

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I  
der Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr. med. G. Ertl

Rolle der p38 MAPK (Mitogen aktivierte Protein Kinase) in der Herzinsuffizienz

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg  
vorgelegt von  
Christine Seier  
aus Mainz

Würzburg, Juni 2008

Referent: Priv.-Doz. Dr. med. S. Frantz

Koreferent: Prof. Dr. med. C. Angermann

Dekan: Prof. Dr. med. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 21.10.2008

Die Promovendin ist Ärztin.

# Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1 Mitogen aktivierte Proteinkinasen (MAPK).....	2
1.2 p38 MAPK.....	4
2. Fragestellung.....	8
3. Material und Methoden.....	9
3.1 Pharmakon.....	9
3.2 Tierversuche .....	9
3.3 Infarzierung.....	10
3.4 Hämodynamische Messungen.....	11
3.5 Auswertung der hämodynamischen Daten .....	12
3.6 Gewebegewinnung .....	12
3.7 Infarktgrößenbestimmung .....	13
3.8 Statistische Auswertung.....	14
4. Ergebnisse.....	15
4.1 Mortalität .....	15
4.2 Histologische Auswertung.....	15
4.3 Körper- und Organgewichte .....	17
4.3.1 Körpergewicht.....	17
4.3.2 Ventrikelgewichte .....	18
4.3.3 Lungengewichte .....	19
4.4 Hämodynamische Messungen.....	21
4.4.1 Blutdruck.....	21
4.4.2 Herzfrequenz (HF).....	23
4.4.3 Linksventrikulärer systolischer Druck (LVSP).....	24
4.4.4 Linksventrikulärer enddiastolischer Druck (LVEDP) .....	25
4.4.5 Maximaler und minimaler Druckanstieg pro Zeit (dp/dt max/min).....	26
4.4.6 Cardiac output (CO), Cardiac index (CI).....	27
4.4.7 Schlagvolumen (SV), Schlagvolumen Index (SVI).....	27

4.4.8 Totaler peripherer Widerstand (TPR), Totaler peripherer Widerstand Index (TPRI).....	28
5. Diskussion .....	30
5.1 P38 MAPK – SB239063.....	31
5.2 Einfluss von SB 239063 auf die untersuchten Parameter (Organ- und Körpergewichte, Infarktgröße, Remodeling, Hämodynamik).....	33
5.3 Mögliche Erklärungen für die widerlegte Hypothese .....	38
5.4 Ausblick.....	40
6. Zusammenfassung .....	42
7. Literaturverzeichnis.....	43

# 1. Einleitung

Die Herzinsuffizienz ist definiert als Unfähigkeit des Herzens, das vom Organismus benötigte Herzzeitvolumen bei normalem enddiastolischen Ventrikeldruck zu fördern.

In fortgeschrittenen Stadien geht dies mit pathologischen Werten für physiologische Messgrößen, die zur Charakterisierung der Herzfunktion dienen, wie Herzminutenvolumen, enddiastolischer Druck, maximale Druckerhöhungsgeschwindigkeit und Ejektionsfraktion, einher.

Das klinische Syndrom der chronischen Herzinsuffizienz ist die gemeinsame Endstrecke verschiedenster Herzerkrankungen. Als Ursachen kommen Störungen des Myokards (Ischämie durch Myokardinfarkt oder koronare Herzerkrankungen (KHK), Myokarditis, Kardiomyopathie), des Reizleitungssystems (bradykarde und tachykarde Rhythmusstörungen), des Klappenapparates (Klappenstenosen und Klappeninsuffizienzen), sowie extrakardiale Faktoren (Volumen- und Druckbelastung (arterielle Hypertonie, pulmonale Hypertonie), Volumenmangel, restriktive Perikarditis, Herzbeuteltamponade, Stoffwechselkrankheiten und endokrinologische Erkrankungen) in Betracht.

Die der Herzinsuffizienz zugrunde liegende gestörte kardiale Pumpfunktion bewirkt kompensatorische Mechanismen. Diese kompensatorischen Mechanismen bestehen vor allem aus der myokardialen und systemischen Aktivierung von neurohumoralen Systemen und Zytokinen<sup>15,39,41,52</sup>, die langfristig das Herz weiter schädigen<sup>14,31,53,60,61</sup>.

Die pharmakologische Antagonisierung der neurohormonalen Systeme ist neben der Behandlung der Grunderkrankung das bedeutendste therapeutische Prinzip der chronischen Herzinsuffizienz<sup>13,27,56,62,64,93</sup>.

Einige wichtige Neurohormone, wie z. B. Angiotensin II<sup>69</sup>, Noradrenalin<sup>72,73</sup> und Endothelin-1<sup>71</sup>, wirken über G-Protein gekoppelte Rezeptoren, und können

eine Familie von Signaltransduktionsmolekülen aktivieren, die so genannten Mitogen Aktivierten Protein Kinasen (MAPK) <sup>23</sup>.

Die Bezeichnung MAPK steht für eine Familie von Signaltransduktionsmolekülen, die zentrale Schaltstellen zwischen den Oberflächenrezeptoren der Zellen und dem Zellkern sind <sup>6,8,18,20,22,23</sup> und somit eine Vielzahl an extrazellulären Signalen in den Zellkern vermitteln <sup>10,74,78,79</sup>.

### 1.1 Mitogen aktivierte Proteinkinase (MAPK)

Alle eukaryoten Zellen besitzen mehrere MAPK Wirkungsmechanismen, von denen jeder durch bestimmte Stimuli aktiviert wird. Dadurch wird es der Zelle ermöglicht, auf unterschiedliche Einflüsse differenziert zu antworten.

Alle MAPK Wirkungsmechanismen enthalten drei zentrale Schritte der Signaltransduktion (Abb.1).

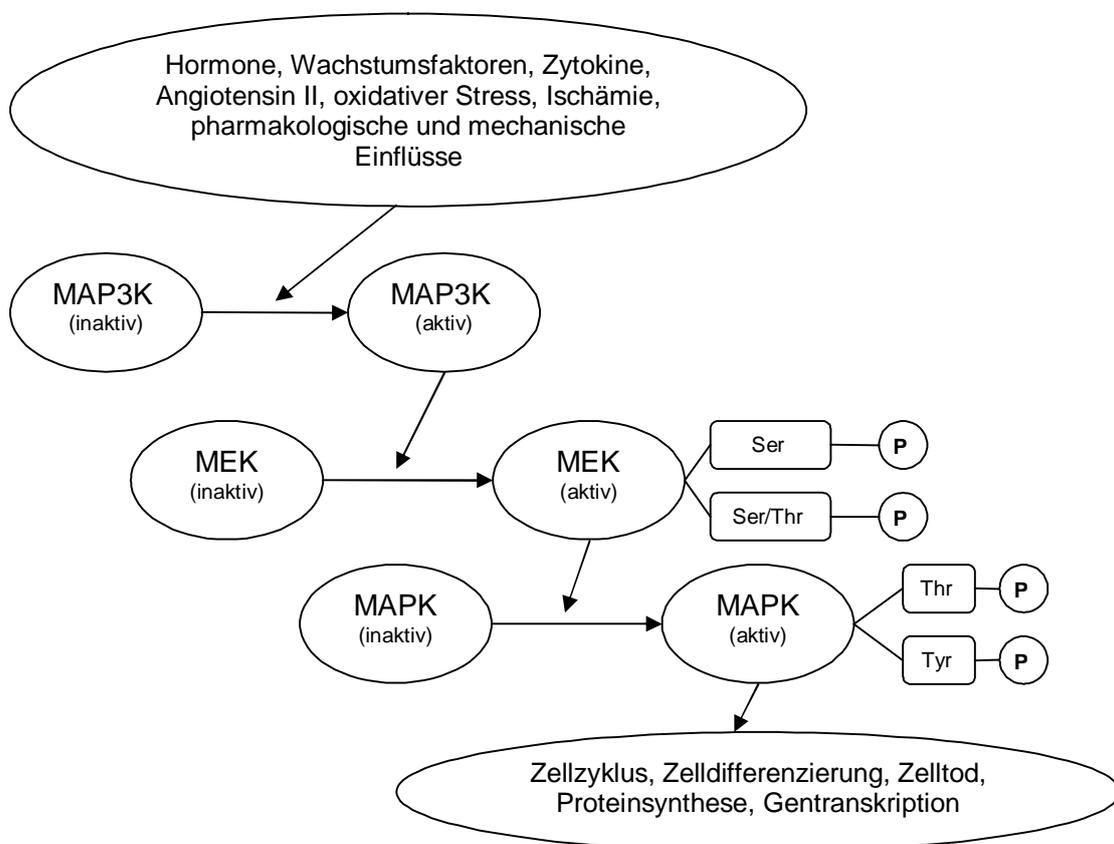


Abb.1: zentrale Schritte der Signaltransduktion der MAPK nach Kyriakis JM, Avruch J <sup>44</sup>

Wie in der Abbildung 1 gezeigt, bestehen die zentralen Schritte der Signaltransduktion zunächst in einer Aktivierung der Signaltransduktionskaskade der MAPK. Diese Aktivierung kann durch ein breites Spektrum an Reizen wie Hormone und Wachstumsfaktoren (Insulin, PDGF (platelet derived growth factor), Fibroblastenwachstumsfaktor), Zytokine<sup>22</sup>, Tumornekrosefaktor -  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), transforming growth factor (TGF)  $\beta$ -verwandte Polypeptide, Angiotensin II und Endothelin über verschiedene Rezeptorfamilien (Tyrosin-Kinase-Rezeptoren, G-Protein gekoppelte Rezeptoren, 7-Transmembran Rezeptoren), sowie über oxidativen Stress<sup>18,21</sup>, Ischämie, pharmakologische Einflüsse oder mechanische Einwirkung, wie Dehnung oder Scherstress<sup>47,89</sup>, stattfinden.

Alle MAPK-Gruppen können prinzipiell von Stimuli aus verschiedenen Gruppen aktiviert werden.

Die unterschiedlichen Stimuli<sup>44</sup> aktivieren mehrere Proteinkinasefamilien, die als MAPK – Kinase Kinasen (MAP3K) zusammengefasst werden.

MAP3K ihrerseits regulieren über Serotonin- und Threonin-Phosphorylierung die Aktivierung einer Familie von „MAPK / extracellular signal-regulated kinase (ERK) kinases“ (MEKs oder MKKs).

Aktivierte MEKs katalysieren die Phosphorylierung von inaktiven MAPKs in einer Aktivierungsdomäne mit dem Muster Threonin-X-Thyrosin an beiden Aminosäuren<sup>88</sup>.

MAPKs, die aktiviert wurden, können in den Zellzyklus, die Zelldifferenzierung, den Zelltod, die Proteinsynthese und die Gentranskription eingreifen und diese regulieren.

Die Hauptmitglieder der Familie der MAPK sind die "Extracellular signal regulated kinases" (ERK), die "c-Jun-N-terminal regulated kinases" (JNK) und die "p38" MAPKinase.

Die Gruppe der ERK MAPKinasen mit den beiden Hauptisoformen ERK 1 und 2 wird durch eine Vielzahl von Stimuli in Kardiomyozyten, kardialen Fibroblasten, glatten Gefäßmuskulzellen und Endothelzellen aktiviert. Eine wesentliche

Eigenschaft der ERK vermittelten Signaltransduktion scheint die Hypertrophie und das Zellüberleben zu sein <sup>7,10,32,34,76,78,79</sup>.

JNK ist ebenfalls in allen kardiovaskulären Zellen vorhanden. Bis heute konnten 10 Isoformen identifiziert werden, die ein Produkt dreier Gene und alternativem Splicing sind. JNK ist wie ERK in Apoptose und Hypertrophie involviert. Bislang sind keine Daten über spezifische Funktionen der einzelnen Isoformen publiziert <sup>7,10,32,34,78,79</sup>.

## **1.2 p38 MAPK**

Die p38 MAPK-Familie besteht bislang aus p38 $\alpha$ , p38 $\beta$ , p38 $\gamma$  und p38 $\delta$ . Die Unterschiede der einzelnen Isoformen im Hinblick auf ihre zellulären Effekte sind bisher kaum untersucht.

Die Isoformen p38 $\alpha$  und p38 $\beta$  MAPK kommen ubiquitär vor, wohingegen die anderen Isoformen p38 $\gamma$  im Skelettmuskel und p38 $\delta$  in Niere, Testis, Pankreas und Lunge hauptsächlich vorhanden sind.

Kardial kommt p38 MAPK eine zentrale Bedeutung für die Entstehung der kardiomyozytären Hypertrophie zu.

Extrakardial hat p38 MAPK vor allem bei chronisch entzündlichen Erkrankungen, wie zum Beispiel dem Morbus Crohn, der rheumatischen Arthritis und der Psoriasis eine Bedeutung. In extrakardialen Zellen kommt p38 MAPK eine zentrale Rolle bei der Expression von TNF- $\alpha$ , IL (Interleukin)-1 und MCP (monocyte chemoattractant protein)-1 zu. Hierbei handelt es sich um Zytokine, die möglicherweise auch eine Rolle bei der chronischen Herzinsuffizienz spielen.

Kardiovaskuläre Faktoren, die p38 MAPK aktivieren können, wurden in *in vitro* Experimenten identifiziert. Diese Faktoren lassen sich in die folgenden drei Gruppen gliedern: in Stress-assoziierte Faktoren, Wachstumsfaktoren und Zytokine <sup>10</sup>. Tabelle 1 gibt einen Überblick über die bislang untersuchten kardiovaskulären Stimuli.

Stress	Wachstumsfaktoren	Zytokine
mechanische Dehnung, Scherstress <sup>68</sup>	Katecholamine <sup>8,45</sup>	Tumor Nekrose Faktor- $\alpha$ 18,22
oxidativ (Hypoxie/Reoxygenation) <sup>77</sup> Pacing	Angiotensin II <sup>42,57,59,83</sup> Endothelin-1 <sup>6,36,75,81</sup>	Cardiotrophin-1 <sup>18</sup> Leukemic inhibitory factor <sup>18</sup>
Osmotisch <sup>19</sup>	Adenosin <sup>32</sup>	Interleukin-1 <sup>22,33</sup> TGF beta-1

Tab.1: Auswahl der Stimuli für p38 MAPK und weiterführende Literatur (nach<sup>10</sup>)

Im Hinblick auf den Übergang von kardiomyozytärer Hypertrophie zur Herzinsuffizienz ist von besonderer Bedeutung, dass p38 MAPK Schaltstelle für adaptive Hypertrophie und Apoptose<sup>10,32,78,79</sup> zu sein scheint.

Experimente mit Isoform-spezifischen Adenoviren in neonatalen Kardiomyozyten konnten zeigen, dass p38 $\alpha$  pro-apoptotische und p38 $\beta$  anti-apoptotische und hypertrophische Signale vermittelt<sup>1,24,85</sup>.

Um diese Effekte von der Zellmembran in den Zellkern zu übermitteln, bedienen sich die MAPK verschiedener Transkriptionsfaktoren, die sie direkt phosphorylieren, z. B. ATF (activating transcription factor)-2, oder weiterer Kinasen, den sog. "Mitogen-Activated Protein Kinase Associated Protein-Kinasen", z. B. MAPKAP-K2<sup>88,92</sup>. MAPKAP-K2 wiederum aktiviert im weiteren Weg der Signaltransduktion HSP-27 (Hitzeschockprotein), das kardioprotektiv wirkt.

Allerdings können MAPKAP-K2 von multiplen kardialen Enzymen phosphoryliert werden und bilden daher kein spezifisches Substrat von p38 MAPK<sup>46</sup>.

