

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I
der Universität Würzburg
Direktor: Prof. Dr. med. G. Ertl

**Myokardialer Ischämie- und Reperfusionsschaden
bei 5-Lipoxygenase-Knockout-Mäusen**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der Medizinischen Fakultät der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Susanne Jung
aus Würzburg

Würzburg, Dezember 2008

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

Koreferent: Prof. Dr. med. Georg Ertl

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 20.03.2009

Die Promovendin ist Ärztin

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung.....	1
2.	Material und Methoden.....	9
	2.1 Versuchstiere.....	9
	2.2 Ischämie und Reperfusion.....	10
	2.3 Infarktgrößenbestimmung.....	12
	2.4 Immunhistochemie.....	15
	2.4.1 Spezifische Anfärbung von neutrophilen Granulozyten.....	16
	2.5 Biochemische Nachweise.....	18
	2.5.1 RNA-Gewinnung.....	18
	2.5.2 cDNA-Herstellung.....	20
	2.5.3 Realtime-PCR.....	21
3.	Ergebnisse.....	26
	3.1 Infarktgrößenbestimmung.....	27
	3.2 Einwanderung neutrophiler Granulozyten.....	28
	3.3 TNF-α-Expression.....	28
4.	Diskussion.....	30
5.	Zusammenfassung.....	39
6.	Abbildungsverzeichnis.....	40
7.	Literaturverzeichnis.....	41

1. Einleitung

Leukotriene gehören zur Familie der Eicosanoide, einer Gruppe verschiedener Moleküle, die aus Arachidonsäure synthetisiert werden. Arachidonsäure liegt normalerweise als Ester gebunden in den Phospholipiden der Zellmembran vor, kann aber durch Phospholipasen aus der Zellmembran freigesetzt werden. Die Metaboliten der so entstandenen Arachidonsäure, die Eicosanoide, lassen sich grob in zwei Gruppen einteilen, die von zwei verschiedenen Enzymklassen synthetisiert werden. Cyclooxygenasen produzieren Prostaglandine, Prostazykline und Thromboxane, Lipoxygenasen produzieren Leukotriene und Lipoxine. Auf einem Nebenweg werden außerdem über weitere Lipoxygenasen HPETEs (hydroperoxyeicosatetraenoic acids) und HETEs (hydroxyeicosatetraenoic acids) produziert (siehe Abb. 1).

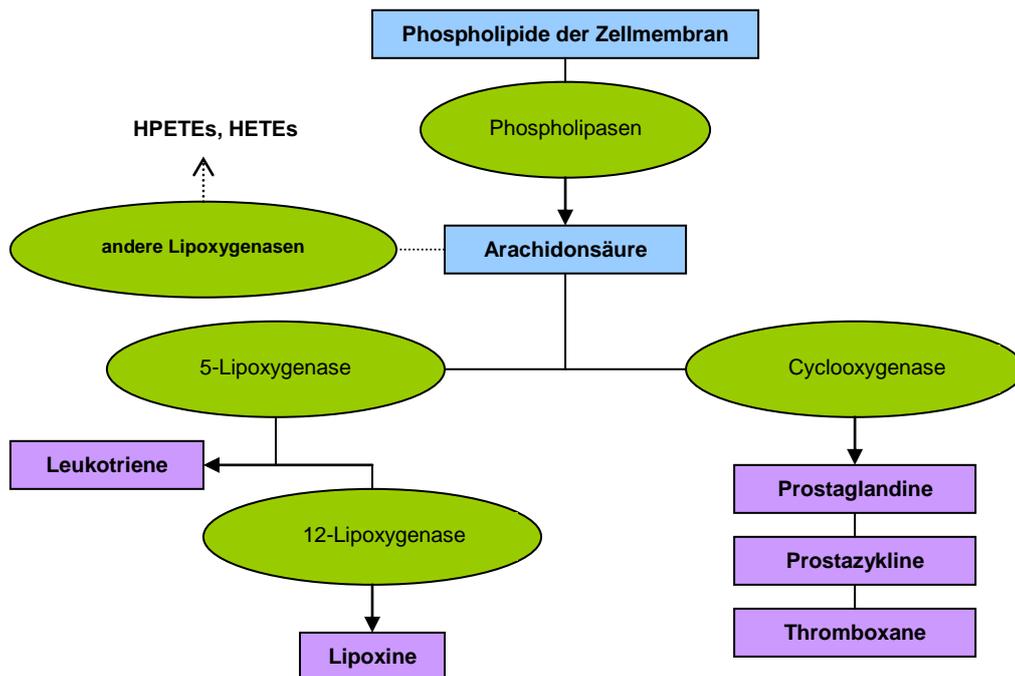


Abb. 1: Eicosanoide und ihre Biosynthese. Aus Phospholipiden der Zellmembran wird durch Phospholipasen Arachidonsäure freigesetzt. Diese kann durch Cyclooxygenasen in Prostaglandine, Prostazykline und Thromboxane umgewandelt werden, durch die 5-Lipoxygenase in Leukotriene, und durch 5- und 12-Lipoxygenase in Lipoxine. Auf einem Nebenweg werden durch andere Lipoxygenasen HPETEs und HETEs erzeugt (nach Kumar et al, 2004).

Eicosanoide werden bevorzugt in Gewebearealen synthetisiert, in denen eine Entzündung abläuft, und vermitteln als Mediatoren die einzelnen Schritte des Entzündungsprozesses, z.B. Vasokonstriktion und Vasodilatation, Erhöhung der Gefäßpermeabilität, Chemotaxis und Leukozytenadhäsion (Karmazyn, 1989).

Die Synthese der Leukotriene aus Arachidonsäure, die insbesondere in Leukozyten aber auch in Endothelzellen und glatten Muskelzellen abläuft (Khan & Tripathi, 2005), wird durch das Enzym 5-Lipoxygenase katalysiert. Dabei wird die 5-Lipoxygenase zunächst durch Translokation vom Zytosol zu Zellmembranen aktiviert, wo sich das Enzym mit dem membranständigen 5-lipoxygenase-activating protein (FLAP) verbindet. Durch andauernde Verbindung mit Zellmembranen wird die 5-Lipoxygenase wieder inaktiviert, ebenso wie durch ihr Produkt Leukotrien A₄ (LTA₄). LTA₄ wird durch das Enzym LTA₄-Hydrolase in Leukotrien B₄ (LTB₄) umgewandelt, und durch das Enzym LTC₄-Synthase in Leukotrien C₄ (LTC₄). Nach Ausschleusen von LTC₄ kann dieses extrazellulär durch eine γ -Glutamyl-Transferase in Leukotrien D₄ (LTD₄) umgewandelt werden, welches dann durch Dipeptidasen in Leukotrien E₄ (LTE₄) gespalten werden kann (Denzlinger, 1996). Auf diese Weise werden intra- und extrazellulär mehrere verschiedene Leukotriene gebildet. Eine Schlüsselposition in der Produktion nimmt jedoch die 5-Lipoxygenase ein. Ohne sie ist keine Synthese von Leukotrienen möglich (siehe Abb. 2).

