest, 2003. **111**(8): p. 1201-9.
148. Stocker, R., et al., *Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance*. Science, 1987. **235**(4792): p. 1043-6.
149. Oberle, S., et al., *The antioxidant defense protein ferritin is a novel and specific target for pentaerythryl tetranitrate in endothelial cells*. Biochem Biophys Res Commun, 1999. **261**(1): p. 28-34.
150. Balla, G., et al., *Ferritin: a cytoprotective antioxidant strategem of endothelium*. J Biol Chem, 1992. **267**(25): p. 18148-53.
151. Miller, J.D., et al., *MnSOD protects against COX1-mediated endothelial dysfunction in chronic heart failure*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2010. **298**(5): p. H1600-7.
152. Forstermann, U. and T. Munzel, *Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace*. Circulation, 2006. **113**(13): p. 1708-14.
153. Mullens, W., et al., *Usefulness of Isosorbide Dinitrate and Hydralazine as add-on therapy in patients discharged for advanced decompensated heart failure*. Am J Cardiol, 2009. **103**(8): p. 1113-9.
154. Elkayam, U. and F. Bitar, *Effects of nitrates and hydralazine in heart failure: clinical evidence before the african american heart failure trial*. Am J Cardiol, 2005. **96**(7B): p. 37i-43i.
155. Daiber, A., et al., *Hydralazine is a powerful inhibitor of peroxynitrite formation as a possible explanation for its beneficial effects on prognosis in patients with congestive heart failure*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **338**(4): p. 1865-74.
156. Gori, T. and T. Munzel, *Symptomatic and hemodynamic benefit of pentaerythryl tetranitrate and hydralazine in a case of congestive heart failure*. Clin Res Cardiol, 2009. **98**(10): p. 677-9.
157. Bundesvereinigung, K. *Verordnungssteuerung - Pentalong® ist nicht verordnungsfähig*. 2012 22.02.2012; Available from: <http://www.kbv.de/gesundheitspolitik/40842.html>.

Danksagung

Sehr herzlich danke ich Herrn PD Dr. J. Widder für die Überlassung des Themas und die engagierte und wissenschaftlich vorzügliche Betreuung.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. D. Fraccarollo für die geduldige, fachlich exzellente Unterstützung bei der praktischen Durchführung der Experimente und die anregenden Gespräche im Labor.

Herrn Professor Dr. J. Bauersachs danke ich sehr und auch Herrn Professor G. Ertl für die Möglichkeit das Thema in seiner Arbeitsgruppe respektive Klinik bearbeiten zu können.

Herrn Dr. P. Galuppo danke ich für die große Geduld bei meinen Fragen zu technischen Verfahren und Auswertungen.

Frau A. Berbner, Frau S. Schraut und Frau G. Riehl gilt mein Dank für die freundliche Hilfe im Labor, die angenehme Arbeitsatmosphäre und die tadellose Organisation des Laboralltags.

Dem Dekanat der Medizinischen Fakultät danke ich für die finanzielle Unterstützung in Form eines Promotionsstipendiums.

Frau Dr. Sabine Haaß danke sehr ich für die sprachliche Korrektur.

Julia gilt mein großer Dank für die herzliche, aufmunternde und auch tatkräftige Unterstützung bei der Anfertigung dieser Dissertation.

Ganz besonders danke ich meinen Eltern für den stets liebevollen Rückhalt sowie die Ermöglichung meines Studiums und der Anfertigung dieser Arbeit.

Lebenslauf

■ Persönliche Daten

Name: Jonas Neuser
Geburtsdaten: 21.02.1987 in Velbert
Vater: Dr. rer. nat. Dieter Neuser
Mutter: Susanne Neuser
Nationalität: Deutsch

■ Ärztliche Tätigkeit

seit 01/14 Assistent der Klinik für Kardiologie und Angiologie der Medizinischen Hochschule Hannover

■ Studium

seit 04/07 Studium der Humanmedizin an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

- Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung am 31.03.2009, Note „gut“ (2,0)
- Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung am 05.11.2013, Note „sehr gut“ (1,5)
- Abschluss: Ärztliche Prüfung am 05.11.2013 mit der Gesamtnote „gut“ (1,66)

Praktisches Jahr

- Klinik für Neurologie am Klinikum Aschaffenburg
- Klinik & Poliklinik für Innere Medizin am Universitätsspital Zürich
- Chirurgische Kliniken am Klinikum Aschaffenburg

Famulaturen

- Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral-, Gefäß- und Kinderchirurgie des Universitätsklinikums Würzburg
- Praxis für Orthopädie, Dr. med. M. Schlüter und E. Lauer, Leverkusen
- MVZ RNR Radiologie und Nuklearmedizin, T. Bakkers, Langenfeld
- Ligula Hospital, Mtwara, Tansania

■ Schulbildung

09/04 – 06/06 Marienschule Opladen, Leverkusen, Gymnasium des Erzbistums Köln
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife am 14.06.2006, Note 1,5

08/03 – 06/04 Penn High School, Mishawaka, Indiana, USA

09/97 – 07/03 Marienschule Opladen, Leverkusen, Gymnasium des Erzbistums Köln

09/93 – 07/97 GGS Parkstraße (inzwischen GGS Wiescheid), Langenfeld

■ Stipendien

- Studienstipendium des Evangelischen Studienwerk Villigst e.V.
- Promotionsstipendium der Medizinischen Fakultät der Julius-Maximilians-Universität Würzburg