In Abbildung 2 sind weitere Wirkungsmechanismen, die über p38 MAPK aktiviert werden, veranschaulicht.

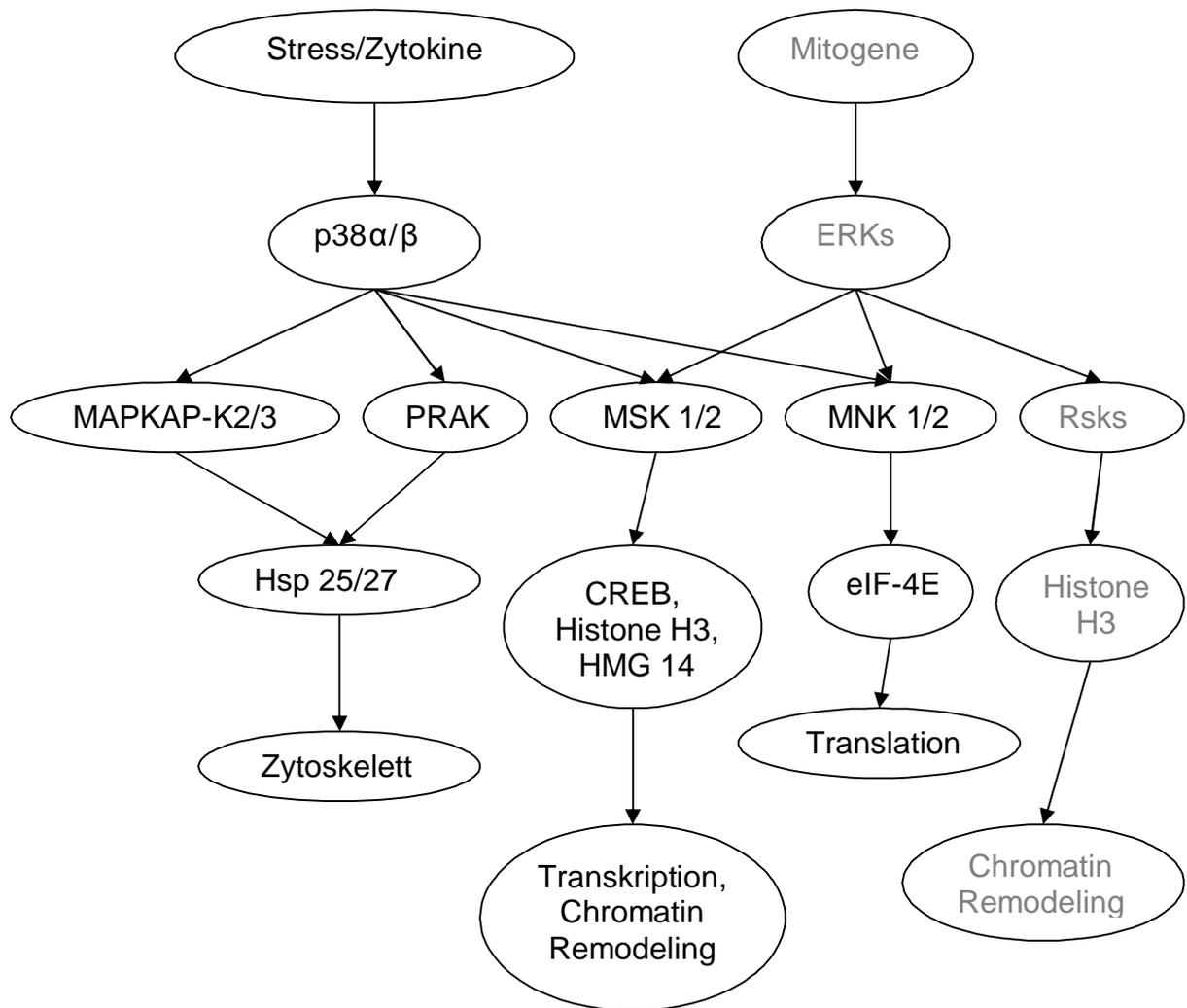


Abb.2: Signaltransduktionswege der p38 MAPK nach Kyriakis JM, Avruch J<sup>44</sup>

Deutlich wird hierbei, dass Substrate der p38 MAPK, wie z.B. MNK (MAPK-interacting kinase) und MSK (Mitogen- and stress-activated protein kinases) auch durch andere MAP Kinasen, wie z.B. ERK reguliert werden können.

Die Effektivität der durch MAPK induzierten Signaltransduktion hängt auch von positiv verstärkenden Mechanismen (wie z.B. der zytoplasmatischen Phospholipase A2) und von negativen Feedback-Mechanismen (wie z.B. der Aktivität der MAPK Phosphatasen) ab.

Die Aktivierung von p38 MAPK durch MKK 6 bewirkt eine Zunahme des Zellvolumens, ändert die Organisation des Sarkomers und induziert die

Expression herzspezifischer Gene wie ANP (atrialess natriuretisches Peptid), BNP (brain natriuretic peptide) und  $\alpha$ -SkA (skeletal  $\alpha$ -actin).

Findet jedoch eine Koaktivierung von p38 MAPK durch MKK 3 und von JNK durch MKK 7 statt, besteht die Zellantwort nicht in der Hypertrophie sondern im Zelltod. Die MKK 6 und MKK 7 Koexpression inhibiert jegliche Zellantwort in Richtung Hypertrophie.

*In vitro* Experimente an neonatalen Kardiomyozyten zeigten eine wichtige Rolle der p38 MAPK bei der Hypertrophie und Apoptose <sup>85</sup>. Aufgrund der experimentellen Gegebenheiten ist es nicht möglich, in der Zellkultur eine chronische Krankheitssituation, wie z. B. die Entstehung der chronischen (ischämischen) Herzinsuffizienz, zu imitieren <sup>51</sup>. Das liegt unter anderem daran, dass neonatale Kardiomyozyten, die bevorzugten Zellen für *in vitro* Experimente, nur eine sehr begrenzte Lebenszeit haben <sup>90</sup>. Myokardiale Zelllinien, z. B. H9C2 Zellen (embryologische Rattenmyozyten), sind möglicherweise phänotypisch nur sehr bedingt geeignet, Rückschlüsse auf kardiale Mechanismen zuzulassen.

*In vivo* konnte bei spontan hypertensiven Ratten eine prolongierte Aktivierung von p38 MAPK während der Entstehung der chronischen Herzinsuffizienz nachgewiesen werden. Die chronische pharmakologische Inhibierung der p38 MAPK durch SB239063 <sup>82</sup> verhindert die Ausbildung einer myokardialen Hypertrophie und Dekompensation bei diesem Tiermodell <sup>3</sup>.

## 2. Fragestellung

In gesunden Rattenherzen findet keine Aktivierung der p38 MAP Kinase statt. Experimente konnten zeigen, dass es bei spontan hypertensiven Ratten während der kompensierten Phase zu einer frühen Aktivierung von p38 MAPK kommt<sup>3</sup>. Die Aktivität und Aktivierung der Kinase vermindert sich bei zunehmender Dekompensation der Herzfunktion.

Ebenfalls wurde bereits nachgewiesen, dass durch Inhibition der p38 MAPK eine kardiale Hypertrophie vermindert und der Übergang in eine dekompensierte Herzinsuffizienz verlangsamt wird<sup>3,27,46,91</sup>.

Fraglich ist, ob die Aktivierung von p38 MAPK eine zentrale Rolle bei der Entwicklung der chronischen Herzinsuffizienz und der kardialen Hypertrophie spielt.

Zur Untersuchung dieser Frage wird als Modell der chronischen Herzinsuffizienz der experimentelle Myokardinfarkt verwendet. Infarzierte Ratten werden mit einem MAPK Inhibitor behandelt und auf ihre Herzfunktion (durch hämodynamische Messungen) und das postischämische Remodeling (durch histologische Messungen) untersucht.

Ergebnisse könnten einen Ansatz zu Therapiemöglichkeiten der kardialen Insuffizienz durch die Inhibition der MAP Kinase bieten.

## 3. Material und Methoden

### 3.1 Pharmakon

Zur Inhibierung der p38 MAP Kinase wurde SB 239063, ein Trans-1-(4-Hydroxycyclohexyl)-4-(4-Fluorophenyl) Methoxypyridimidin-4-yl) Imidazol eingesetzt.

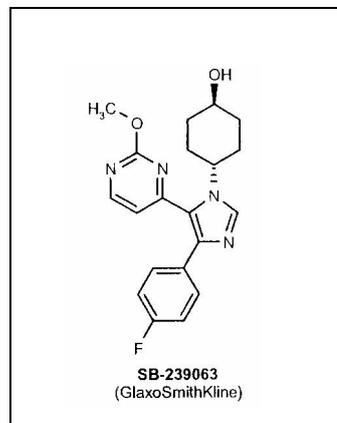


Abb. 3: chemische Struktur von SB 239063 nach <sup>5</sup>

Die Gabe von SB239063 erfolgte mit dem Futter der Tiere (SSNIFF Tierfutter, beliebige Menge, mit einer Konzentration des p38 MAPK-Inhibitors SB239063 von 8mg/10g Futter) <sup>3</sup>.

### 3.2 Tierversuche

Es wurden männliche Wistar Ratten verwendet, die ein Eingangsgewicht von 250 bis 300 Gramm und ein Alter von 10 bis 12 Wochen hatten. Nach Myokardinfarzierung durch Ligatur der linken Koronararterie wurden zwei Gruppen gebildet.

Bei 40 der insgesamt 80 Ratten wurde unmittelbar nach Koronarligatur die Therapie mit dem p38 MAPK-Inhibitor (SB 239063) begonnen.

Die restlichen 40 Ratten erhielten das gleiche Futter, jedoch ohne Zusatz des p38 MAPK-Inhibitors SB 239063.

Die Tiere waren in einem klimatisierten Tierstall in Kunststoffkäfigen untergebracht und einem zwölfstündigen Tag-Nacht-Rhythmus unterworfen.

Eine kardiale Insuffizienz entwickelt sich etwa 8 Wochen nach Myokardinfarzierung. Nach einer Zeit von 12 Wochen wurden hämodynamische Messungen durchgeführt und der Einfluss von p38 MAPK auf die Infarktgröße untersucht.

### **3.3 Infarzierung**

Für die Infarzierung wurden die Ratten mit Ether anästhesiert. Darauf folgte eine Intubation mit Anschluss an ein volumenkonstantes Beatmungsgerät (UB 7025 Beatmungsgerät, Hugo Sachs Elektronik, Deutschland) über das die Narkose mit Isofluran aufrechterhalten wurde. Der linke Thorax wurde eröffnet und das Herz nach Eröffnung des Herzbeutels auf die Außenseite des Thorax verlagert. Die linke Koronararterie wurde mit einem 5-0 Prolene Faden unterbunden. Nach Rücklagerung des Herzens in den Thorax wurde der Thorax wieder verschlossen.

Zusätzlich zu den behandelten und unbehandelten Infarktgruppen gab es jeweils zum Vergleich eine Sham-Gruppe, die eine Schein-Operation erhielt. In dieser befanden sich behandelte und unbehandelte Tiere, bei denen nur eine Thoraxeröffnung ohne Koronarligatur stattgefunden hatte.

Um die perioperative Sterblichkeit so gering wie möglich zu halten, wurden die operierten Tiere in den ersten Stunden nach Koronarligatur einer intensiven Überwachung unterzogen – vergleichbar der Überwachung eines Infarkt-Patienten auf der Intensiv-Station - und beim Auftreten eines Herz-Kreislaufstillstands oft erfolgreich durch Kompression des Thorax reanimiert.

### **3.4 Hämodynamische Messungen**

Zwölf Wochen nach der Infarzierung und Verabreichung des p38 MAPK-Inhibitors oder des Placebos wurden alle Tiere erneut mit Ether anästhesiert und anschließend mit einer Polyethylen Kanüle intubiert und mit Isofluran narkotisiert. Zusätzlich wurden Polyethylen Kanülen in die rechte Arteria carotis communis und in die Vena jugularis für die Druckmessungen eingeführt. Die Druckmessungen liefen über ein kurzes Segment einer flüssigkeitsgefüllten PE 50 Kanüle, die mit einem microtipped Manometer (Millar) über einen Drei-Wege-Hahn verbunden und mit Null auf das mittlere Thoraxniveau geeicht war. Während der Druckmessungen wurde die Kanüle der Arteria carotis communis kurz in den linken Ventrikel vorgeschoben und dann wieder in die Aorta zurückgezogen. Unter leichter Narkose und spontaner Atmung wurden der linksventrikuläre systolische (LVSP, left ventricular systolic pressure) und enddiastolische Druck (LVEDP, left ventricular enddiastolic pressure), der maximale und minimale Anstieg des linksventrikulären systolischen Drucks ( $dp/dt$  max und  $dp/dt$  min), die Herzfrequenz pro Minute (HF), der systolische und der diastolische Aortendruck (SAP, systolic aortic pressure und DAP, diastolic aortic pressure) gemessen. LVSP, LVEDP, SAP und DAP haben alle die Einheit mmHg,  $dp/dt$  max und min die Einheit mmHg/min.

Die Kanüle der Vena jugularis wurde in den rechten Vorhof vorgeschoben, um dort den mittleren rechtsventrikulären Druck (RAP mean, mean right atrial pressure) in der Einheit mmHg unter leichter Narkose und Spontanatmung zu messen.

Unter positiver Druckbeatmung und nach sternaler Thorakotomie wurde eine kalibrierte Fluß-Sonde (2,5mm, Gould Statham Instruments, Hato Rey, Puerto Rico) um die Aorta ascendens platziert, um eine kontinuierliche Messung des Blutstroms der Aorta zu messen. Der mittlere Blutstrom der Aorta wurde elektronisch ermittelt und ist als kardiale Auswurfraction (CO, cardiac output in ml/min) definiert.

### **3.5 Auswertung der hämodynamischen Daten**

Zusätzlich lassen sich durch die in der Hämodynamik gewonnenen Daten weitere Werte ermitteln:

- der mittlere arterielle Druck (MAP) wird über die Formel

$$\text{MAP}=(\text{SAP}-\text{DAP})/3+\text{DAP}$$

errechnet und in mmHg angegeben

- der kardiale Index (CI) leitet sich ab von

$$\text{CI}=(\text{CO}/\text{Körpergewicht})\times 1000$$

mit der Einheit ml×kg Körpergewicht/min

- das Schlagvolumen (SV) ergibt sich aus

$$\text{SV}=(\text{CO}/\text{HF})$$

in der Einheit ml

- der Schlagvolumenindex (SVI) berechnet sich wie folgt

$$\text{SVI}=(\text{CI}/\text{HF})$$

mit der Einheit ml×kg Körpergewicht

- der totale periphere Widerstand (TPR) ist definiert als

$$\text{TPR}=(\text{MAP}-\text{RAP mean})/\text{CO}$$

angegeben in mmHg×min/ml

- der totale periphere Widerstand Index (TPRI) wird durch

$$\text{TPRI}=(\text{MAP}-\text{RAP mean})/\text{CI}$$

ermittelt und in mmHg×min/ml×kg Körpergewicht angegeben

### **3.6 Gewebegewinnung**

Nachdem die Ratten tief mit Ether anästhesiert waren, wurden sie gewogen (Körpergewicht in g) und anschließend die hämodynamischen Messungen durchgeführt.

Nach den hämodynamischen Messungen wurde das Herz entnommen. Es wurde kurz in eiskaltem Extraktionspuffer gewaschen, die Vorhöfe abgetrennt

und verworfen, der rechte Ventrikel (RV) vom linken Ventrikel (LV) getrennt und beide separat gewogen (Angabe in g).