Leukotriene nehmen viele verschiedene Funktionen wahr, v.a. in Entzündungsprozessen und bei anaphylaktischen Reaktionen. So werden z.B. polymorphonukleäre Leukozyten, Makrophagen, natürliche Killerzellen und zytotoxische T-Lymphozyten durch Leukotriene aktiviert, sowie die Immunglobulinproduktion von B-Lymphozyten gebremst und die Kollagensynthese von Fibroblasten angeregt. LTC₄, LTD₄ und LTE₄ sind sowohl am langsamen Wirkmechanismus der Anaphylaxe beteiligt als auch an hypersensitiven Sofortreaktionen der Lunge. Sie sind starke Bronchokonstriktoren, erhöhen die Permeabilität postkapillärer Venolen und stimulieren die Produktion von mukösen Sekreten. LTB₄ fördert die Adhäsion und Chemotaxis von Leukozyten und stimuliert die Aggregation, Enzym- und

Superoxidproduktion in neutrophilen Granulozyten. Alle Leukotriene sind in der Lage, eine proinflammatorische Wirkung zu entfalten (Samuelsson, 1983).

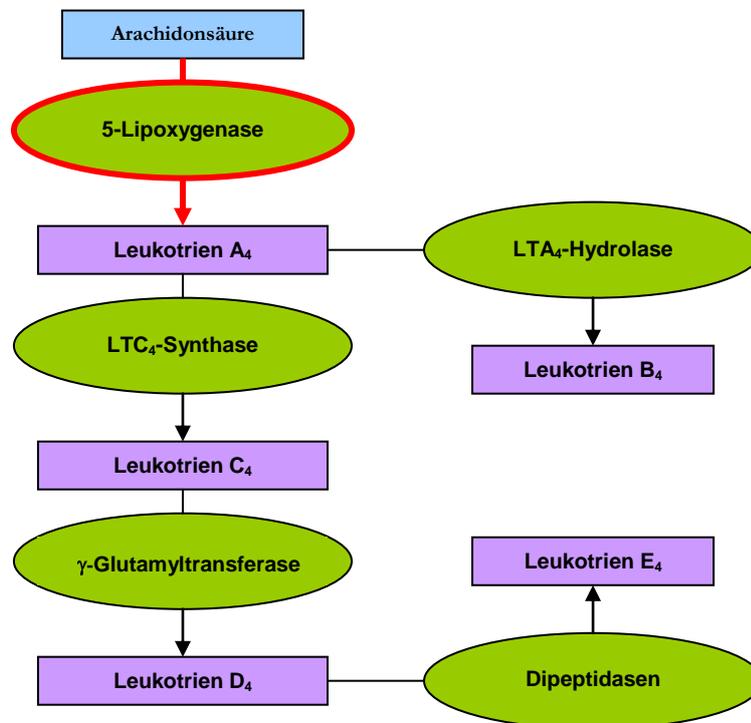


Abb. 2: Leukotriene und ihre Biosynthese. Alle Leukotriene entstehen durch die 5-Lipoxygenase aus Arachidonsäure. Erstes Syntheseprodukt ist Leukotrien A₄, welches durch LTA₄-Hydrolase in Leukotrien B₄ und durch LTC₄-Synthase in Leukotrien C₄ umgewandelt werden kann. Aus Leukotrien C₄ entsteht durch γ -Glutamyltransferase Leukotrien D₄, welches wiederum durch Dipeptidasen in Leukotrien E₄ gespalten werden kann (nach Kumar et al, 2004).

Es scheint, dass die Leukotriene unter physiologischen Bedingungen die Homöostase in der Zelle mit aufrechterhalten und sie im Krankheitsfall mit wiederherstellen. Werden Leukotriene allerdings extensiv produziert oder geraten in ihrer Produktion außer Kontrolle, so sind sie in der Lage, ein nicht unerhebliches pathogenetisches Potential zu entwickeln. Eine solche erhöhte Leukotrienproduktion kann z.B. im Laufe einer Hypersensibilitätsreaktion zustande kommen. Insbesondere bei den allergischen Erkrankungen der Atemwege wird den Leukotrienen schon lange eine tragende Rolle zugeschrieben (Lewis et al, 1990). Die Leukotrienproduktion kann aber auch durch Endotoxin-Stimulation oder durch schwere Gewebeschäden wie z.B. durch Ischämie ausgelöst werden. Gerade in solchen Fällen ist es von

medizinischem Interesse herauszufinden, ob durch eine Blockade der Leukotrienproduktion oder –wirkung ein positiver Effekt auf den Krankheitsverlauf zu erzielen ist.

Mit diesem Ziel wurden bereits mehrere Studien durchgeführt, die den Effekt einer Leukotrien-Ausschaltung in verschiedenen physiologischen und pathologischen Situationen überprüften. Chen et al zeigten, dass sich Leukotrien-KO-Mäuse in anatomischen und physiologischen Aspekten nicht wesentlich von Wildtyp-Mäusen unterscheiden, allerdings in gewissen Fällen unterschiedliche pathologische Reaktionen zeigen: u.a. widerstehen die KO-Mäuse einem durch Platelet Activating Factor (PAF) induzierten Schock und einer durch Arachidonsäure induzierten Entzündung wesentlich besser als Wildtyp-Mäuse (Chen et al, 1994). In einem Überblick über verschiedene Studien mit Leukotrien-KO-Mäusen kommen auch Funk und Chen zu der Ansicht, dass den KO-Mäusen im allgemeinen keinerlei Nachteile aus dem Verlust der Leukotrienproduktion erwachsen, und dass sich eher positive Effekte des knockouts zeigen (Funk & Chen, 2000). Patel et al verglichen die Wirkung eines 5-Lipoxygenase-knockouts mit der einer Behandlung mit dem 5-Lipoxygenase-Inhibitor Zileuton bei renaler Ischämie und Reperfusion bei Mäusen und fanden in beiden Fällen eine signifikante Reduktion der Entzündungsreaktion (Patel et al, 2004). Bei Ischämie und Reperfusion des Gehirns von Mäusen zeigte sich hingegen kein Unterschied zwischen den 5-Lipoxygenase-KO-Mäusen und Wildtypmäusen (Kitagawa et al, 2004).