Für die Infarktgrößenberechnung wurde ein Ring des linken Ventrikels asserviert und in OCT-Medium auf einem Korkplättchen eingebettet. Das in dieser Weise präparierte Gewebe wurde dann in flüssigem Stickstoff gefroren. Bis zur Weiterverarbeitung wurden die Präparate bei -80°C aufbewahrt.

Zusätzlich wurde von jedem Tier die Lunge entnommen und einmal sofort (Lunge nass) und nochmals nach 24h Trocknung in einem Trockenschrank bei 24°C (Lunge trocken) gewogen (Einheit in g).

Bei der Auswertung wurden die Organgewichte wie folgt ins Verhältnis zu den Körpergewichten gesetzt:

- RV/KG
- LV/KG
- Lunge nass/KG
- Lunge trocken/KG

### **3.7 Infarktgrößenbestimmung**

Es wurden Kryostatschnitte des linken Ventrikels angefertigt. Dazu wurden die schockgefrorenen Ringe des linken Ventrikels in OCT-Medium (Miles Scientific) eingebettet und in einem Kryostat mit einer Dicke von etwa 6µm geschnitten. Die Schnitte wurden mit Phosphorwolframsäure und Hämatoxylin nach Mallory gefärbt. Bei dieser Färbung erhielten die Myofibrillen durch das Hämatoxylin eine bläulich-lila Farbe, während die Kollagenfasern (Infarkt Narbe) rötlich zur Darstellung kamen.

Unter Verwendung eines digitalen Image Systems (Mocha computer digitizing program) konnten die Schnitte unter dem Mikroskop vermessen werden und die Infarkt Narbe am Endokard und Epikard, der Endokardumfang, der Epikardumfang, die Septumbreite, die Breite der freien Wand (alle Ergebnisse werden in mm angegeben) sowie das innere und äußere Ventrikelvolumen (in der Einheit mm<sup>3</sup>) bestimmt werden.

Anhand der durch die Histologie gemessenen Infarktgrößen konnte über die Formel  $((\text{Epikardnarbe}/\text{Epikardgröße} + \text{Endokardnarbe}/\text{Endokardgröße})/2 \cdot 100)$  ermittelt werden, wie viel Prozent die Infarktnarbe am gesamten Ventrikel (MI-Size %) einnahm.

Nach dieser Berechnung wurden behandelte (SB 239063) und unbehandelte Tiere mit einer Infarktgröße von mehr als 25 % der Ventrikelwand in die Auswertung eingeschlossen.

Durch dieses Verfahren entsteht eine vergleichbare Gruppenbildung mit im Mittel nicht voneinander abweichenden Infarktgrößen.

### ***3.8 Statistische Auswertung***

Zur statistischen Auswertung wurde das Programm GraphPad Prism Us 3.0 verwendet. Um die Daten zu analysieren kam der unpaired t-Test zur Anwendung. Die Ergebnisse werden im Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben. Von signifikant unterschiedlichen Werten wurde gesprochen, wenn p-Value  $< 0,05$  war.

## **4. Ergebnisse**

### **4.1 Mortalität**

Die Sterblichkeit in der unbehandelten Gruppe (n=7) im Vergleich zur behandelten Gruppe (n=4) war nicht unterschiedlich.

Nach der Kaplan-Meier-Berechnung der Überlebenswahrscheinlichkeit zeigt sich für die Placebo-Gruppe eine Überlebenswahrscheinlichkeit von 0,788 und für die SB-Gruppe von 0,899 nach 12 Wochen.

Die verstorbenen Tiere wurden nicht weiter in die Untersuchungen und Auswertungen mit einbezogen.

### **4.2 Histologische Auswertung**

Durch die histologische Infarktgrößenbestimmung wurden behandelte und unbehandelte Myokardinfarkt-Tiere mit einer Infarktgröße von mindestens 25% in die Auswertung eingeschlossen.

Anhand dieser Einteilung befanden sich 17 Tiere in der Placebo- (n=17) und 19 Tiere in der SB – Gruppe (n=19).

Die Myokardinfarktgrößen der Placebo- und SB- Gruppe waren dadurch im Mittel nicht signifikant unterschiedlich, siehe Abb. 4.

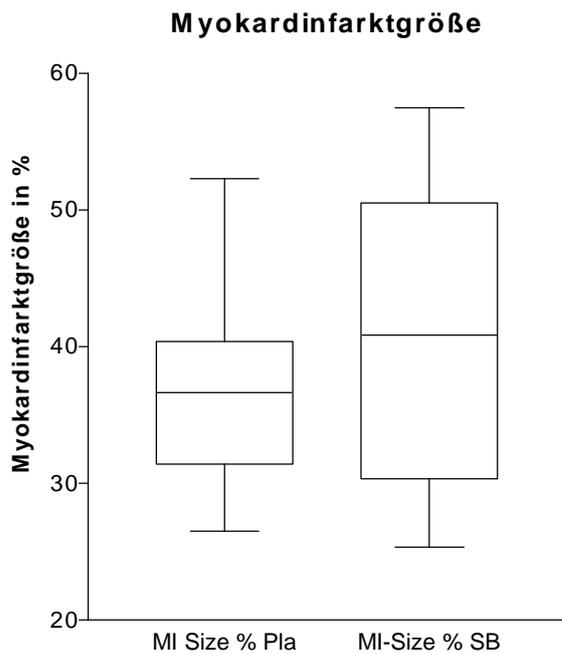


Abb. 4: Myokardinfarktgröße

Außerdem konnte durch die Histologie objektiviert werden, ob nach Infarzierung eine Hypertrophie am Ventrikel stattgefunden hatte. Hierzu waren vor allem die Messung des Septums und der dem Septum gegenüber gelegenen Ventrikelaußenwand (Free Wall) wichtig.

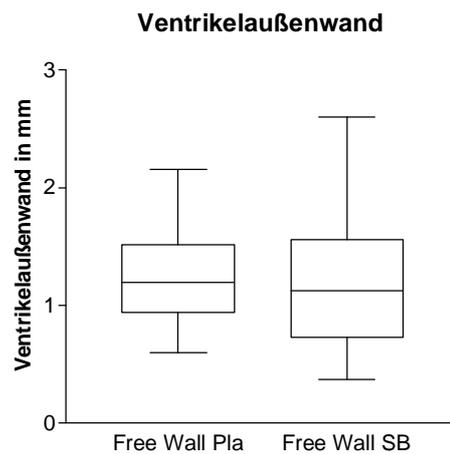
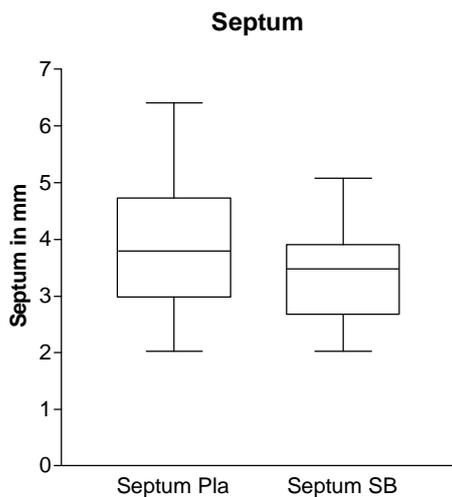


Abb. 5: Septum; Abb. 6: Ventrikelaußenwand (Free Wall)

In diesem Fall war zu erkennen, dass sich 10 Wochen nach Infarzierung die Ventrikel der behandelten Tiere nicht signifikant von den Ventrikeln der unbehandelten Tiere unterschieden. In beiden Gruppen war eine Entwicklung zur Hypertrophie zu erkennen, da sich die Werte signifikant von der Sham-Gruppe (behandelte und unbehandelte Tiere ohne Myokardinfarkt) abhoben.

### 4.3 Körper- und Organgewichte

#### 4.3.1 Körpergewicht

Das Körpergewicht der behandelten Ratten mit dem p38 MAP Kinase – Inhibitor war, sowohl in der Gruppe der Sham – Tiere als auch in der Gruppe der infarzierten Tiere, gegenüber den unbehandelten Tieren der zwei Gruppen signifikant reduziert ( $p < 0,05$ ).

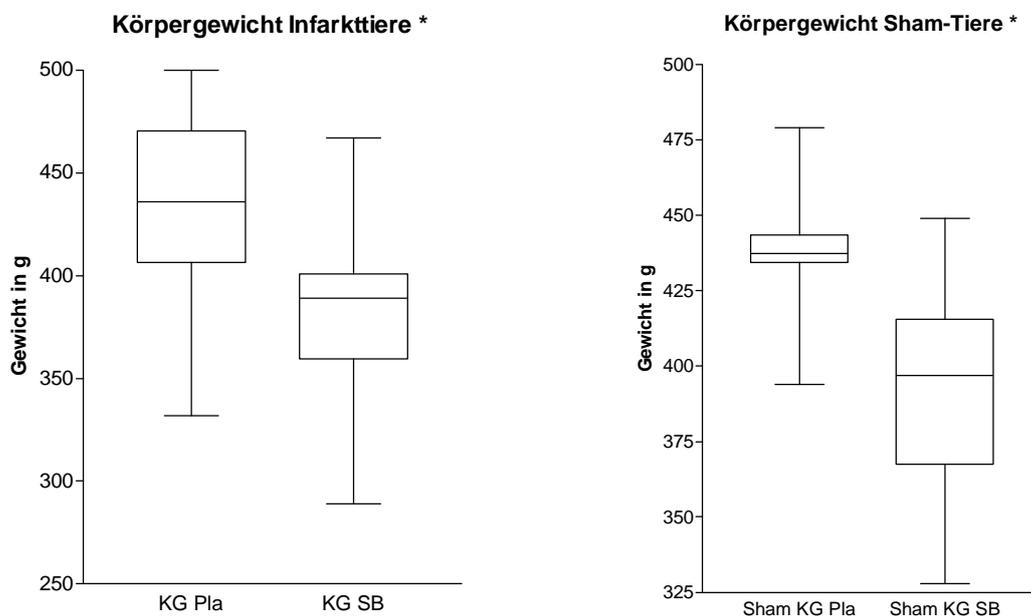


Abb. 7: Körpergewicht Infarkttiere; Abb. 8: Körpergewicht Sham-Tiere

Die Abbildungen 7 und 8 sind mit \* gekennzeichnet, da eine Signifikanz von  $p < 0,05$  im Vergleich der dargestellten Versuchsgruppen vorliegt. Diese Kennzeichnung mit \* gilt auch für weitere Abbildungen, sofern eine Signifikanz von  $p < 0,05$  besteht und die Abbildungen nicht anderweitig beschriftet sind.

#### 4.3.2 Ventrikelgewichte

Nach Entnahme des Herzens wurde jeweils getrennt der linke und der rechte Ventrikel gewogen.

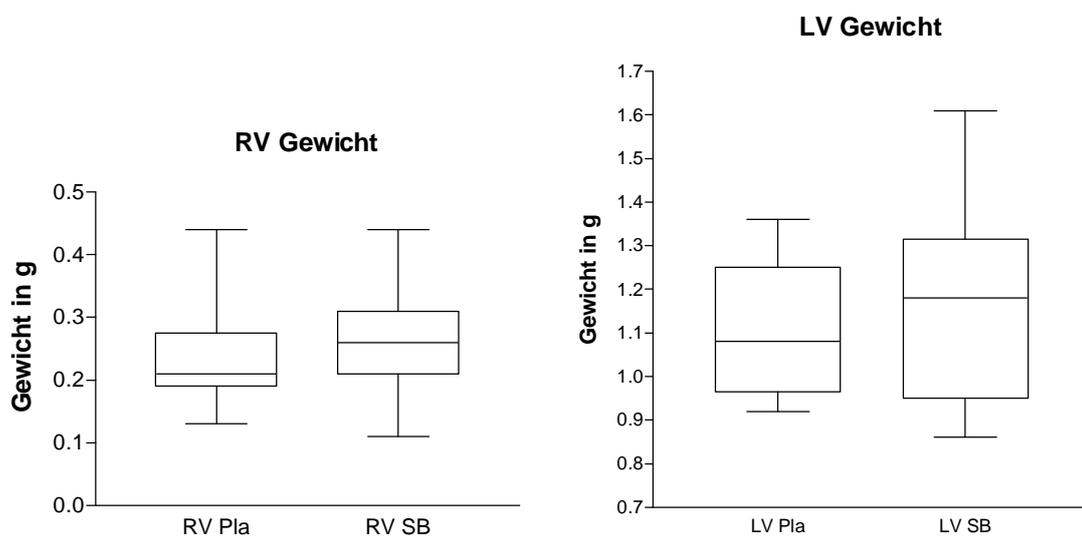


Abb. 9: Rechter Ventrikel (RV) Gewicht; Abb. 10: Linker Ventrikel (LV) Gewicht

Bei dem Vergleich der Gewichte des rechten und linken Ventrikels der behandelten und unbehandelten Tiere wird kein signifikanter Unterschied deutlich. Im Mittel sind die Ventrikel der mit SB 239063 behandelten Tiere unwesentlich schwerer.

Die Gewichte des rechten und linken Ventrikels werden objektiviert, indem sie ins Verhältnis zum Körpergewicht gesetzt werden.

Hierbei zeigt sich ein signifikanter Unterschied des Quotienten von linkem Ventrikel zu Körpergewicht zwischen behandelten und Placebo Tieren, mit einem höheren Quotienten bei den behandelten Tieren.

Im Verhältnis von rechtem Ventrikel zum Körpergewicht zeigt sich bei den Versuchsgruppen der behandelten und unbehandelten Tiere kein signifikanter Unterschied.

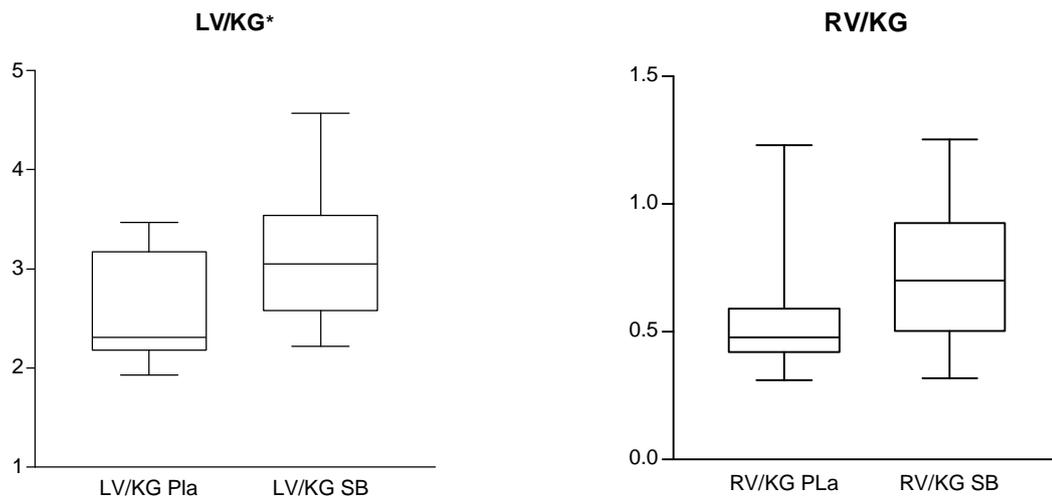


Abb. 11: Linker Ventrikel Gewicht/Körpergewicht (LV/KG); Abb. 12: Rechter Ventrikel Gewicht/Körpergewicht (RV/KG)

#### 4.3.3 Lungengewichte

Die Lunge wurde nass und trocken (nach 24 Stunden Trocknung in einem Trockenschrank) gewogen.

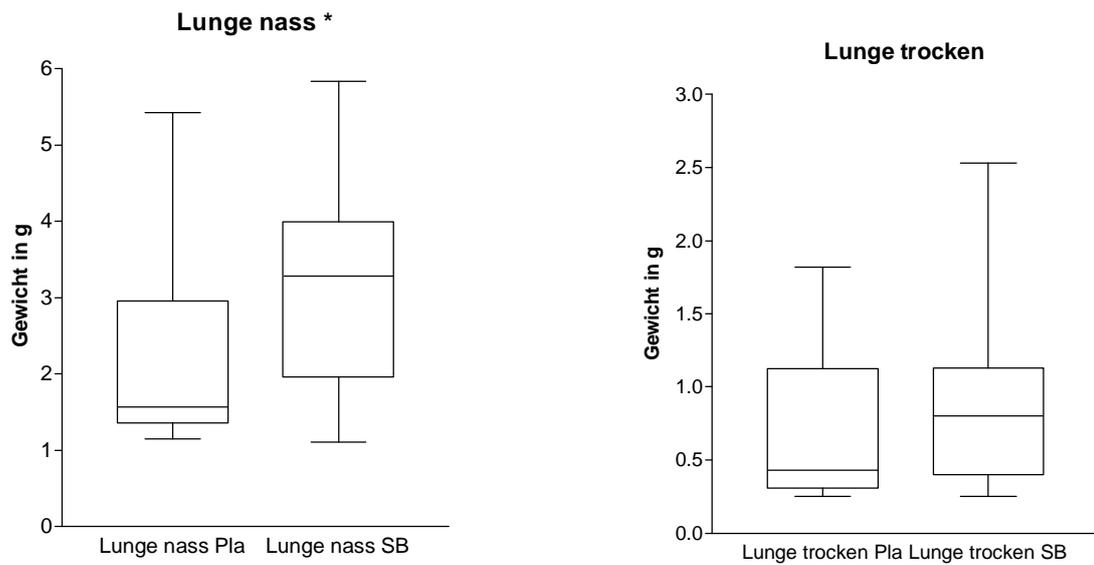


Abb. 13: Gewicht Lunge nass; Abb. 14: Gewicht Lunge trocken

Bei den nassen Lungen wurde eine signifikante Differenz des Gewichts zwischen behandelten und unbehandelten Tieren sichtbar. Die Lungen der behandelten Tiere waren im Mittel schwerer.

Nach 24 Stunden Trocknung im Trockenschrank (Lunge trocken) war dieser Unterschied nicht mehr zu beobachten.

Um das Lungengewicht zu objektivieren, wurde es ins Verhältnis mit dem Körpergewicht (KG) gesetzt (Lunge/KG).

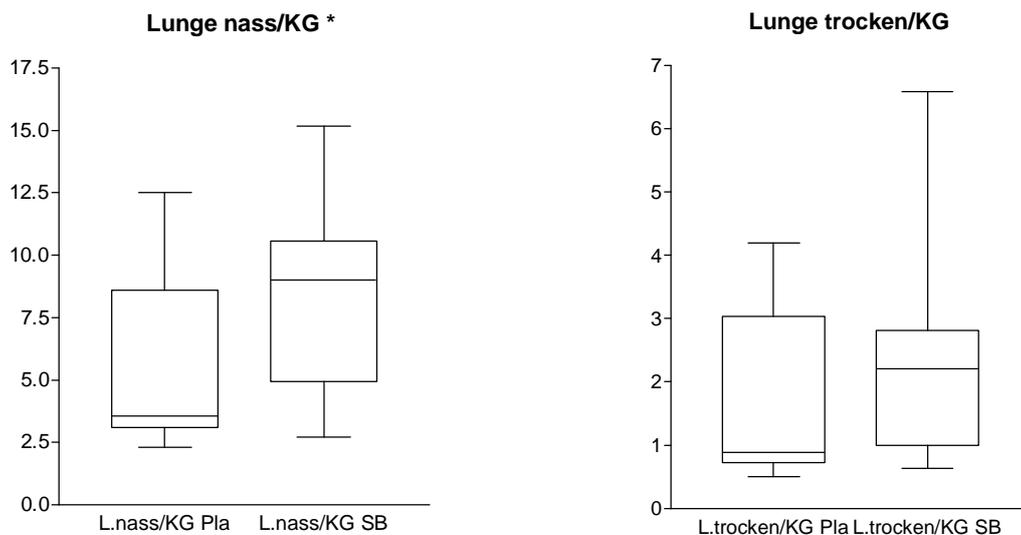


Abb. 15: Lunge nass/Körpergewicht; Abb. 16: Lunge trocken/Körpergewicht

Auch hierbei wurde beobachtet, dass der Quotient aus dem Gewicht der nassen Lungen zum Körpergewicht bei den behandelten Tieren im Vergleich zu den unbehandelten Tieren signifikant größer war.

#### **4.4 Hämodynamische Messungen**

##### **4.4.1 Blutdruck**

An Blutdruckwerten wurden der systolische arterielle (SAP), der diastolische arterielle (DAP) und der mittlere Druck im rechten Vorhof (RAP mean) gemessen.

Beim systolischen und diastolischen arteriellen Druck ließ sich feststellen, dass die Druckwerte der mit dem p38 MAP – Kinase – Inhibitor behandelten Tiere jeweils signifikant niedriger waren, als die der unbehandelten Ratten mit Myokardinfarkt.

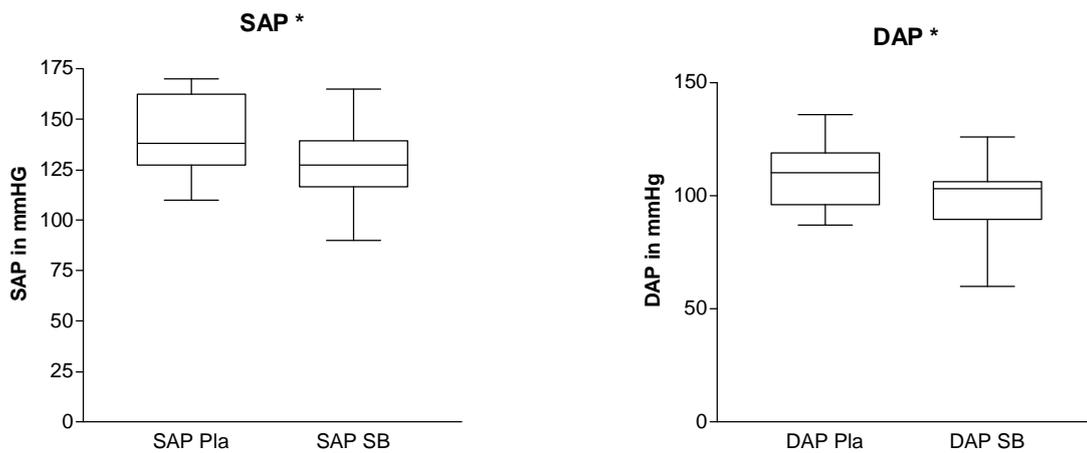


Abb. 17: Systolischer arterieller Blutdruck (SAP); Abb. 18: Diastolischer arterieller Blutdruck (DAP)

Aus den Werten der systolischen und der diastolischen arteriellen Drücke konnte der mittlere arterielle Druck (MAP) errechnet werden.

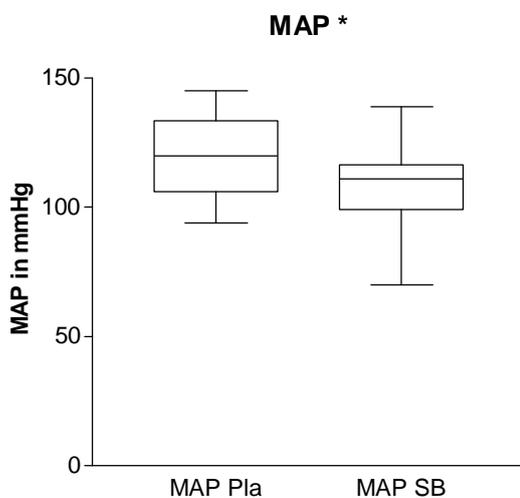


Abb. 19: Mittlerer arterieller Blutdruck (MAP)

Auch bei dem mittleren arteriellen Druck (MAP) ließ sich die signifikante Differenz zwischen den Placebo- und den SB-Tieren nachvollziehen ( $p < 0,05$ ).

Der mittlere rechte Vorhofdruck (RAP mean) bei den Myokardinfarkt-Tieren ließ erkennen, dass die behandelten Tiere gegenüber den unbehandelten Tieren einen geringeren Druck aufwiesen, jedoch war der Unterschied nicht signifikant. Insgesamt bleibt zu erwähnen, dass die Myokardinfarkt-Tiere einen höheren mittleren Druck im rechten Vorhof zeigten als die Sham-Tiere (siehe Tab. 2).

<b>RAP mean in mmHg</b>	Sham	MI
Placebo	1,85±0,36	3,27±0,39*
SB	1,93±0,52	2,79±0,44

Tab. 2: Mittlerer rechter Vorhofdruck (RAP mean)

Die Messwerte sind als Mittelwert ± Standardfehler angegeben. Kennzeichnung der Signifikanz mit "†" bei  $p < 0,05$  im Vergleich von Tieren gleicher Infarktgruppe unterschiedlicher Behandlungsgruppe und mit "\*" bei  $p < 0,05$  im Vergleich der Infarkttiere mit Sham-Tieren gleicher Behandlungsgruppe (Placebo oder SB). Diese Angaben gelten auch für weitere Tabellenausschnitte, sofern sie nicht anderweitig beschriftet sind.

#### 4.4.2 Herzfrequenz (HF)

Die Werte der Herzfrequenz der behandelten und unbehandelten Myokardinfarkt-Tiere sowie die Werte der Sham-Tiere sind der Tabelle zu entnehmen.

<b>HF pro min</b>	Sham	MI
Placebo	345±6	349±9
SB	367±10	342±9

Tab. 3: Herzfrequenz (HF)

Hierbei zeigt sich keine signifikante Differenz innerhalb und zwischen den Gruppen.

#### 4.4.3 Linksventrikulärer systolischer Druck (LVSP)

Der linksventrikuläre Druck zeigt innerhalb der Myokardinfarkt-Gruppe eine Erniedrigung der Werte bei den behandelten Tieren. Die Werte weichen hierbei signifikant voneinander ab.

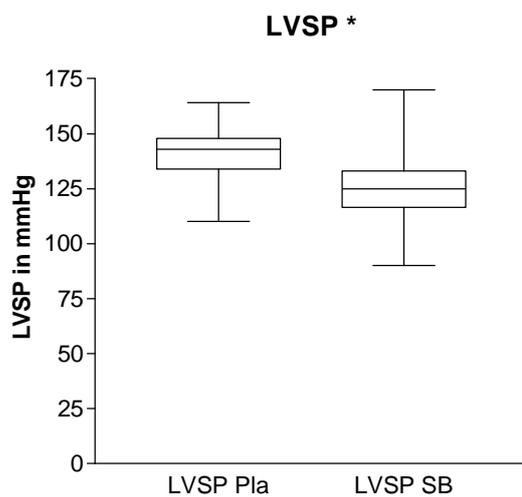


Abb. 20: Linksventrikulärer systolischer Druck (LVSP)

Es ergibt sich im Vergleich zu den Sham-Tieren kein wesentlicher Unterschied beim linksventrikulären systolischen Druck.

#### 4.4.4 Linksventrikulärer enddiastolischer Druck (LVEDP)

Beim linksventrikulären enddiastolischen Druck ergaben die Messungen signifikante Unterschiede innerhalb der Myokardinfarkt-Gruppe mit und ohne Behandlung.

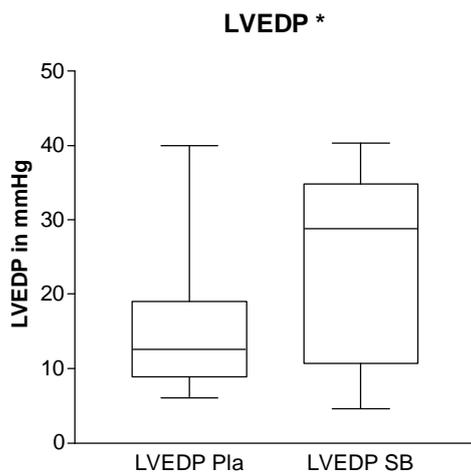


Abb. 21: Linksventrikulärer enddiastolischer Druck (LVEDP)

Der linksventrikuläre enddiastolische Druck war bei den behandelten Infarkt-tieren im Mittel höher als bei den unbehandelten ( $p < 0,05$ ). Gegenüber den Sham-Tieren ist auch eine signifikante Erhöhung des Druckes zu erkennen.

LVEDP in mmHg	Sham	MI
Placebo	6,85±0,34	17,29±2,74*
SB	8,36±2,62	24,2±2,62†*

Tab. 4: Linksventrikulärer enddiastolischer Druck (LVEDP)

#### 4.4.5 Maximaler und minimaler Druckanstieg pro Zeit (dp/dt max/min)

Der maximale und minimale Druckanstieg pro Zeit wurde im linken Ventrikel gemessen. Auffällig war, dass bei dem maximalen Druckanstieg pro Zeit die behandelten Myokardinfarkt-Tiere einen signifikant niedrigeren Druck aufwiesen als die unbehandelten ( $p < 0,05$ ). Diese Differenz ließ sich auch gegenüber den behandelten Sham-Tieren wieder finden.

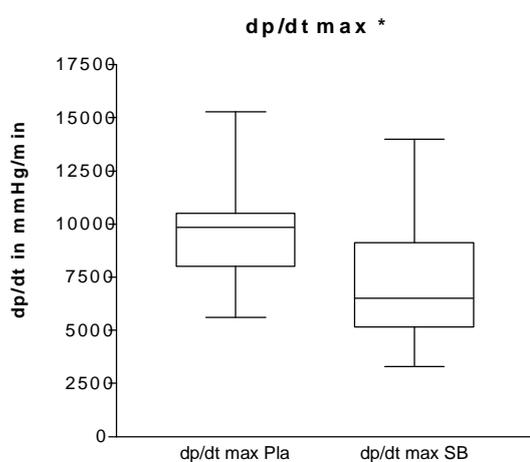


Abb. 22: maximaler Druckanstieg pro Zeit (dp/dt max)

Der minimale Druckanstieg pro Zeit war nicht wesentlich unterschiedlich zwischen den behandelten und unbehandelten Tieren.

<b>dp/dt min in mmHg/min</b>	Sham	MI
Placebo	10150±492	6265±520 *
SB	9256±908	5497±519 *

Tab. 5: minimaler Druckanstieg pro Zeit (dp/dt min)

Nur gegenüber den Sham-Tieren war ein signifikanter Druckabfall zu registrieren.

#### 4.4.6 Cardiac output (CO), Cardiac index (CI)

Die Gegenüberstellung der Werte des Cardiac output von Placebo- und SB-Tieren ergab keinen signifikanten Unterschied.

Nach Errechnung des Cardiac index mit angegebener Formel war ebenfalls ersichtlich, dass sich die Werte der SB-Tiere nicht signifikant von denen der Placebo-Tiere abhoben.