Ein Organsystem von besonderem medizinisch-pathologischem Interesse ist das Herz. Die koronare Herzerkrankung einschließlich Myokardinfarkt ist immer noch die am häufigsten zum Tode führende Erkrankung in der westlichen Welt (Kumar et al, 2004). Der Myokardinfarkt lässt sich definieren als das ischämiebedingte Absterben von Herzmuskelgewebe (Kumar et al, 2004) und lässt sich in seiner Pathogenese in zwei Abschnitte unterteilen. Zunächst kommt es zum Verschluss einer Koronararterie, typischerweise durch einen rupturierten atherosklerotischen Plaque, und anschließend, als Konsequenz der resultierenden Ischämie, zu einer Koagulationsnekrose im betroffenen Herzmuskelbereich. Der nekrotische Herzmuskel löst eine akute

Entzündungsreaktion aus, die den weiteren pathogenetischen Verlauf bestimmt, mit der Einwanderung von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen beginnt und in den Umbau des nekrotischen Gewebes durch Fibroblasten in eine kollagenöse Narbe mündet. Der Ablauf einer akuten Entzündungsreaktion wird hauptsächlich durch die Zytokine Tumor Necrosis Factor α (TNF- α) und Interleukin-1 (IL-1) vermittelt. Sie sind verantwortlich für die endotheliale Aktivierung im Entzündungsverlauf, die Aktivierung der neutrophilen Granulozyten und Fibroblasten, und die systemische Akute-Phase-Antwort, die u.a. Fieber, hämodynamische Veränderungen und die Produktion von Akute-Phase-Proteinen zur Folge hat. In der Menge von im entzündeten Gewebe produzierten TNF- α bzw. IL-1 bildet sich daher die Ausprägung der Entzündung ab (Kumar et al, 2004).

Der effektivste Weg, ischämisches Gewebe nach einem Koronarverschluss zu retten, ist die möglichst schnelle Reperfusion. In der Klinik stehen hierzu mehrere Möglichkeiten zur Verfügung, die Thrombolyse, die perkutane transluminale Koronarangioplastie (PTCA) und die koronare Bypass-Operation. Je früher das ischämische Gewebe wieder mit Sauerstoff versorgt wird, desto geringer ist der Anteil an Gewebe, der tatsächlich nekrotisch wird, narbig umgebaut wird und nicht mehr zur Herzaktion beiträgt. Durch die Reperfusion ist ein Teil des ischämischen Gewebes in der Lage, sich wieder zu erholen und als vitales Gewebe erhalten zu bleiben (siehe Abb. 3).

Es stellt sich allerdings die Frage, ob dieser Anteil durch eine zusätzliche Beeinflussung des ischämiebedingten Entzündungsprozesses noch erhöht werden kann. Der gesamte pathogenetische Prozess bei Ischämie und Reperfusion des Herzmuskels lässt sich als das Gegenspiel zweier Mechanismen betrachten: der Sauerstoffmangel führt über die Entstehung einer Nekrose zu Entzündung und Gewebeverlust, die Reperfusion durch erneute Sauerstoffversorgung zum Eingrenzen der Entzündung und zu Gewebeerhalt (Wargovich et al, 1987). Plausiblerweise sollte sich durch eine Hemmung der Entzündungsreaktion die Balance zugunsten des Gewebeerhalts verschieben lassen. Entsprechend liegen auch bereits mehrere pharmakologische Verfahren

vor, die thrombolytische Therapie bei Myokardischämie durch Entzündungshemmer zu ergänzen (Willerson & Buja, 1990).

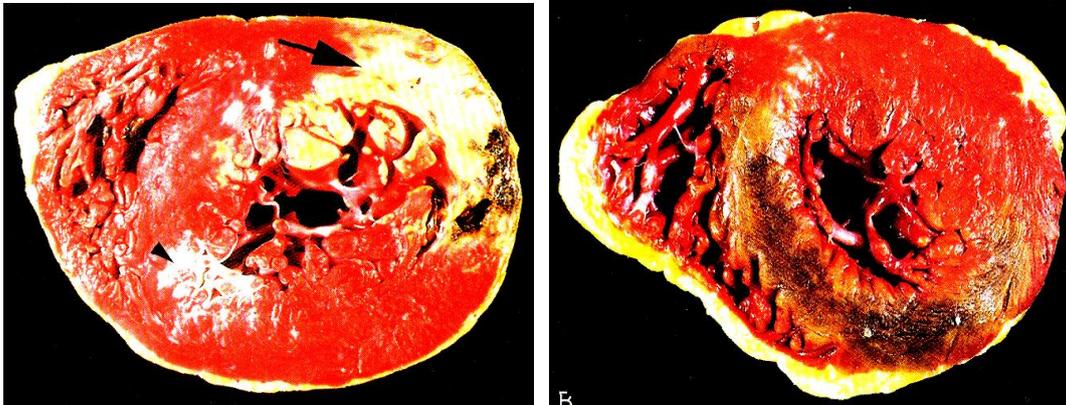


Abb. 3: Ischämie und Reperfusion im menschlichen Herzen.

Links: akuter Myokardinfarkt. Die Nekrosezone ist daran zu erkennen, dass sie nicht durch Triphenyltetrazoliumchlorid rot anfärbbar ist (—>). Ebenfalls nicht angefärbt ist die Narbe eines alten Infarkts (▶).

Rechts: Aufnahme nach Myokardischämie und Reperfusion durch Streptokinasebehandlung. Das ischämische Gebiet ist hämorrhagisch und dunkel gefärbt, das Gewebe lässt sich aber durch Triphenyltetrazoliumchlorid rot anfärben und zeigt noch keine ausgedehnten Nekrosen.

(aus Schoen, 2004)

Hierzu wurden bereits diverse Studien durchgeführt, in denen verschiedene Abschnitte der Entzündungskaskade bei Ischämie und Reperfusion experimentell untersucht wurden. Unter anderem wurde z.B. gezeigt, dass endogene Prostaglandine reperfusionssassoziiertes Versagen der Ventrikelfunktion bei Ischämie des Herzmuskels vermitteln (Kamarzyn, 1986) und dass sie dies u.a. über eine Beeinflussung des zellulären Energiemetabolismus tun (Kamarzyn et al, 1993). Die Effekte von Prostaglandinen und Thromboxan A₂ wurden unter anderem auf ihre Regulation des Tonus und der Proliferation glatter Muskelzellen zurückgeführt (Schorr, 1993). Thromboxane sind u.a. in der Lage, den Tonus der glatten Muskulatur zu erhöhen und so den Blutfluss in Betroffenen Arealen zu senken (van Bilsen, 1989). Bezüglich der Prostazykline wurde u.a. nachgewiesen, dass endogenes Prostacyclin die Myokardfunktion bei Myokardischämie zu erhalten hilft (Schorr & Woditsch, 1992) über die Beteiligung mitochondrialer K⁺-Kanäle (Shinmura et al, 2005). Insgesamt wurde eine Förderung der akuten

Entzündung nach Myokardinfarkt über den Cyclooxygenase-Weg mehrfach nachgewiesen (Patrignani, 2003), was auch dem zeitweiligen klinischen Einsatz von COX-2-Hemmern bei Myokardinfarkt zugrunde lag (Deng et al, 2006).