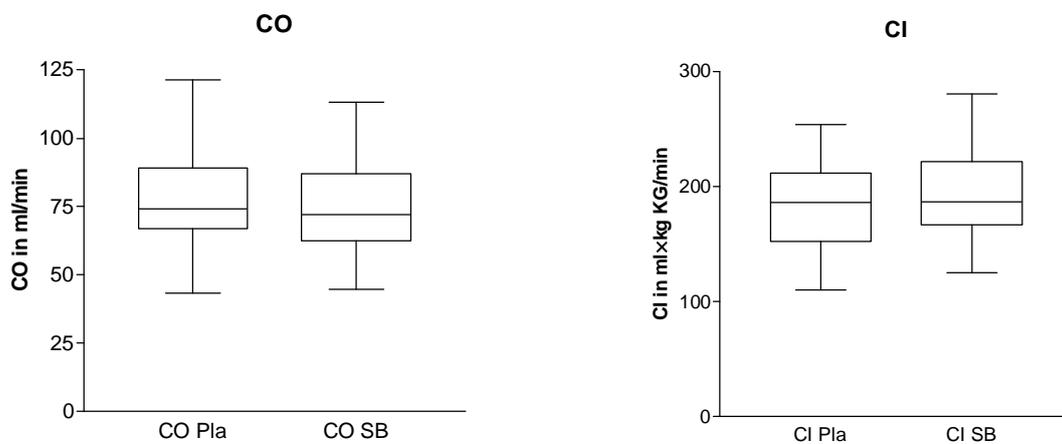


Abb. 23: Cardiac output (CO); Abb. 24: Cardiac index (CI)

#### 4.4.7 Schlagvolumen (SV), Schlagvolumen Index (SVI)

Sowohl beim Schlagvolumen als auch nach Berechnung des Schlagvolumenindex war keine signifikante Abweichung zwischen Placebo- und SB-Tieren zu erkennen.

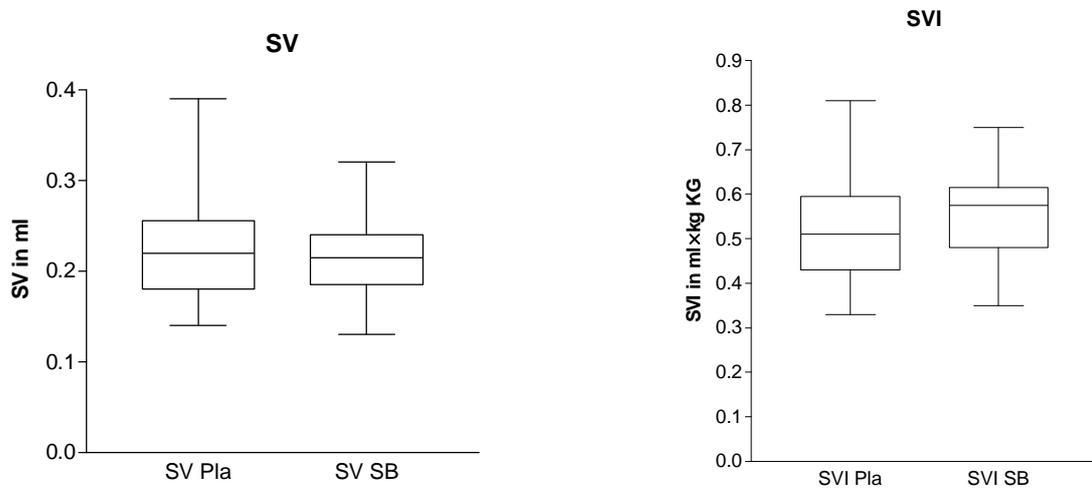


Abb. 25: Schlagvolumen (SV); Abb. 26: Schlagvolumenindex (SVI)

#### 4.4.8 Totaler peripherer Widerstand (TPR), Totaler peripherer Widerstand Index (TPRI)

Der totale periphere Widerstand hatte sich bei den infarzierten Tieren mit SB-Behandlung und ohne Behandlung nicht signifikant unterschiedlich entwickelt. Bezüglich des totalen peripheren Widerstand Index wiesen die behandelten Tiere signifikant niedrigere Werte auf als die unbehandelten ( $p < 0,05$ ).

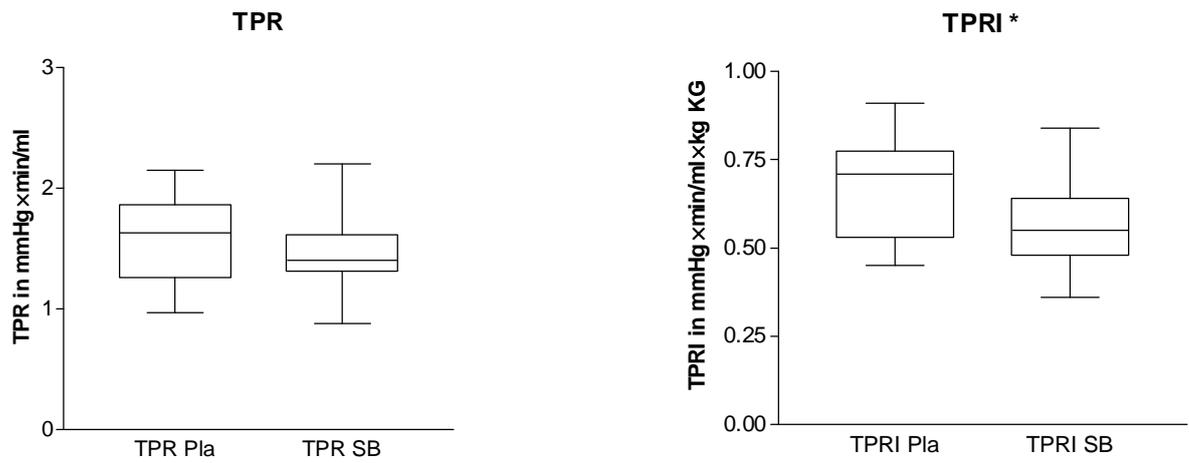


Abb. 26: Totaler peripherer Widerstand (TPR); Abb. 27: Totaler peripherer Widerstand Index (TPRI)

## 5. Diskussion

In dieser Arbeit wurden Aspekte zum Einfluss des p38 MAPK-Inhibitor SB 239063 am infarzierten Rattenherz auf Infarktgröße, Remodeling, Hämodynamik und Herzfunktion untersucht.

Bisherige Studien konnten nachweisen, dass p38 MAPK an der Progression der kardialen Hypertrophie und der chronischen Herzinsuffizienz beteiligt ist.

Die Hypothese, dass durch Inhibition der p38 MAPK eine kardiale Hypertrophie und der Übergang in eine dekompensierte Herzinsuffizienz verhindert werden könnte, konnte in der durchgeführten Studie nicht bestätigt werden.

Für diese Untersuchung diente der experimentelle Myokardinfarkt der Ratte als international anerkanntes Modell zum Studium der Herzinsuffizienz.

Ratten weisen von Tier zu Tier ein sehr ähnliches Koronarsystem mit nahezu fehlender Kollateralisierung auf, so dass bei proximaler Ligatur der linken Koronararterie große Infarkte entstehen, die zur Ausbildung einer Herzinsuffizienz führen.

Die hervorgerufenen Infarkte und hämodynamischen Veränderungen sind denen am Menschen außerordentlich ähnlich, wodurch Rückschlüsse auf die Situation am Menschen mit hoher Trefferwahrscheinlichkeit möglich sind.

Die Infarzierung von Ratten wird als wichtigstes Tiermodell der Herzinsuffizienz angesehen, da ein Großteil der Fälle von Herzinsuffizienz beim Menschen Folgezustand eines oder mehrerer Herzinfarkte ist. Die Sterblichkeit bei der Ratte infolge eines Herzinfarkts entspricht der Sterblichkeit des Menschen nach einem Herzinfarkt.

Die Experimente zur Herzinsuffizienz am Modell der Ratte zeigen deshalb eine hohe klinische Relevanz mit der Möglichkeit einer Übertragung der experimentellen Befunde in die Klinik.

## 5.1 P38 MAPK – SB239063

MAP Kinasen beeinflussen Proliferation, Apoptose, Differenzierung und Migration in verschiedenen Zelltypen. Die spezifische Funktion der MAP Kinasen differiert von Zell- zu Zelltyp und hängt auch vom jeweiligen Stimulus ab<sup>28</sup>.

Die Effekte der p38 MAP Kinase und p38 MAPK Inhibition werden sehr kontrovers diskutiert. Es werden sowohl der Aktivierung als auch der Inaktivierung von p38 MAPK in verschiedenen Studien kardioprotektive Effekte zugeschrieben. Die unterschiedlichen Auswirkungen scheinen davon abhängig zu sein, in welchem physiologischen und pathologischen Zusammenhang die Aktivierung oder Inaktivierung steht und zu welchem Zeitpunkt eine Aktivierung oder Inaktivierung von p38 MAPK stattfindet.

Eine erhöhte p38 MAPK Aktivität konnte bisher sehr kurzfristig (acht Minuten und eine Stunde) nach dem Ischämieereignis und eine abnehmende Aktivität nach einem Tag und einer Woche nachgewiesen werden<sup>16,48</sup>.

Auch im Stadium einer kompensierten Herzinsuffizienz wurde eine erhöhte p38 MAPK-Aktivität gefunden, die mit fortschreitender Herzinsuffizienz abnahm<sup>43</sup>.

P38 MAPK kann entweder das Zellüberleben oder den Zelltod fördern, abhängig davon, ob p38 MAPK durch MKK3 oder MKK6 aktiviert wird<sup>16,55</sup>.

Es konnte beobachtet werden, dass die durch MKK3 hervorgerufene p38 $\alpha$  Aktivierung zu einer myokardialen Zelldysfunktion und zum Zelltod führt<sup>55</sup>.

Eine durch MKK6 hervorgerufene p38 $\alpha$  und p38 $\beta$  Aktivierung hingegen fördert den Zellschutz. MKK6 kann zusätzlich über eine erhöhte Expression von  $\alpha$ BC ( $\alpha$ B-Crystallin), einem kleinen Hitzeschockprotein, das Apoptose reduziert und auf mitochondrialer Ebene zytoprotektiv ist, kardioprotektiv wirken<sup>55</sup>.

Kardioprotektive Effekte, die p38 MAPK zugeschrieben werden können, laufen über eine erhöhte Phosphorylierung von HSP (Hitzeschockprotein) 25/27 unter Aktivierung von p38 MAPK<sup>65,91</sup>. HSP 25/27 wird durch MAPKAP-K2 phosphoryliert, MAPKAP-K2 ist wiederum ein unspezifisches Substrat von p38

MAPK<sup>46</sup>. HSP wirkt vor allem über die Aufrechterhaltung von Aktinfilamenten kardioprotektiv<sup>20</sup>.

In anderen Studien wurde festgestellt, dass die durch Norepinephrin induzierte Apoptose mit einem p38 MAPK-Inhibitor verstärkt wurde. Dementsprechend wurde vermutet, dass die Aktivierung von p38 MAPK als Antwort auf einen Apoptose-Stimulus kardioprotektiv wirkt<sup>37</sup>.

Auf der anderen Seite zeigte sich, dass eine Hemmung der p38 MAPK durch Erniedrigung der PMN (polymorphonuclear leucocytes)-Akkumulation kardioprotektiv wirken kann, da hierdurch die folgende myokardiale Entzündungsreaktion geblockt wird. Trotz allem wird eine multifaktorielle, PMN-abhängige und PMN-unabhängige, Kardioprotektion über Inhibierung von p38 MAPK vermutet<sup>30</sup>.

Desweiteren trägt eine erhöhte Konzentration von TNF- $\alpha$  (Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$ ) zu einer postischämischen myokardialen Dysfunktion bei. TNF- $\alpha$  und andere proinflammatorische Zytokine, wie IL-1 $\beta$  und IL-6, werden vermehrt unter Aktivierung von p38 MAPK ausgeschüttet. Hierbei handelt es sich um einen positiven Feedbackmechanismus, da TNF- $\alpha$  und proinflammatorische Zytokine zur Aktivierung von p38 MAPK führen<sup>40,86</sup>.

Unter Inhibition von p38 MAPK zeigt sich eine verminderte postischämische TNF- $\alpha$ - und Zytokin-Produktion mit Reduktion des kardiomyozytären Zelltods und der kardialen Dysfunktion<sup>2,63</sup>.

Die Relevanz der p38 MAPK Aktivierung bei der Entwicklung der Herzinsuffizienz lässt sich an einem Experiment von *Behr et al. (2001)* ersehen. Hierbei wurde spontan hypertensiven Ratten der p38 MAPK-Inhibitor SB 239063 chronisch mit der Nahrung verabreicht, wodurch die Ausbildung einer myokardialen Hypertrophie und Dekompensation der Herzinsuffizienz in diesem Tiermodell verhindert werden konnte.

Auch andere Versuche zeigten, dass eine Inhibierung der p38 MAP Kinase durch das ältere SB 203580 eine Verzögerung des ischämischen Zelltodes und eine gesteigerte postischämische Herzfunktion herbeiführt<sup>46</sup>.

In einer Arbeit von *Tenhunen et al. (2006)* wird erneut verdeutlicht, dass sich der p38 MAPK Signaltransduktionsmechanismus in der Herzinsuffizienz nach

einem Herzinfarkt von dem Signaltransduktionsmechanismus in der Herzinsuffizienz durch andere kardiovaskuläre Erkrankungen unterscheidet. Hiernach scheint im Herzinfarktmodell eine reduzierte p38 MAPK Aktivität von einem akuten Herzinfarkt zur Herzinsuffizienz zu führen, so dass im frühen Remodelingprozess p38 MAPK eine protektive Rolle einnimmt. Die Arbeitsgruppe sieht das therapeutische Potential von p38 MAPK-Inhibitoren erst zu einem späteren Zeitpunkt gegeben.

SB 239063 ist ein Trans-1-(4-Hydroxycyclohexyl)-4-(4-Fluorophenyl Methoxyimidimidin-4-yl) Imidazol, welches als p38 Inhibitor der zweiten Generation gilt. Das ältere SB 203580<sup>26</sup>, hat unspezifische Aktivität, da es c-Raf mit einer 40-fach höheren  $IC_{50}$  als p38 $\alpha$  inhibiert und paradoxerweise aktiviert<sup>26</sup>. Diese unspezifische Blockade von c-Raf ist bei dem neueren SB 239063 eliminiert worden.

Als weitere Enzyme, die mit p38 Inhibitoren interagieren, wurden Cyclooxygenasen identifiziert<sup>11</sup>. Es ist nicht bekannt, ob auch SB 239063 diese Cyclooxygenasen hemmt.

Da angenommen wird, dass p38 MAPK bis zu mindestens 28 Tagen nach Gefäßverletzung aktiviert bleibt<sup>35</sup>, wurden die Tiere der SB Gruppe 10 Wochen mit Futter, das den MAPK-Inhibitor SB 239063 enthält, gefüttert.

## ***5.2 Einfluss von SB 239063 auf die untersuchten Parameter (Organ- und Körpergewichte, Infarktgröße, Remodeling, Hämodynamik)***

Bei Betrachtung der Körpergewichte der behandelten und unbehandelten Infarkt- und Sham-Tiere wird auffällig, dass alle mit dem MAPK-Inhibitor behandelten Tiere signifikant weniger wiegen als die unbehandelten.

Es wurde während der Versuchsreihe nicht quantifiziert, wie viel Futter die behandelten und die unbehandelten Tiere gefressen haben. Infolgedessen kann keine Aussage getroffen werden, welche Dosis an Pharmakon im Mittel aufgenommen wurde.

Eventuell könnte sich die Zugabe von SB 239063 zu dem Futter auf den Geschmack ausgewirkt haben, so dass die behandelte Gruppe weniger Nahrung zu sich genommen und dadurch an Körpergewicht verloren hat.

Ein anderer Aspekt wäre eine mögliche Toxizität von SB auf den Organismus bei chronischer Einnahme. Hierfür spricht auch die Gewichtsabnahme in der Sham-Gruppe. Allerdings zeigte eine Studie mit spontan hypertensiven Ratten, die ebenfalls oral mit dem p38 MAPK-Inhibitor SB 239063 behandelt wurden, keinen Gewichtsverlust der behandelten Tiere <sup>4</sup>. Von zurzeit bekannten klinischen Studien mit verschiedenen p38 MAPK Hemmern sind bisher als Nebenwirkungen lediglich erhöhte Leberwerte und vereinzelt neurologische Nebenwirkungen beschrieben <sup>5</sup>.

Dass sich die Gewichte der linken und rechten Ventrikel im Vergleich zwischen behandelter und unbehandelter Gruppe nicht signifikant unterscheiden, lässt darauf schließen, dass sich die Behandlung mit SB 239063 nach Myokardinfarkt weder Hypertrophie begünstigend noch Hypertrophie hemmend auf das Herzmuskelgewebe ausgewirkt hat. Dies bestätigt sich unter Einbeziehung der histologischen Untersuchungen.

Die Gewichte der nassen Lungen sind in der behandelten Gruppe signifikant höher. Nach 24h Trocknung der Lungen (Lunge trocken) ist eine Gewichtsangleichung der trockenen Lungen beider Gruppen zu erkennen. Diese Beobachtung wäre mit einer Wasseransammlung in der Lunge zu vereinbaren, die zum Beispiel beim chronischen Lungenödem durch progressive Linksherzinsuffizienz auftritt. Ein chronisches Lungenödem bei progressiver Linksherzinsuffizienz wäre in dem durchgeführten Experiment mit den schlechteren hämodynamischen Werten nach p38 MAPK Inhibition gut erklärt. Möglicherweise kann auch eine Toxizität des Pharmakons auf das Lungengewebe die Ursache einer Wasseransammlung sein.

Die myokardiale Infarktgröße zeigt sich dynamisch, mehrere Stunden nach Myokardinfarzierung findet ein weiterer Verlust von vitalem Herzmuskelgewebe statt (Infarktexpansion). Auch während der folgenden Wochen kann sich die Infarktzone ausdehnen oder kontrahieren. Die Regeneration des Herzmuskels

ist praktisch nicht vorhanden, beschädigtes Herzmuskelgewebe wird durch Narbengewebe ersetzt. Faktoren, die die Wundheilung im Herzmuskelgewebe nach einem Herzinfarkt beeinflussen, sind unter anderem Alter, genetische Prädisposition, Systemerkrankungen, neurohumorale Faktoren, Östrogene, Zytokine, Leukozyten, Chemokine und Matrixmetalloproteine<sup>25</sup>.

Nach Myokardinfarzierung ist eine Limitierung der Apoptose anzustreben. Apoptose bezeichnet den programmierten Zelltod ohne Entzündungszeichen im Gegensatz zur Nekrose, eine Art von Zelltod, bei dem es bedingt durch Noxen zu Zellmembranstörungen und einer lokalen Entzündung kommt.

Durch vermehrte Apoptose von Kardiomyozyten entstehen elektromechanische Störungen einhergehend mit einer verminderten Kontraktilität, wodurch es zu einer progressiven Herzinsuffizienz mit deutlich erweiterten Herzkammern kommen kann<sup>28</sup>.

Auch das kardiale Remodeling, eine Restrukturierung der Kardiomyozyten im Gebiet einer stattgefundenen Apoptose, das durch Fibroseentwicklung, Ventrikelwandausdünnung neben der Infarktzone, Herzkammererweiterung und Hypertrophie der überlebenden Kardiomyozyten charakterisiert ist<sup>17</sup>, begünstigt das Auftreten von elektromechanischen Störungen<sup>27</sup>, im Sinne von Arrhythmien.

Apoptosestimuli in Kardiomyozyten unter in vitro Bedingungen bestehen unter anderem aus Ischämie, Sauerstoffradikalen, Zytokinen, TNF- $\alpha$ , Stickstoffmonoxid, neurohumoralen Faktoren und mechanischem Streß, wie z.B. einer erhöhten Ventrikelwandspannung.

Unter den Apoptosestimuli werden ein oder mehrere intrazelluläre Signaltransduktionsschritte aktiviert, die zu Veränderungen der Genexpression und/oder des Zytoskeletts sowie zu Apoptose, Proliferation oder Differenzierung führen.

Bisher konnte nachgewiesen werden, dass in Tierherzen, in denen p38 MAPK - Phosphorylierung und/oder - Aktivität während der Ischämie erhöht ist, die Infarktgröße unter SB 203580 - Behandlung durch die reduzierte Apoptose vermindert werden kann<sup>54,70</sup>.

Inzwischen gibt es ein Modell von *Kaiser et al. (2004)* mit dominant-negativen p38 $\alpha$ -transgenen Mäusen, an denen gezeigt werden konnte, dass die Inhibierung von p38 $\alpha$  MAPK das Herzmuskelgewebe vor Apoptose und einer Infarktexpansion schützt. Sekundär wird dadurch die myokardiale Funktion aufrechterhalten und das mit Fibrose assoziierte sekundäre Remodeling reduziert.

Allerdings konnte unter kardialer Druckbelastung bei p38 $\alpha$ -knock-out Mäusen eine vermehrte Apoptose mit Entwicklung einer kardialen Dysfunktion und Herzkammerdilatation nachgewiesen werden<sup>58</sup>.

Bei den von uns ausgewerteten histologischen Messungen lässt sich lediglich erkennen, dass sich nach 10 Wochen Behandlung der Infarkttiere mit SB 239063 kein signifikanter Unterschied in Bezug auf Infarktgröße und Entwicklung von hypertrophem Herzmuskelgewebe im Vergleich zu unbehandelten Tieren zeigte. Dieses Ergebnis wurde ebenfalls durch die Messung der Ventrikelgewichte bestätigt, bei der sich kein signifikanter Unterschied zwischen behandelten und unbehandelten Tieren ergab.

Im Vergleich zur Sham-Gruppe zeigt sich im untersuchten Model eine Entwicklung zur Hypertrophie. Die Entwicklung zu hypertrophem Herzmuskelgewebe in Nachbarschaft zu ischämischem Gewebe ist eine physiologische Antwort, um die kontraktile Kapazität der nekrotisierten Zellen auszugleichen und die kardiale Pumpfunktion aufrecht zu erhalten<sup>9</sup>. Kurzfristig profitiert die Herzfunktion von diesen strukturellen Veränderungen, auf lange Sicht haben diese Veränderungen jedoch eine funktionelle Verschlechterung des Herzens zur Folge mit Arrhythmien, Herzinsuffizienz und plötzlichem Herztod<sup>12</sup>.

P38 MAPK scheint *in vitro* weniger an der Stimulation der Hypertrophie als an der Aufrechterhaltung der hypertrophen Antwort beteiligt zu sein<sup>20</sup>. Durch die Behandlung mit SB 239063 hätte diese Wirkung verhindert werden müssen, so wie es auch beschrieben ist, dass durch Blockade von p38 MAPK mit SB 203580 in einer myokardialen Zellkultur einer Herzhypertrophie entgegengewirkt werden kann<sup>91</sup>.

Allerdings wurde ebenfalls an dem Modell mit den transgenen dominant-negativen p38 $\alpha$ - Mäusen festgestellt <sup>37</sup>, dass die transgenen Mäuse in einem Alter von 8-12 Wochen Zeichen einer spontan entwickelten Herzhypertrophie zeigten.

*In vitro* Studien zur Herzhypertrophie unter Blockade von p38 MAPK lassen keine Aussagen über die *in vivo* Dauerbehandlung zu.

Eine prohypertrophische Rolle in neonatalen myokardialen Zellkulturen und eine antihypertrophische Funktion in adulten Myozyten von p38 MAPK könnte durch eine unterschiedliche zelluläre Lokalisation von MKK6 und p38 $\alpha$  in neonatalen und adulten Myozyten erklärt werden. In neonatalen Kardiomyozyten sind MKK6 und p38 $\alpha$  gleichmäßig im Zytoplasma verteilt, wohingegen sie in adulten Kardiomyozyten an T-Tubuli und Z-Scheiben lokalisiert sind <sup>49</sup>.

Aus unseren Daten war zu folgern, dass eine 10-wöchige Blockade von p38 MAPK mit SB 239063 sofort nach Myokardinfarkt gegeben, ohne preconditioning *in vivo*, keinen signifikanten positiven oder negativen Effekt auf die Entwicklung der Infarktgröße und das Remodeling hatte.

Mit Hilfe der hämodynamischen Messungen war zu erkennen, dass die behandelten Infarkttiere signifikant niedrigere systolische, diastolische und mittlere arterielle Drücke gegenüber den Placebotieren aufweisen.

Die Wirkung auf die arteriellen Drücke nach Behandlung eines Myokardinfarktes mit dem p38 MAPK-Hemmer SB 239063 ist möglicherweise auf eine positive Beeinflussung der p38 MAPK Blockade auf das Endothel zurückzuführen, was auch in anderen Experimenten mit hypertensiven Ratten <sup>4</sup> nachgewiesen werden konnte.

Bei der Untersuchung der Endothelfunktion, der in unserem Experiment verwendeten Tiere, bestätigt sich nach *Widder et al. (2004)*, dass unter Blockade von p38 MAPK nach Myokardinfarkt einer endothelialen Dysfunktion vorgebeugt werden konnte. Eine endotheliale Dysfunktion geht normalerweise mit einer erhöhten Superoxidanionenproduktion und nachfolgender reduzierter NO-Verfügbarkeit einher. Durch die Behandlung mit SB 239063 fand eine

verminderte Superoxidanionenproduktion statt, wodurch der endotheliale Schutz erklärt wird.

Alle weiteren Messungen der Hämodynamik zeigten bei den behandelten Tieren im Vergleich zu den Placebotieren keine positiven Ergebnisse im Sinne einer verbesserten Herzfunktion.

Möglicherweise kamen die negativen myokardialen Wirkungen nicht zur vollständigen Ausprägung, da sie von den positiven Effekten auf das Endothel ausgeglichen oder überlagert wurden.

Da andere Studien bereits gezeigt haben <sup>54</sup>, dass der Zeitpunkt der Pharmakogabe ebenfalls eine Rolle spielt, bleibt fraglich, ob eine Gabe von SB 239063 kurze Zeit vor und / oder nur kurze Zeit nach Infarzierung andere Effekte auf die Herzfunktion gehabt hätte.

### **5.3 Mögliche Erklärungen für die widerlegte Hypothese**

Der eingesetzte p38 MAPK Inhibitor SB 239063 ist ein hoch selektiver Inhibitor der zweiten Generation (IC<sub>50</sub> für p38 Inhibition von 0,044 µM; ERK 1/2 > 10 µM). Jedoch ist SB 239063 nicht für eine Isoform spezifisch.

Die p38 MAP Kinase besteht in Kardiomyozyten aus den Isoformen p38α und p38β. Die Isoformen zeigten in bisherigen Experimenten unterschiedliche Funktionen, p38α vermittelt pro-apoptotische und p38β anti-apoptotische und hypertrophische Signale <sup>1,24,32</sup>.

In einem Modell mit dominant-negativen p38α-transgenen Mäusen wurde nach einer Myokardinfarzierung das Herzgewebe vor Apoptose und Infarktexpansion geschützt <sup>37</sup>.

Die fehlende Isoform-Spezifität könnte in unserem Experiment zu abweichenden Ergebnissen geführt haben.

Zusätzlich zu der Isoform-Spezifität muß die Artspezifität von Effekten berücksichtigt werden. Die Versuche mit den dominant-negativen p38α-transgenen Mäusen zeigen positive Effekte auf das Herzgewebe <sup>37</sup>,

wohingegen bei Schweinen keine reduzierte Ischämie unter Behandlung von SB 239063 beobachtet werden konnte<sup>38</sup>.

Aufgrund der artspezifischen Wirkung kann somit kein Rückschluss aus den vorherigen Ergebnissen mit unterschiedlichen Tiermodellen auf das Rattenmodell gezogen werden.

Des Weiteren kommt dem genauen Zeitpunkt des Einsatzes eines MAPK Inhibitors große Bedeutung zu. In verschiedenen Studien wurde die Behandlung mit einem MAPK Inhibitor vor, bzw. kurz nach einem Herzinfarkt, oder unter den Bedingungen einer Angina pectoris (pre-conditioning) durchgeführt. Positive Effekte zeigten sich bei einer frühen Behandlung vor der myokardialen Ischämie oder unter den experimentellen Bedingungen eines Pre-conditioning<sup>2,54</sup>. Gegebenenfalls hätte ein anderer Zeitpunkt der Pharmakongabe zu unterschiedlichen Resultaten geführt.

Da während der Studie keine Quantifizierung der Pharmakonaufnahme gemacht wurde, kann eine dosisabhängige Wirkung des Pharmakons zu unerwarteten Ergebnissen geführt haben<sup>50</sup>, wodurch die valide Auswertung der Ergebnisse erschwert wird.

Neben den verschiedenen Aspekten zu dem verwendeten Pharmakon ist in unserem Model ebenfalls die Myokardinfarktchirurgie kritisch zu werten. Die initiale Infarktgröße der behandelten und nicht behandelten Tiere müsste vergleichbar groß sein, um nach der Behandlung Aussagen über die Entwicklung der Hämodynamik und des Remodelings treffen zu können. Eine Standardisierung kann über die Messung der Infarktgröße mittels Echokardiographie nach chirurgischer Myokardischämie erreicht werden. In unserem Model wurden die Tiere erst nach der Behandlung anhand der histologischen Myokardinfarktgröße in vergleichbare Infarktgruppen eingeteilt, so dass ein bereits stattgefundenes, womöglich unterschiedliches, kardiales Remodeling unberücksichtigt blieb<sup>67</sup>.

Im Vergleich mit anderen Studien muss zusätzlich der pathophysiologische Zusammenhang des Einsatzes eines p38 MAPK-Inhibitors berücksichtigt werden, das heißt, ob es sich um ein Herzinsuffizienzmodell im Rahmen eines stattgefundenen Myokardinfarkts oder im Rahmen anderer kardiovaskulärer Erkrankungen handelt. Neuere Studienergebnisse lassen im Initialstadium bei letaler kardialer Ischämie einen protektiven Effekt von p38 MAPK durch einen antiapoptotischen und angiogenetischen Mechanismus vermuten<sup>66,80</sup>.

Trotzdem bleibt die Funktion von p38 MAPK in der Herzinsuffizienz sehr kontrovers diskutiert, da auf der einen Seite die Inhibition der p38 MAPK Aktivität mit weniger Apoptose, Remodeling und verbesserter Herzfunktion beschrieben wird und auf der anderen Seite eine Aktivierung von p38 MAPK z.B. über die HSP-Phosphorylierung kardioprotektiv wirkt<sup>84</sup>.

Letztendlich ist zu bedenken, dass das kardiale Remodeling höchstwahrscheinlich multifaktoriell bedingt ist und unter anderem durch die linksventrikuläre Funktion, die Apoptose, die myozoytäre Regeneration, die neurohumorale Aktivierung und die inflammatorische Aktivität beeinflusst wird<sup>29</sup>. In dem durchgeführten Experiment wurde jedoch nur ein Teilaspekt betrachtet und weitere Faktoren nicht näher untersucht.

#### **5.4 Ausblick**

Die in diesen Untersuchungen gewonnenen Erkenntnisse über die Auswirkungen der Gabe von SB 239063 als p38 MAP Kinase Inhibitor nach Myokardinfarkt im Rattenmodell widerlegen die Hypothese, dass die Hemmung von p38 MAPK nach einem Herzinfarkt die linksventrikuläre Funktion und das kardiale Remodeling verbessern können.