Neben Prostaglandinen, Prostacyclin und Thromboxanen wurden auch die Leukotriene auf ihre Bedeutung bei Ischämie und Reperfusion des Herzmuskels überprüft. Auf klinischer Ebene äußert sich die Wirkung der Leukotriene in einer Reduktion des koronaren Blutflusses, erniedrigter myokardialer Kontraktilität und reduziertem Herzzeitvolumen bei gleichbleibender Herzfrequenz (Letts, 1987). Auch auf biochemischer Ebene wurde die Beteiligung der Leukotriene an den pathologischen Prozessen nach Myokardischämie mehrfach dargestellt. Es wurden sowohl erhöhte Leukotrienmengen nach Koronarverschluss im Tiermodell nachgewiesen (Sasaki et al, 1988), als auch eine gesteigerte endogene Leukotrienproduktion bei Patienten mit Myokardischämie gezeigt (Carry et al, 1992). Die genaue Rolle der Leukotriene bei Myokardinfarkt ist allerdings noch nicht geklärt, da die bisher durchgeführten Untersuchungen widersprüchliche Ergebnisse zeigten. Einerseits wurde nachgewiesen, dass Nafazatrom, ein Inhibitor der 5-Lipoxygenase, im Hundemodell die Infarktgröße nach Ischämie und Reperfusion reduziert (Shea et al, 1984, Fiedler & Mardin, 1985). Ebenso wurde ein infarktverkleinernder Effekt eines spezifischen LTB₄-Antagonisten (Taylor et al, 1989) sowie ein protektiver Effekt von LTC₄-Rezeptor-Antagonisten (Maclouf et al, 1996) bei Kaninchen dargestellt. Andererseits zeigten weder der LTB₄-Rezeptor-Antagonist LY 255283 (Hahn et al, 1990), noch der Leukotrienrezeptor-Antagonist FLP-55712 (Shekher & Singh, 1997) nachweisbare positive Effekte auf das Infarktgeschehen. Die Frage nach der Bedeutung der Leukotriene bei Myokardischämie bedarf also noch einer genaueren Bearbeitung.

Das Ziel der vorliegenden Studie war es, die Rolle der Leukotriene in den pathogenetischen Prozessen nach Ischämie und Reperfusion im Herzmuskel genauer aufzuklären. Dazu wurden Ischämie und Reperfusion an einem Mausmodell nachvollzogen, für das Wildtyp-Mäuse einerseits und 5-Lipoxygenase-KO-Mäuse andererseits herangezogen wurden. Die Verwendung von knockout-Mäusen wurde einer medikamentösen Hemmung der 5-

Lipoxygenase vorgezogen, um zu vermeiden, dass die Ergebnisse durch unspezifische Effekte von Pharmaka verfälscht werden. Ein Vergleich zwischen den beiden Mausgruppen sollte klären, ob durch das Ausschalten der Leukotrienproduktion ein positiver Effekt auf das Infarktgeschehen zu erzielen ist. Für diesen Vergleich wurden als Parameter des Endzustands die Infarktgröße und die Größe von ischämischem aber nach Reperfusion vital verbleibendem Gewebe herangezogen. Als Parameter für die Ausprägung der Entzündung nach Ischämie und Reperfusion sollten die Anzahl eingewanderter neutrophiler Granulozyten und die Menge von produziertem TNF- α dienen.

2. Material und Methoden

Versuchstiere

Verwendet wurden 5LX^{-/-} Mäuse, deren Züchtung erstmals von Chen et al beschrieben wurde (Chen et al, 1994). Für diese Züchtung wurde mittels embryonaler Stammzelltechnologie das 5-Lipoxygenase-Gen durch Unterbrechung der Gensequenz inaktiviert. Dazu wurde ein Target-Vektor aus den Exons 4 bis 6 des 5-Lipoxygenase-Gens der Maus konstruiert, in dem das Exon 6 von einer Neomycin-Resistenz-Cassette ersetzt wurde. Durch homologe Rekombination wurde das Konstrukt anschließend in embryonale Stammzellen inseriert (siehe Abb. 4). Heterozygote F₁-Mäuse wurden miteinander gekreuzt, so dass schließlich 5-LX^{-/-} Mäuse resultierten, die nicht in der Lage sind, 5-Lipoxygenase zu synthetisieren. Die tatsächliche Unterbrechung der Gensequenz wurde mit Southern Blot Analyse überprüft, und die Tatsache, dass die KO-Mäuse keine 5-Lipoxygenase synthetisieren können, durch Western Blot Analyse bestätigt. Phänotypisch erscheinen die Knockout-Mäuse äußerlich normal und entwickeln sich wie Mäuse des zugrunde liegenden Wildtyps (Chen et al, 1992, Funk & Chen, 2000, Funk et al, 2002).

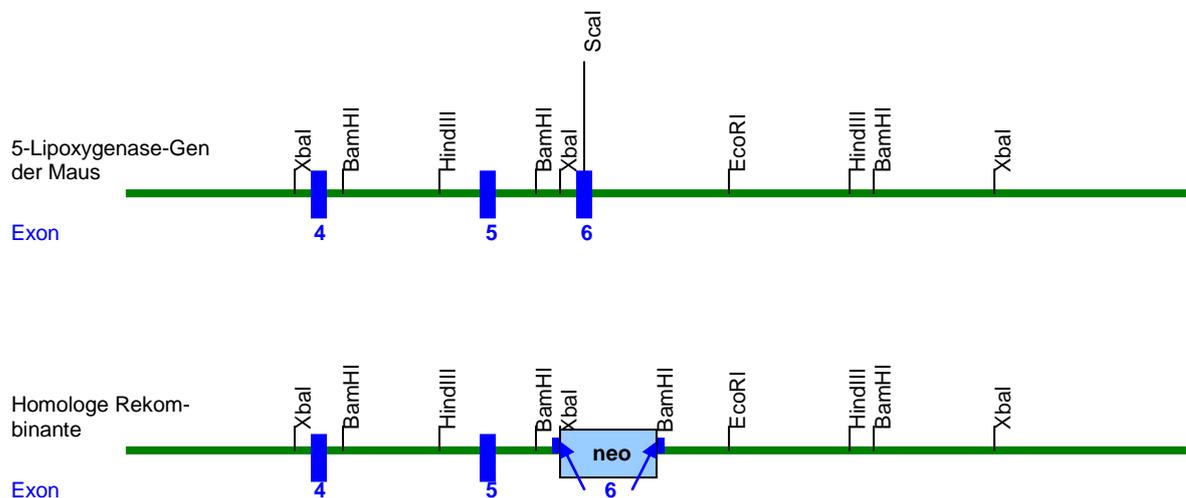


Abb. 4: Inaktivierung des 5-Lipoxygenase-Gens der Maus. Auf den Restriktionskarten des Wildtyp-Allels und der homologen Rekombinante ist zu sehen, dass die Inaktivierung durch den Ersatz des Exons 6 durch eine Neomycin-Resistenzkassette (neo) erzielt wird (nach Chen et al, 1994).

30 solcher Mäuse wurden von Charles River Laboratories (Sulzfeld, BRD) bezogen. Zum Zeitpunkt der Experimente waren die Tiere 6 bis 8 Wochen alt und wogen 20 bis 28g. Von Harlan Winkelmann (Borchen, BRD) wurden außerdem 30 C57Bl/6J Mäuse bezogen, die als Wildtyp der 5-LX^{-/-}-Mäuse als Kontrollgruppe für die Experimente verwendet wurden. Auch diese Mäuse waren 6 bis 8 Wochen alt und wogen 20 bis 28g.

Ischämie und Reperfusion

Für das Setzen einer Ischämie im Herzen und die anschließende Reperfusion wurde das Modell von Michael et al herangezogen (Michael et al, 1995), wie bereits kürzlich beschrieben (Frantz et al, 2005). Die Mäuse wurden mit Ether betäubt, mit einer Braunüle (BD VenflonTM Pro, Becton Dickinson, Heidelberg, BRD) intubiert und an ein Kleintierbeatmungsgerät (Mouse Ventilator, UGO BASILE biological research apparatus, Comerio, Italien) angeschlossen. Während der Beatmung wurde die Narkose mit Isofluran aufrechterhalten, welches der Atemluft vigilanzabhängig bis zu einem Anteil von 5 Vol% beigefügt wurde. Auf dem Rücken liegend wurde die narkotisierte Maus an den vier Pfoten mit Klebeband an der Unterlage fixiert. Der Beatmungsschlauch wurde ebenfalls mit Klebeband befestigt, um ein Verrutschen während der Operation zu vermeiden. Die Elektroden eines EKG-Geräts (cardiofax GEM, Nihon Kohden, Rosbach v.d.H., BRD) wurden angebracht und präoperativ ein EKG der Maus aufgezeichnet. Anschließend wurde ein Hautschnitt durchgeführt und der Brustkorb eröffnet. Unter einem Mikroskop (OPMI1-FR, Carl Zeiss, Oberkochen, BRD) wurde die linke vordere absteigende Herzkranzarterie mit chirurgischem Nahtmaterial (Perma-Hand Seide, Ethicon, Norderstedt, BRD) abgebunden (siehe Abb. 5). Mit einer weiteren EKG-Aufzeichnung wurde überprüft, ob das Setzen der Ischämie erfolgreich war. Nach 30 Minuten, während derer der offene Brustkorb mit einer angefeuchteten Kompresse abgedeckt blieb, wurde der Knoten um das Gefäß wieder gelöst, so dass das ischämische Areal reperfundiert wurde. Auch zu diesem Zeitpunkt wurde ein EKG aufgezeichnet. Der für die Ischämie verwendete Faden wurde locker an der gleichen Stelle um das Blutgefäß verknotet im Brustkorb belassen, um bei

der späteren Infarktgrößenbestimmung die Abbindungsstelle wiederfinden zu können (s.u.).

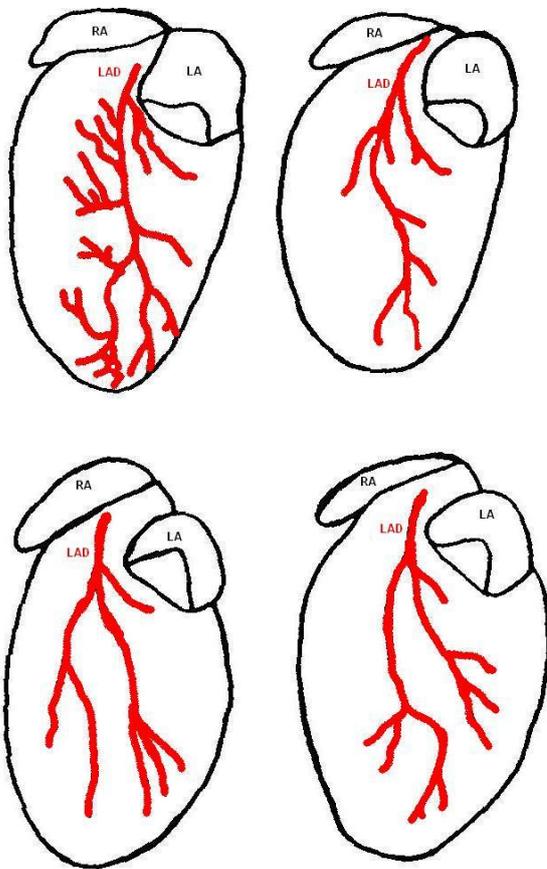


Abb. 5: Schematische Zeichnung der Anatomie der linken vorderen absteigenden Herzkranzarterie (LAD) bei der Maus. Gezeigt sind vier verbreitete Verlaufsmuster, oben mit einem Hauptgefäß, unten mit einer frühen Verzweigung. Zwischen rechtem (RA) und linkem Herzohr (LA) kann die LAD operativ abgebunden werden (nach Michael et al, 1995).

Anschließend wurde der Brustkorb mit einer Längsnaht und einer Hautnaht wieder verschlossen. Der Beatmungsschlauch wurde entfernt und das Tier nach dem Erwachen aus der Narkose zurück in den Isolator (Scantainer, Scanbur A/S, Karlslunde, Dänemark) gesetzt, der auf 25°C und 35% Luftfeuchtigkeit eingestellt war. Jedes Tier erhielt zur Schmerzbehandlung eine Buprenorphin-Injektion (Temgesic® 0,05-0,1mg/kgKM).

Nach 24 Stunden wurde die Maus mit unter das Bauchfell gespritztem Avertin (10g Tribromethanol + 12,5ml Amylalkohol auf 400ml H₂O) wieder in Narkose versetzt und erneut intubiert, mit bis zu 5%iger Isofluranbeimischung beatmet, und auf dem Rücken liegend mit Klebestreifen an den Pfoten auf der Unterlage fixiert. Mit einem Seit-zu-Seit-Schnitt wurde der Bauchraum unterhalb der Zwerchfells eröffnet, dann das Zwerchfell durchtrennt, und anschließend mittels

beidseitigem Schnitts entlang der Axillarlinien durch die Rippen der Brustkorb eröffnet. Eine Klemme wurde am Sternum festgeklemmt und mit ihr der vordere Teil des Brustkorbs nach oben geklappt, so dass freie Sicht auf das Herz möglich war. Mithilfe des nach der Ischämie-Operation um das Herzkranzgefäß belassenen Operationsfadens wurde das markierte Gefäß erneut abgebunden. Daraufhin wurden 0,5ml 5%ige Evans Blue Lösung in die Herzhöhlen des noch schlagenden Herzens injiziert. Durch diese Methode werden alle Anteile des Herzens mit Evans Blue angefärbt, die auch während der 24 Stunden zurückliegenden 30minütigen Ischämie durchblutet waren. Die ischämischen Anteile werden nicht angefärbt. Im Anschluss an die Färbung wurde das Tier mit einer Injektion von 1ml 10%igem Kaliumchlorid getötet und das Herz aus dem Brustkorb entnommen. Nach Entfernung von anhängendem Bindegewebe und der beiden Herzohren sowie ausgiebiger Spülung in physiologischer Kochsalzlösung (Kochsalzspüllösung 0,9%, DeltaSelect, Dreieich, BRD), um überschüssiges Evans Blue zu entfernen, wurde das Herz für die Infarktgrößenbestimmung in Einbettungsmittel (Tissue Tek O.C.T., Bayer, Leverkusen, BRD) gegeben und bei -20°C für ca. 40 Minuten eingefroren. Herzen, die für die immunhistochemischen und biochemischen Nachweise herangezogen werden sollten, wurden ohne Evans Blue Färbung unmittelbar nach Eröffnung des Brustkorbs entnommen. Sie wurden sofort nach der Entnahme in Kryoröhrchen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C eingefroren.