Gründe für dieses Ergebnis können unter anderem in dem Zeitpunkt der Pharmakongabe, der Spezifität des Pharmakons, sowie der Artspezifität von Effekten liegen<sup>29</sup>.

Um bessere Aussagen über den Wirkmechanismus von p38 MAPK machen zu können, wäre es sinnvoll, die verschiedenen Inhibitoren der Kinase spezifischer für eine Isoform der Kinase zu entwickeln, so dass die Möglichkeit gegeben wird, apoptotische und hypertrophische Signale genauer zu steuern<sup>1, 24,27,32</sup>.

Weitere Studien zu den Inhibitoren könnten zur Aufklärung der Dosis-Wirkungs-Beziehungen<sup>50</sup> führen und somit den Einsatz des Pharmakons erleichtern und eine größere Transparenz der Ergebnisse schaffen.

Jedoch sind viele Effekte der Inhibitoren artspezifisch und können daher in unterschiedlichen Tiermodellen zu unterschiedlichen Ergebnissen führen.

In *in vivo* Tierexperimenten konnte inzwischen nachgewiesen werden, dass eine Blockade der p38 MAPK positive Effekte auf das Endothel hat<sup>87</sup>. Das Endothel stellt einen wichtigen therapeutischen Ansatzpunkt dar, da eine Normalisierung der endothelialen Funktion den vaskulären Widerstand reduziert und sowohl die Elastizität der Arterienwände als auch die Gewebedurchblutung erhöht. Daher könnte dies als therapeutischer Ansatz für Hypertoniepatienten und andere Patienten mit Gefäßerkrankungen gewertet werden.

## 6. Zusammenfassung

Verschiedene Stressfaktoren, wie z. B. mechanische Belastung, Druckbelastung, hyperosmotisches Ungleichgewicht, oxidativer Stress, Ischämie, Reperfusion, Preconditioning, Wachstumsfaktoren und Zytokine bewirken alle eine p38 MAPK Aktivierung im Herzmuskel.

In dieser Arbeit wurden die Effekte einer Blockade von p38 MAPK durch SB 239063 über einen Zeitraum von 10 Wochen nach Myokardinfarzierung am Tiermodell der Ratte untersucht.

Im Hinblick auf Remodeling und Entwicklung der Infarktgröße wurde beobachtet, dass die zehnwöchige Gabe eines p38 MAPK Inhibitors nach Myokardinfarzierung, entgegen den bisher in der Literatur veröffentlichten Ergebnissen, keinen signifikanten Einfluss auf strukturelle Veränderungen am Myokard der Ratte hat.

Bezüglich der Untersuchungen zur Hämodynamik wiesen die behandelten Tiere eine Tendenz zu einer verschlechterten Herzfunktion auf.

Insgesamt zeigen die ermittelten Daten eine indifferente und zum Teil negative Auswirkung von SB 239063 bei chronischer Gabe auf das kardiale Remodeling und die Herzfunktion, hingegen einen positiven Effekt am Endothel.

Diskussionswürdig blieben jedoch weiterhin Faktoren wie eine dosisabhängige Wirkung, eine höhere Spezifität des Pharmakons sowie der genaue Zeitpunkt und pathophysiologische Zusammenhang der Pharmakongabe.

## 7. Literaturverzeichnis

1. Adams JW, Sakata Y, Davis MG, Sah VP, Wang YB, Liggett SB, Chien KR, Brown JH, Dorn GW: Enhanced  $\alpha$ -q signaling - a common pathway mediates cardiac hypertrophy and apoptotic heart failure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (1998) 95:10140-10145.
2. Barancik M, Htun P, Strohm C, Kilian S, Schaper W: Inhibition of the cardiac p38-MAPK pathway by SB 203580 delays ischemic cell death. *J Cardiovasc Pharmacol* (2000) 35(3): 474-483
3. Behr TM, Nerurkar SS, Nelson AH, Lee JC, Sisko J, Sackner-Bernstein JD, Willette RN: Sustained activation of cardiac p38 mitogen activated protein kinase in the development of heart failure: premature mortality is abolished by chronic p38 inhibition in a rat model of cardiac hypertrophy and failure. *Circulation*, October, Suppl. (2000)  
Ref Type: Abstract
4. Behr TM, Nerurkar SS, Nelson AH, Coatney RW, Woods T, Sulpizio A, Chandra S, Olzynski A, Kumar S, Brooks D, Ohlstein EH, Angermann CE, Adams JL, Sisko J, Sackner-Bernstein JD, Willette RN: Hypertensive end-organ damage and premature mortality are p38 MAPK dependent in a rat model of cardiac hypertrophy and failure. *Circulation* (2001);104:1292-1298
5. Behr TM, Berova M, Doe CP, Ju H, Angermann CE, Boehm J, Willette RN: p38 mitogen-activated protein kinase inhibitors for the treatment of chronic cardiovascular disease. *Curr Op Invest Drugs* (2003) 4(9):1059-1064
6. Bogoyevitch MA, Glennon PE, Andersson MB, Clerk A, Lazou A, Marshall CJ, Parker PJ, Sugden PH: Endothelin-1 and fibroblast growth factors stimulate the mitogen-activated protein kinase signaling cascade in cardiac myocytes - the potential role of the cascade in the integration of 2 signaling pathways leading to myocyte hypertrophy. *Journal of Biological Chemistry* (1994) 269:1110-1119.
7. Bogoyevitch MA, Ketterman AJ, Sugden PH: Cellular stresses differentially activate c-jun n-terminal protein kinases and extracellular signal-regulated protein kinases in cultured ventricular myocytes. *Journal of Biological Chemistry* (1995) 270:29710-29717.
8. Bogoyevitch MA, Andersson MB, Gillespiebrown J, Clerk A, Glennon PE, Fuller SJ, Sugden PH: Adrenergic receptor stimulation of the mitogen-

activated protein kinase cascade and cardiac hypertrophy. *Biochemical Journal* (1996) 314:115-121.

9. Bogoyevitch MA, Gillespie-Brown J, Ketterman AJ, Fuller SJ, Ben-Levy R, Ashworth A, Marshall CJ, Sugden PH: Stimulation of the stress-activated mitogen-activated protein kinase subfamilies in perfused heart. P38/Rk mitogen-activated protein kinases and c-Jun N-terminal kinases are activated by ischemia/reperfusion. *Circ Res* (1996) 79(2):162-173
10. Bogoyevitch MA: Signalling via stress-activated mitogen-activated protein kinases in the cardiovascular system. [Review] [150 refs]. *Cardiovascular Research* (2000) 45:826-842.
11. Borschhaubold AG, Pasquet S, Watson SP: Direct inhibition of cyclooxygenase-1 and -2 by the kinase inhibitors sb 203580 and pd 98059 – sb 203580 also inhibits thromboxane synthase. *Journal of Biological Chemistry* (1998); 273:28766-28772
12. Braz, JC, Bueno OF, Liang Q, Wilkins BJ, Dai YS, Parsons S, Braunwart J, Glascock BJ, Klevitsky R, Kimball TF, Hewett TE et al: Targeted inhibition of p38 MAPK promotes hypertrophic cardiomyopathy through upregulation of calcineurin-NFAT signaling. *J Clin Invest* (2003) 111(10):1475-1486
13. Bristow MR: Pathophysiologic and pharmacologic rationales for clinical management of chronic heart failure with beta-blocking agents. [Review] [122 refs]. *American Journal of Cardiology* (1993) 71:12C-22C.
14. Bristow MR: Why does the myocardium fail? Insights from basic science. [Review] [88 refs]. *Lancet* (1998) 352 Suppl 1:S18-14.
15. Cain BS, Meldrum DR, Meng XZ, Dinarello CA, Shames BD, Banerjee A, Harken AH: p38 MAPK inhibition decreases TNF-alpha production and enhances postischemic human myocardial function. *Journal of Surgical Research* (1999) 83:7-12.
16. Clark JE, Flavell RA, Faircloth ME, Davis RJ, Heads RJ, Marber MS: Post-infarction remodeling is independent of mitogen activated protein kinase kinase 3 (MKK3). *Cardiovasc Res* (2007) 74(3):466-470
17. Clark JE, Sarafraz N, Marber MS: Potential of p38 MAPK inhibitors in the treatment of ischemic heart disease. *Pharmacol Therap* (2007) 116:192-206
18. Clerk A, Sugden PH: Mitogen-activated protein kinases are activated by oxidative stress and cytokines in neonatal rat ventricular myocytes. *Biochemical Society Transactions* (1997) 25:S.

19. Clerk A, Sugden PH: Activation of p21-activated protein kinase alpha (Alpha-pak) By hyperosmotic shock in neonatal ventricular myocytes. *FEBS Letters* (1997) 403:23-25.
20. Clerk A, Michael A, Sugden PH: Stimulation of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in neonatal rat ventricular myocytes by the G protein-coupled receptor agonists, endothelin-1 and phenylephrine - a role in cardiac myocyte hypertrophy. *Journal of Cell Biology* (1998) 142:523-535.
21. Clerk A, Michael A, Sugden PH: Stimulation of multiple mitogen-activated protein kinase sub-families by oxidative stress and phosphorylation of the small heat shock protein, hsp25/27, in neonatal ventricular myocytes. *Biochemical Journal* (1998) 333:581-589.
22. Clerk A, Harrison JG, Long CS, Sugden PH: Pro-inflammatory cytokines stimulate mitogen-activated protein kinase subfamilies, increase phosphorylation of c-Jun and ATF2 and upregulate c-Jun protein in neonatal rat ventricular myocytes. *Journal of Molecular & Cellular Cardiology* (1999) 31:2087-2099.
23. Clerk A, Sugden PH: Activation of protein kinase cascades in the heart by hypertrophic G protein-coupled receptor agonists. *American Journal of Cardiology* (1999) 83:64H-69H.
24. Dorn GW, Brown JH: Gq signaling in cardiac adaptation and maladaptation. *Trends in Cardiovascular Medicine* (1999) 9:26-34.
25. Ertl G, Frantz S: Healing after myocardial infarction. *Rev. Cardiovasc Res* (2005) 66:22-32
26. Evers PA, van d, I, Quinlan RA, Goedert M, Cohen P: Use of a drug-resistant mutant of stress-activated protein kinase 2a/p38 to validate the in vivo specificity of SE 203580. *FEBS Letters* (1999) 451:191-196.
27. Feuerstein GZ: Apoptosis in cardiac diseases - New opportunities for novel therapeutics for heart diseases. *Cardiovascular Drugs & Therapy* (1999) 13:289-294.
28. Feuerstein GZ, Young PR: Apoptosis in cardiac diseases: stress- and mitogen-activated signaling pathways [Review]. *Cardiovasc. Res* (2000)45: 560-569
29. Frantz S, Behr T, Hu K, Fraccarollo D, Strotmann J, Goldberg E, Ertl G, Angermann CE, Bauersachs J: Role of p38 mitogen activated protein kinase in cardiac remodeling. *Br J Pharmacol* (2007) 150(2): 130-5
30. Gao F, Yue TL, Shi DW, Christopher TA, Lopez BL, Ohlstein EH, Barone FC, Ma XL: p38 MAPK inhibition reduces myocardial reperfusion injury via

inhibition of endothelial adhesion molecule expression and blockade of PNM accumulation. *Cardiovasc Res* (2002) 53(2):414-422

31. Garg R, Packer M, Pitt B, Yusuf S: Heart failure in the 1990s: evolution of a major public health problem in cardiovascular medicine. *Journal of the American College of Cardiology* (1993) 22:3A-5A.
32. Haq SA, Clerk A, Sugden PH: Activation of mitogen-activated protein kinases (P38-mapks, sapks/jnks and erks) By adenosine in the perfused rat heart. *FEBS Letters* (1998) 434:305-308.
33. He Q, LaPointe MC: Interleukin-1 beta regulation of the human brain natriuretic peptide promoter involves Ras-, Rac-, and p38 kinase-dependent pathways in cardiac myocytes. *Hypertension* (1999) 33:283-289.
34. Izumi Y, Kim S, Murakami T, Yamanaka S, Iwao H: Cardiac mitogen-activated protein kinase activities are chronically increased in stroke-prone hypertensive rats. *Hypertension* (1998) 31:50-56.
35. Ju H, Nerurkar S, Sauermelch CF, Olzinski AR, Mirabile R, Zimmerman D, Lee JC, Adams J, Sisko J, Berova M, Wilette RN: Sustained activation of p38 mitogen.activated protein kinase contributes to the vascular response to injury. *J Pharmacol Exp Ther* (2002) 301(1):15-20
36. Kaddoura S, Firth JD, Boheler KR, Sugden PH, Poolewilson PA: Endothelin-1 is involved in norepinephrine-induced ventricular hypertrophy in vivo acute effects of bosentan, an orally active, mixed endothelin et(A) And et(B) Receptor antagonist. *Circulation* (1996) 93:2068-2079.
37. Kaiser RA, Bueno OF, Lips DJ, Doevendans PA, Jones F, Kimball TF, Molkentin JD: Targeted inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase antagonizes cardiac injury and cell death following ischemia-reperfusion in vivo. *J Biol Chem.*(2004) 279(15):15524-15530
38. Kaiser RA, Lyons JM, Duffy JY, Wagner CJ, McLean KM, O'Neill TP, Pearl JM, Molkentin JD: Inhibition of p38 reduces myocardial infarction injury in the mouse but not pig following ischemia-reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* (2005) 289: 2747-2751
39. Kang YJ, Zhou ZX, Wang GW, Buridi A, Klein JB: Suppression by metallothionein of doxorubicin-induced cardiomyocyte apoptosis through inhibition of p38 mitogen-activated protein kinases. *Journal of Biological Chemistry* (2000) 275:13690-13698.
40. Kerkela R, Force T: p38 mitogen-activated protein kinase: a future target for heart failure therapy? *J Am Coll Cardiol* (2006) 48:556-558

41. Kim SO, Xu YJ, Katz S, Pelech S: Cyclic GMP-dependent and - independent regulation of MAP kinases by sodium nitroprusside in isolated cardiomyocytes. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* (2000) 1496:277-284.
42. Kusuvara M, Takahashi E, Peterson TE, Abe J, Ishida M, Han J, Ulevitch R, Berk BC: P38 kinase is a negative regulator of angiotensin ii signal transduction in vascular smooth muscle cells - effects on na<sup>+</sup>/h<sup>+</sup> exchange and erk1/2. *Circulation Research* (1998) 83:824-831.
43. Kyoji S, Otani H, Matsuhisa S, Akita Y, Tatsumi K, Enoki C, Fujiwara H, Imamura H, Kamikata H, Iwasaka T: Opposing effect of p38 MAP kinase and JNK inhibitors on the development of heart failure in the cardiomyopathic hamster. *Cardiovasc Res* (2006) 69:888-898
44. Kyriakis JM, Avruch J: Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev* (2001) 81: 807-69
45. Lazou A, Sugden PH, Clerk A: Activation of mitogen-activated protein kinases (P38-mapks, sapks/jnks and erks) By the g-protein-coupled receptor agonist phenylephrine in the perfused rat heart. *Biochemical Journal* (1998) 332:459-465.
46. Lemke LE, Bloem LJ, Fouts R, Esterman M, Sandusky G, Vlahos CJ: Decreased p38 MAPK activity in end-stage failing human myocardium: p38 MAPK $\alpha$  is the predominant isoform expressed in human heart. *J Mol Cell Cardiol* (2001) 33(8):1527-1540
47. Li CH, Hu YH, Mayr M, Xu QB: Cyclic strain stress-induced mitogen-activated protein kinase (MAPK) phosphatase 1 expression in vascular smooth muscle cells is regulated by Ras/Rac-MAPK pathways. *Journal of Biological Chemistry* (1999) 274:25273-25280.
48. Luss H, Neumann J, Schmitz W, Schulz R, Heusch G: The stress-responsive MAPKinase p38 is activated by low flow ischemia in the in situ porcine heart. *J Mol Cell Cardiol* (2000) 32(10):1787-1794
49. Liang Q, Molkenin JD: Redefining the roles of p38 and JNK signaling in cardiac hypertrophy: dichotomy between cultured myocytes and animal models. *J Mol Cell Cardiol* (2003) 35:1385-1394
50. Liao P, Wang SQ, Wang S, Zheng M, Zheng M, Zhang SJ, Cheng H, Wang Y, Xiao RP: p38 mitogen-activated protein kinase mediates a negative inotropic effect in cardiac myocytes. *Circ Res* (2002) 90:190-1
51. Ma XL, Kumar S, Gao F, Loudon CS, Lopez BL, Christopher TA, Wang CL, Lee JC, Feuerstein GZ, Yue TL: Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase decreases cardiomyocyte apoptosis and improves cardiac