Infarktgrößenbestimmung

Das tiefgefrorene und in Einbettungsmittel stabilisierte Herz wurde mit einem Skalpell quer in 1mm dicke Scheiben geschnitten, und die Scheiben in physiologischer Kochsalzlösung vom Einbettungsmittel befreit. Die Scheiben je eines Herzens wurden in ein 1,5ml Reaktionsgefäß (Safe Lock Tubes 1,5ml, eppendorf, Hamburg, BRD) gegeben, das 2%iges Triphenyltetrazolium enthielt, und bei 37°C für zehn Minuten auf einem Wärmeschüttler (Thermomixer comfort, eppendorf, Hamburg, BRD) inkubiert. Triphenyltetrazolium wandelt sich unter dem Einfluss von Gewebedehydrogenasen in einen roten Farbstoff

um, der somit nur Gewebeareale anfärbt, die aktive Dehydrogenasen enthalten. Durch die Ischämie abgestorbene Gewebeteile enthalten keine solchen Dehydrogenasen mehr, werden also nicht angefärbt (Klein et al, 1981).

Die Färbereaktion wurde nach zehn Minuten mit 10%iger Formalinlösung gestoppt, indem die Herzscheiben einzeln in Formalin-gefüllte wells einer 96-well-plate (96-well-Immuno-Platten C⁹⁶ Maxisorp, NuncTM, Wiesbaden, BRD) gegeben wurden. Die gefärbten Herzscheiben wurden dann von beiden Seiten unter einem Mikroskop mit Kameraaufsatz (WILD M3B, Leica, Solms, BRD) mit einer Digitalkamera (Coolpix 995 Digitalkamera, Nikon, Düsseldorf, BRD) photographiert. Auf den so erhaltenen Bildern sind die verschiedenen Gewebeabschnitte anhand ihrer Färbung zu erkennen (siehe Abb. 6, links):

- Blaue Gewebeanteile: wurden während des gesamten Experiments die ganze Zeit durchblutet, und somit auch bei der Färbung mit Evans Blue vom Farbstoff durchströmt und angefärbt. Zwar enthalten diese vitalen Gewebeabschnitte auch aktive Dehydrogenasen und werden durch das Triphenyltetrazolium rot gefärbt, das blaue Evans Blue ist aber in der Wirkung stärker, daher erscheinen diese Gewebeanteile durchgehend blau oder höchstens andeutungsweise violett.
- Weiße Gewebeanteile: wurden während der 30minütigen Ischämie und während der Evans Blue Färbung nicht durchblutet und enthalten keine aktiven Dehydrogenasen mehr, da sie durch den gesetzten Infarkt und die resultierende Gewebeischämie abgestorben sind. Sie werden daher weder blau noch rot angefärbt.
- Rote Gewebeanteile: wurden während der 30minütigen Ischämie und während der Evans Blue Färbung zwar nicht durchblutet, werden also nicht blau angefärbt, konnten sich aber während der Reperfusion so weit erholen, dass noch aktive Dehydrogenasen im Gewebe enthalten sind. Es handelt sich also um vitales Gewebe innerhalb des ischämischen Bereichs, das durch Triphenyltetrazolium rot gefärbt wird.

Die Auswertung der Infarktgrößen erfolgte am Computer mit einer Planimetrie-Software (ScionImage). Die blauen, roten und weißen Abschnitte der Herzscheiben wurden auf den digitalisierten Bildern markiert und ihre jeweiligen

Flächen (A) ausgemessen (siehe Abb. 6, rechts). Die Bilder wurden stets noch einmal mit den tatsächlichen Herzscheiben verglichen, die unter einem Vergrößerungsglas betrachtet wurden, um möglichst genaue Ergebnisse zu erhalten. Außerdem wurden alle Messungen innerhalb von 24h nach der Färbung durchgeführt, um Verfälschungen durch Verblässen oder Verschwimmen der Farben zu vermeiden. Die einzelnen Herzscheiben wurden gewogen (Waage sartorius analytic A1205, Sartorius, Göttingen, BRD), und dann über die Gewichte und die Flächen der einzelnen Herzabschnitte der infarzierte Anteil des Herzens berechnet, nach der Formel:

$$\text{Infarktgröße} = (A_1 \times Wt_1) + (A_2 \times Wt_2) + \dots + (A_n \times Wt_n)$$

Dabei ist n die Anzahl der Scheiben pro Herz, Wt_n das Gewicht der jeweiligen Scheibe n und A die durch die Planimetrie bestimmte Fläche infarzierten Gewebes. Ebenfalls berechnet wurden der Anteil infarzierten Gewebes am linken Ventrikel (LV):

$$\text{Infarktanteil} = \frac{\text{Gewicht des Infarktgebiets} \times 100}{\text{Gewicht des LV}}$$

sowie die Größe des während der Operation ischämischen Gebietes:

$$\text{Area At Risk (AAR)} = \frac{\text{Gewicht des LV} - \text{Gewicht des blau gefärbten Teils des LV}}{\text{Gewicht des LV}}$$

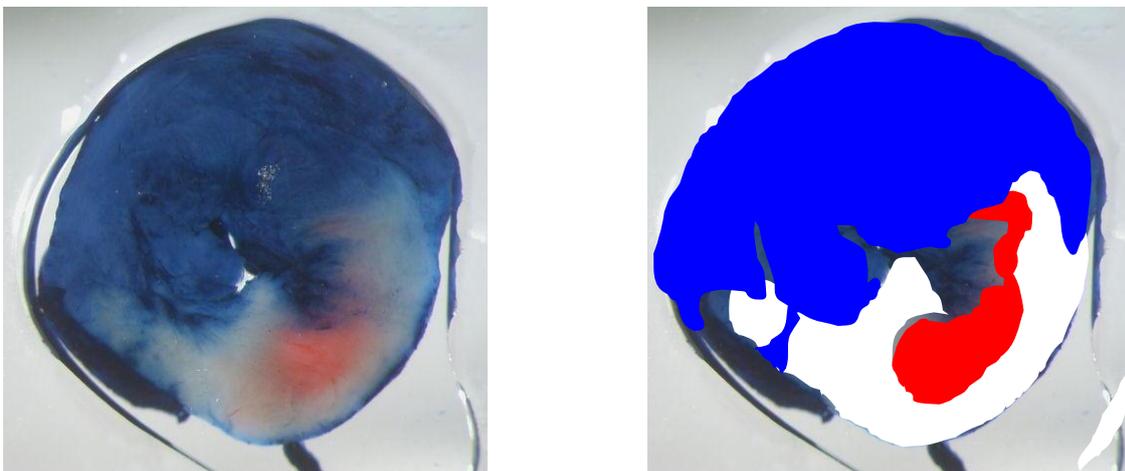


Abb. 6: Infarktgrößenbestimmung.

Links: Photo einer angefärbten Herzscheibe. Die verschieden gefärbten Abschnitte zeigen die Verteilung vitalen (blau), nekrotischen (weiß) und ischämischen aber noch vitalen (rot) Gewebes.