- function after myocardial ischemia and reperfusion. *Circulation* (1999) 99:1685-1691.
52. Mackay K, Mochly-Rosen D: An inhibitor of p38 mitogen-activated protein kinase protects neonatal cardiac myocytes from ischemia. *Journal of Biological Chemistry* (1999) 274:6272-6279.
  53. Mann DL, Young JB: Basic mechanisms in congestive heart failure. Recognizing the role of proinflammatory cytokines. [Review] [73 refs]. *Chest* (1994) 105:897-904.
  54. Marais E, Genade S, Strijdom H, Moolman JA, Lochner A: p38 MAPK activation triggers pharmacologically-induced  $\beta$ -adrenergic preconditioning, but not ischaemic preconditioning. *J Mol Cell Cardiol* (2001) 33(12):2157-2177
  55. Martindale JJ, Wall JA, Martinez-Longoria DM, Aryal P, Rockman HA, Guo Y, Bolli R, Glembotski CC: Overexpression of MAPKK6 in the heart improves functional recovery from ischemia in vitro and protects against myocardial infarction in vivo. *J Biol Chem* (2005) 280:669-676
  56. Mizukami Y, Kobayashi S, Uberall F, Hellbert K, Kobayashi N, Yoshida K: Nuclear mitogen-activated protein kinase activation by protein kinase C zeta during reoxygenation after ischemic hypoxia. *Journal of Biological Chemistry* (2000) 275:19921-19927.
  57. Muller E, Burger-Kentischer A, Neuhofer W, Fraek ML, Marz J, Thureau K, Beck FX: Possible involvement of heat shock protein 25 in the angiotensin II-induced glomerular mesangial cell contraction via p38 MAP kinase. *Journal of Cellular Physiology* (1999) 181:462-469.
  58. Nishida K, Yamaguchi O, Hirotsu S, Hikoso S, Higuchi Y, Watanabe T, Takeda T, Osuka S, Morita T, Kondoh G, Uno Y, Kashiwase K, Taniike M, Nakai A, Matsumura Y, Miyazaki J, Sudo T, Hongo K, Kusakari Y, Kurihara S, Chien KR, Takeda J, Heori M, Otsu K: p38 $\alpha$  mitogen-activated protein kinase plays a critical role in cardiomyocyte survival but not in cardiac hypertrophic growth in response to pressure overload. *Mol Cell Biol* (2004) 24:10611-10620
  59. Ohnaka K, Numaguchi K, Yamakawa T, Inagami T: Induction of cyclooxygenase-2 by angiotensin II in cultured rat vascular smooth muscle cells. *Hypertension* (2000) 35:68-75.
  60. Packer M: The neurohormonal hypothesis: a theory to explain the mechanism of disease progression in heart failure [editorial]. *Journal of the American College of Cardiology* (1992) 20:248-254.

61. Packer M: How should physicians view heart failure? The philosophical and physiological evolution of three conceptual models of the disease. [Review] [108 refs]. *American Journal of Cardiology* (1993) 71:3C-11C.
62. Packer M: Beta-blockade in heart failure. Basic concepts and clinical results. [Review] [98 refs]. *American Journal of Hypertension* (1998) 11:23S-37S.
63. Parasampuria DA, de Boer P, Desai-Krieger D, Chow AT, Jones CR: Single-dose pharmacokinetics and pharmacodynamics of RWJ 67657 a specific p38 MAPK-inhibitor: a first in-human-study. *J Clin Pharmacol* (2003) 43:406-413
64. Pitt B, Zannad F, Remme WJ, Cody R, Castaigne A, Perez A, Palensky J, Wittes J: The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators [see comments]. *New England Journal of Medicine* (1999) 341:709-717.
65. Rafiee P, Shi Y, Kong X, Pritchard KAJ r, Tweddell JS, Litwin SB, Mussatto K, Jaquis RD, Su J, Baker JE: Activation of protein kinases in chronically hypoxic infant human hearts: Role in cardioprotection. *Circulation* (2002) 106(2):239-245
66. Ravingerova T, Barancik M, Strniskova M: Mitogen activated protein kinases: A new therapeutic target in cardiac pathology. *Mol Cell Biochem* (2003) 247:127-138
67. Ren J, Zhang S, Kovacs A, Wang Y, Muslin AJ: Role of p38alpha MAPK in cardiac apoptosis and remodeling after myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol* (2005) 38:617-623
68. Ruwhof C, van der LA: Mechanical stress-induced cardiac hypertrophy: mechanisms and signal transduction pathways. *Cardiovascular Research* (2000) 47:23-37.
69. Sadoshima J, Izumo S: Molecular characterization of angiotensin II--induced hypertrophy of cardiac myocytes and hyperplasia of cardiac fibroblasts. Critical role of the AT1 receptor subtype. *Circulation Research* (1993) 73:413-423.
70. Schulz R, Belosjorow S, Gres P, Jansen J, Michel MC, Heusch G: p38 MAP kinase is a mediator of ischemic preconditioning in pigs. *Cardiovasc Res* (2002) 55(3):690-700
71. Shubeita HE, Mcdonough PM, Harris AN, Knowlton KU, Glembotski CC, Brown JH, Chien KR: Endothelin induction of inositol phospholipid hydrolysis, sarcomere assembly, and cardiac gene expression in

- ventricular myocytes. A paracrine mechanism for myocardial cell hypertrophy. *Journal of Biological Chemistry* (1990) 265:20555-20562.
72. Simpson P, McGrath A, Savion S: Myocyte hypertrophy in neonatal rat heart cultures and its regulation by serum and by catecholamines. *Circulation Research* (1982) 51:787-801.
  73. Simpson P: Norepinephrine-stimulated hypertrophy of cultured rat myocardial cells is an alpha 1 adrenergic response. *Journal of Clinical Investigation* (1983) 72:732-738.
  74. Sugden PH, Bogoyevitch MA: Intracellular signalling through protein kinases in the heart [Review]. *Cardiovascular Research* (1995) 30:478-492.
  75. Sugden PH, Bogoyevitch MA: Endothelin-1-dependent signaling pathways in the myocardium. *Trends in Cardiovascular Medicine* (1996) 6:87-94.
  76. Sugden PH, Clerk A: Regulation of the erk subgroup of map kinase cascades through g protein-coupled receptors [Review]. *Cellular Signalling* (1997) 9:337-351.
  77. Sugden PH, Fuller SJ, Michael A, Clerk A: Activation of mitogen-activated protein kinase subfamilies by oxidative stress in the perfused rat heart. *Biochemical Society Transactions* (1997) 25:S.
  78. Sugden PH, Clerk A: Cellular mechanisms of cardiac hypertrophy [Review]. *Journal of Molecular Medicine-Jmm* (1998) 76:725-746.
  79. Sugden PH: Signaling in myocardial hypertrophy - Life after calcineurin? [Review]. *Circulation Research* (1999) 84:633-646.
  80. Tenhunen O, Soini Y, Ilves M, Rysä J, Tuukkanen J, Serpi R, Pennanen H, Ruskoako H, Leskinen H: P38 kinase recues failing myocardium after myocardial infarction: evidence for angiogenic and anti-apoptotic mechanisms. *FASEB J* (2006) 20:E1276-E1286
  81. Ueyama T, Kawashima S, Sakoda T, Rikitake Y, Ishida T, Kawai M, Namiki M, Yokoyama M: Endothelin-1 activates p38 mitogen-activated protein kinase via endothelin-A receptor in rat myocardial cells. *Molecular & Cellular Biochemistry* (1999) 199:119-124.
  82. Underwood DC, Osborn RR, Kotzer CJ, Adams JL, Lee JC, Webb EF, Carpenter DC, Bochnowicz S, Thomas HC, Hay DWP, Griswold DE: SB 239063, a potent p38 MAP kinase inhibitor, reduces inflammatory cytokine production, airways eosinophil infiltration, and persistence. *Journal of Pharmacology & Experimental Therapeutics* (2000) 293:281-288.
  83. Ushiofukai M, Alexander RW, Akers M, Griendling KK: P38 mitogen-activated protein kinase is a critical component of the redox-sensitive

- signaling pathways activated by angiotensin II – role in vascular smooth muscle cell hypertrophy. *Journal of Biological Chemistry* (1998) 273:15022-15029.
84. Wang Y: Mitogen-activated protein kinases in heart development and diseases. *Circulation* (2007) 116:1413-1423
85. Wang YB, Huang SA, Sah VP, Ross J, Brown JH, Han JH, Chien KR: Cardiac muscle cell hypertrophy and apoptosis induced by distinct members of the p38 mitogen-activated protein kinase family. *Journal of Biological Chemistry* (1998) 273:2161-2168.
86. Wang M, Tsai BM, Turrentine MW, Mahomed Y, Brown JW, Meldrum DR: P38 mitogen activated protein kinase mediates both death signaling and functional depression in the heart. *Ann Thorac Surg* (2005) 80(6):2235-2241
87. Widder J, Behr TM, Fraccarollo D, Hu K, Galuppo P, Tas P, Angermann CE, Ertl G, Bauersachs J: Vascular endothelial dysfunction and superoxide anion production in heart failure are p38 MAP kinase-dependent. *Cardiovasc. Res.* (2004) 63: 161-167
88. Widmann C, Gibson S, Jarpe MB, Johnson GL. Mitogen-activated protein kinase: Conservation of a three-kinase module from yeast to human [Review]. *Physiological Reviews* (1999) 79:143-180.
89. Yamazaki T, Komuro I, Kudoh S, Zou Y, Shiojima I, Mizuno T, Takano H, Hiroi Y, Ueki K, Tobe K: Mechanical stress activates protein kinase cascade of phosphorylation in neonatal rat cardiac myocytes. *Journal of Clinical Investigation* (1995) 96:438-446.
90. Yue TL, Wang CL, Gu JL, Ma XL, Kumar S, Lee JC, Feuerstein GZ, Thomas H, Maleeff B, Ohlstein EH: Inhibition of extracellular signal-regulated kinase enhances ischemia/reoxygenation-induced apoptosis in cultured cardiac myocytes and exaggerates reperfusion injury in isolated perfused heart. *Circulation Research* (2000) 86:692-699.
91. Zechner D, Thuerauf DJ, Hanford DS, McDonough PM, Glembotski CC: A role for the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in myocardial cell growth, sarcomeric organization, and cardiac-specific gene expression. *J Cell Biol* (1997) 139(1):115-127
92. Zu YL, Ai YX, Gilchrist A, Maulik N, Watras J, Shaafi RI, Das DK, Huang CK: High expression and activation of map kinase activated protein kinase 2 in cardiac muscle cells. *Journal of Molecular & Cellular Cardiology* (1997) 29:2159-2168.
93. Effects of enalapril on mortality in severe congestive heart failure. Results of the Cooperative North Scandinavian Enalapril Survival Study

(CONSENSUS). The CONSENSUS Trial Study Group. *New England Journal of Medicine* (1987) 316:1429-1435.

## **Danksagung**

Für die Bereitstellung aller zur Durchführung meiner Promotion erforderlichen Daten und materiellen Voraussetzungen danke ich Frau Professor Angermann.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Priv.-Doz. Dr. Frantz, Herrn Dr. Behr und Herrn Dr. Hu, die mich bei der Konzeption und Durchführung der experimentellen Arbeit sowie bei der Erstellung der Dissertationsschrift betreuten und mir stets in allen fachlichen Fragen zur Seite standen.

Bedanken möchte ich mich ebenfalls bei meinen Eltern, deren vielseitige Unterstützung während meines Studiums es mir unter anderem ermöglicht hat, bis an diesen Punkt zu gelangen.

Auch allen nicht namentlich Erwähnten, die mich auf dem Weg zu meiner Promotion unterstützt haben, sei herzlich gedankt!

# CURRICULUM VITAE

## Persönliche Daten

*Name:* Seier  
*Vornamen:* Christine, Franziska, Marie  
*Geburtsdatum:* 23.05.1978  
*Geburtsort:* Mainz

## Schulbildung

1984-1988 Martinus-Grundschule Mainz-Gonsenheim  
1988-1997 Maria-Ward-Gymnasium Mainz  
06/1997 Abitur, Leistungsfächer: Biologie, Französisch, Englisch

## Studium

1997-1999 Humanmedizin Universität Rostock  
09/1999 Physikum Universität Rostock  
1999-2000 Humanmedizin Friedrich-Schiller-Universität Jena  
08/2000 1. Staatsexamen Friedrich-Schiller-Universität Jena  
2000-2001 Auslandsstudium Medizinische Fakultät Besançon,  
Frankreich  
2001-2003 Humanmedizin Julius-Maximilians-Universität Würzburg  
09/2003 2. Staatsexamen Julius-Maximilians-Universität  
Würzburg  
2003-2004 Praktisches Jahr:  
*Augenheilkunde:* Universitätsaugenklinik Würzburg,  
Prof. Dr. med. Grehn  
*Innere Medizin:* Hôpital régional de Sion, Schweiz  
*Chirurgie:* Sanitätsbetrieb Brixen, Italien  
16.11.2004 3. Staatsexamen Julius-Maximilians-Universität  
Würzburg: Augenheilkunde, Innere Medizin, Chirurgie,  
Pathologie

## **Weiterbildung Ophthalmologie**

seit 15.04.2005	Weiterbildungsassistentin der Ophthalmologie, Augenklinik Klinikum Bremen Mitte
Mai 2006	Elektrophysiologiekurs, Prof. Berninger, München
November 2006	Ultraschallkurs Teil 1, TIMUG, Bonn
Februar 2007	Ultraschallkurs Teil 2, TIMUG, AAD Düsseldorf
April 2007	Kontaktlinsenanpassungskurs, Prof. Seitz, Homburg/Saar
Oktober 2007	Phako-Wetlab, Bausch&Lomb, München

## **Auslandsstudium / Auslandsfamulaturen**

2001-2002	Auslandsstudium Medizinische Fakultät Besançon, Frankreich
März 2001	Famulatur Urologie, Universität Besançon, Frankreich
September 2002	Famulatur Neurologie, Universität Bydgoszcz, Polen
2/2004-5/2004	Praktisches Jahr, Innere Medizin, Hôpital régional de Sion, Schweiz
6/2004-8/2004	Praktisches Jahr, Chirurgie, Sanitätsbetrieb Brixen, Italien

## **Weitere Qualifikationen**

Sprachkenntnisse: Französisch und Englisch fließend in Wort und Schrift,  
Spanisch Grundkenntnisse, Latein Schulkenntnisse  
Schreibmaschinenkurs, EDV-Kenntnisse

## **Freizeitaktivitäten**

Literatur, Fotografie, Musik: Querflöte, Bergwandern, Klettern, Standard- und  
Lateintanz, Reisen