Rechts: Markierung der verschieden gefärbten Abschnitte zur Ausmessung der Fläche. Dabei werden Herzhöhlen und Areale, auf denen lediglich Außenhaut zu sehen ist, ausgespart.

Immunhistochemie

Für immunhistochemische Anfärbungen wird die Tatsache ausgenutzt, dass die gesuchten Strukturen, z.B. neutrophile Granulozyten, spezifische Antigene tragen, die durch die angewendeten Verfahren sichtbar gemacht werden können. Dazu werden im Tiermodell spezifische Antikörper hergestellt, die an diese Antigene (bzw. Epitope) der interessierenden Strukturen binden. Wird eine Gewebeprobe mit diesem spezifischen Antikörper inkubiert, nachdem die Epitope durch eine Demaskierungslösung freigelegt wurden, verbindet er sich mit den im untersuchten Gewebe vorhandenen Antigenen. Wenn dann der spezifische Antikörper sichtbar gemacht wird, kann die Verteilung des Antigens bzw. der antigentragenden Strukturen im Gewebe nachvollzogen werden. Für die Sichtbarmachung wird ein markierter zweiter Antikörper verwendet, dessen Antigen Immunglobuline der Tierart sind, aus der der primäre Antikörper gewonnen wurde. Ist dieser zweite Antikörper mit einem Farbstoff markiert, so ist nach der Inkubation die Verteilung der gesuchten Strukturen bereits zu sehen. In vielen Fällen ist jedoch ein solches Farbsignal nicht ausreichend und bedarf der Vervielfältigung. Dies kann u.a. durch die sog. ABC (Avidin-Biotin-Complex)-Methode geschehen. Dabei trägt der sekundäre Antikörper ein Biotin-Molekül, das von Avidin gebunden wird. Avidin besitzt mehrere Biotin-Bindungsstellen, d.h. es kann mehrere ebenfalls Biotin tragende Markermoleküle binden, z.B. biotinylierte Meerrettich-Peroxidase. Wird die Peroxidase als Reporter-Molekül verwendet, so wird schließlich im eigentlichen Färbeschritt DAB (3,3'-Diaminobenzidin) zugegeben, welches unter Einfluss der Peroxidase ein braunes Endprodukt bildet. Vor der Markierung und Färbung wird das zu untersuchende Gewebe bei Verwendung von Meerrettich-Peroxidase zunächst in 3%igem Wasserstoffperoxid eingelegt, um die endogene Peroxidase zu blockieren, die sonst das Signal verfälschen würde. Eine weitere Verfälschung durch unspezifische Bindung der Antikörper wird dadurch umgangen, dass das Gewebe vor der Antikörperbindung in einer Blockierungslösung inkubiert wird, z.B. in Serum der Spezies, aus welcher der sekundäre Antikörper gewonnen wurde (siehe Abb. 7).

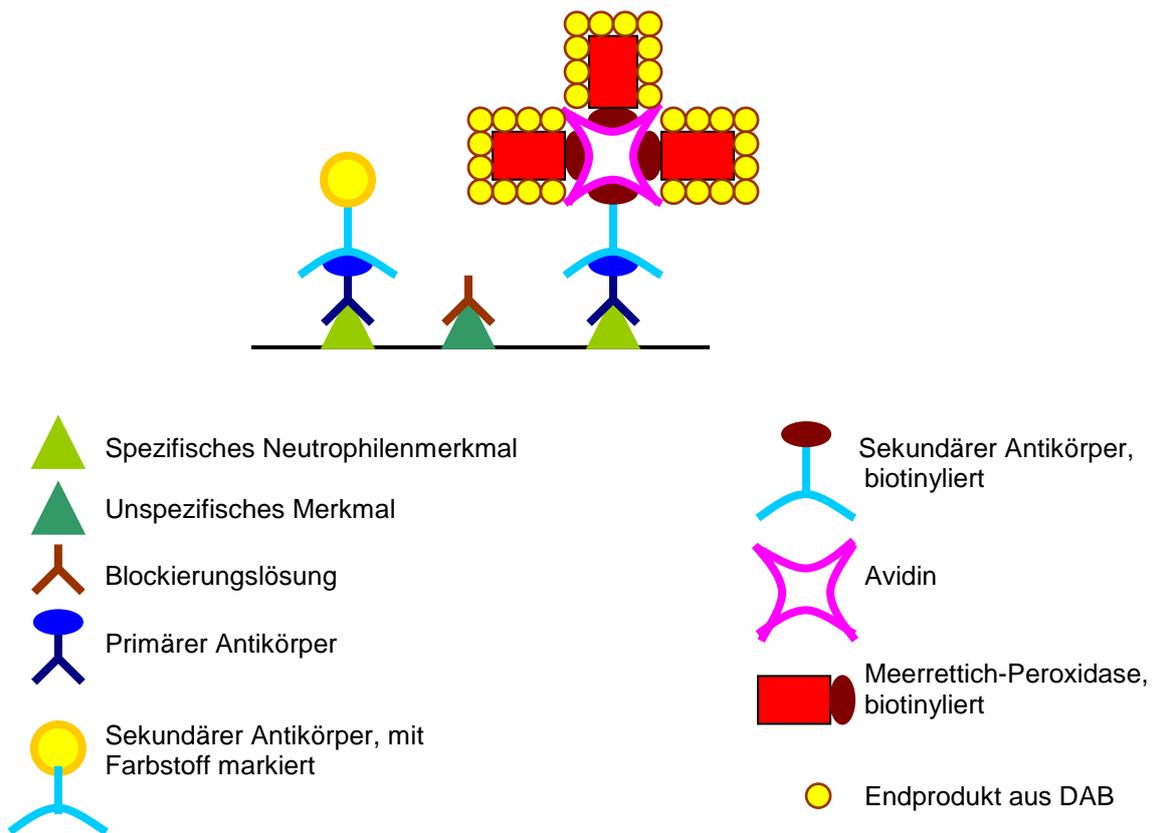


Abb. 7: Schema der immunhistochemischen Anfärbung von Neutrophilen. Primäre Antikörper binden an spezifische Neutrophilenmerkmale, sekundäre Antikörper binden wiederum an die primären Antikörper. Ist der sekundäre Antikörper mit Farbstoff markiert (links), ist die Verteilung der Neutrophilenmerkmale anhand der Anfärbung bereits zu sehen. Zur Verstärkung des Signals kann ein biotinylierter sekundärer Antikörper verwendet werden (rechts). An das Biotin bindet Avidin, das noch weitere Bindungsstellen für Biotin besitzt. An diese kann biotinylierte Meerrettich-Peroxidase binden. Die Peroxidase setzt DAB in ein braunes Endprodukt um. Unspezifische Merkmale werden vor der eigentlichen Anfärbung mit Blockierungslösung abgedeckt (Mitte).

2.4.1 Spezifische Anfärbung von neutrophilen Granulozyten

Von den nach Ischämie und Reperfusion entnommenen und in Paraffin eingebetteten Herzen wurden mit einem Mikrotom (Hn40, Reichert-Jung, Leica Microsystems, Nussloch, BRD) 10µm dicke Querschnitte erstellt, die den Infarktbereich enthalten. Die Paraffinschnitte wurden auf Objektträger (SuperFrost® Plus Objektträger, R. Langenbrinck Labor- und Medizintechnik, Teningen, BRD) gezogen und im Wärmeschrank (Trockenschrank, Heraeus, Hanau, BRD) bei 60°C über Nacht fixiert. Danach wurden sie in Xylol und einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert, hydriert und 5 Minuten in PBS

eingelegt. Daraufhin wurden die Schnitte für 30 Minuten in einer Epitop-Demaskierungslösung bei 95-96°C gekocht und für weitere 30 Minuten abgekühlt. Anschließend wurden die Schnitte dreimal in PBS gespült, für 30 Minuten in 3%iger Wasserstoffperoxid-Lösung unter Lichtausschluss inkubiert, und dreimal in 0,3%igem Tween 20 in PBS gewaschen. Nachdem die Schnitte für 30 Minuten in Blockierungslösung (5%iges Kaninchen-Serum, verdünnt in PBS und 0,3%igem Tween 20; Normal Rabbit Serum, Vectastain ABC Kit, Vector Laboratories, Burlingame CA, USA) gelegt wurden, um unspezifische Antikörperbindungen zu blockieren, wurden sie für weitere 30 Minuten mit dem primären Antikörper (Rat Anti-Mouse Neutrophiles monoklonal, clone 7/4, Linaris, Wertheim-Bettingen, BRD; Verdünnung 1:100) inkubiert. Der Antikörper bindet an ein Neutrophilen-spezifisches Epitop, so dass mit ihm die neutrophilen Granulozyten, die in den Schnitten vorhanden sind, markiert werden. Als Kontrolle wurden entsprechende Schnitte mit einem unspezifischen Antikörper inkubiert. Die Schnitte wurden nach der Inkubation mit dem ersten Antikörper dreimal mit PBS + 0,3%igem Tween 20 gewaschen und daraufhin für 30 Minuten mit dem sekundären Antikörper (BA-4001, Vectastain ABC Kit, Vector Laboratories, Burlingame CA, USA; Verdünnung 1:50) inkubiert. Nachdem die Schnitte wiederum dreimal mit PBS + 0,3%igem Tween 20 gewaschen wurden, wurden sie für 30 Minuten mit Avidin (Vectastain ABC Kit, Vector Laboratories, Burlingame CA, USA) und biotinylierter Meerrettichperoxidase (Vectastain ABC Kit, Vector Laboratories, Burlingame CA, USA) inkubiert, danach wieder wie zuvor dreimal gewaschen und 10 Minuten lang mit DAB (3,3'-Diaminobenzidin) entwickelt. Abschließend wurden die Schnitte mit Wasser gewaschen, dehydriert und in Enthellan (Merck, Darmstadt, BRD) eingebettet. Die Schnitte konnten nun unter dem Mikroskop betrachtet, und die in Infarktbereich und Umgebung eingewanderten neutrophilen Granulozyten gezählt werden (siehe Abb. 8).

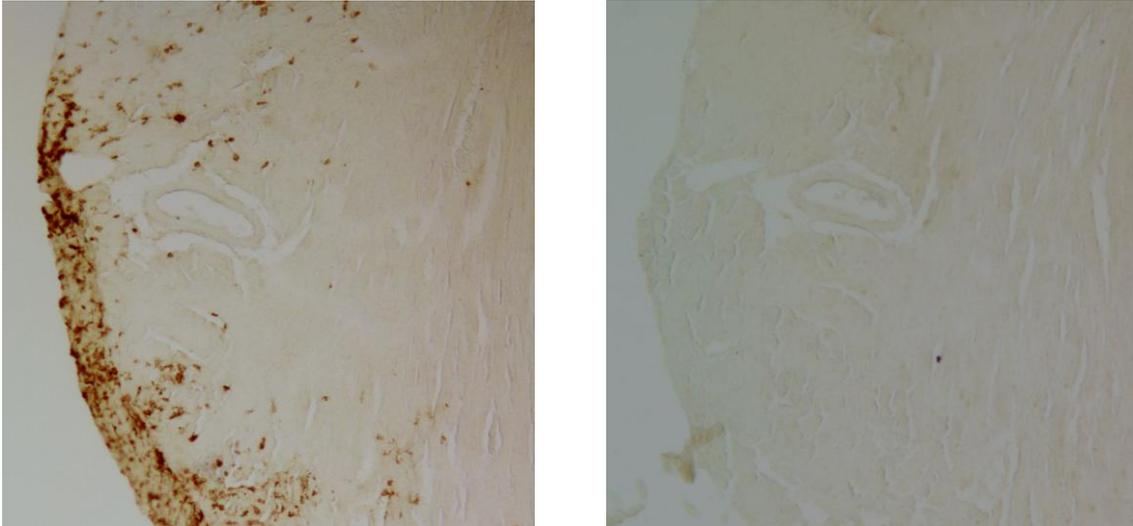


Abb. 8: Spezifische Anfärbung neutrophiler Granulozyten.

Links: Nach Behandlung mit primärem Antikörper (anti-Mausneutrophile), biotinyliertem sekundärem Antikörper, Avidin und biotinylierter Meerrettichperoxidase sowie Zugabe von DAB werden neutrophilenspezifische Merkmale durch das Endprodukt von DAB braun angefärbt (links).

Rechts: Nach Behandlung mit einem unspezifischen Antikörper als Kontrolle sind keine braun gefärbten Strukturen zu erkennen.

Biochemische Nachweise

Als Entzündungsmarker sollte der Gehalt des infarzierten Herzmuskelgewebes an TNF- α gemessen werden. Da wegen der geringen Mengen eine direkte Messung zu ungenau wäre, wurde wie bereits beschrieben (Frantz et al, 2004) indirekt vorgegangen, zunächst RNA aus dem Gewebe extrahiert, in cDNA umgeschrieben und schließlich per Realtime-PCR eine quantitative Bestimmung der TNF- α -cDNA, bzw. der im Gewebe enthaltenen TNF- α -mRNA durchgeführt.

2.5.1 RNA-Gewinnung

Hierzu wurde das Verfahren mit Trizol®-Reagenz verwendet. Trizol ist eine Lösung aus Phenol und Guanidinisothiocyanat, die während der Homogenisierung von Gewebe die Integrität der RNA aufrecht erhält, dabei aber Zellwände und andere zelluläre Strukturen auflöst. Nach Zugabe von Chloroform trennt sich die Lösung in eine wässrige und eine organische Phase,

wobei RNA in der wässrigen Phase, Proteine dagegen in der organischen Phase verbleiben, und sich DNA und zelluläre Restbestandteile zwischen den beiden Phasen ansammeln. Die wässrige Phase kann isoliert und die enthaltene RNA mit Isopropylalkohol präzipitiert werden. Bei allen Schritten muss beachtet werden, dass die RNA leicht durch in der Umgebung vorhandene RNAsen zersetzt werden kann. Daher werden nur direkt vorher autoklavierte Reaktionsgefäße benutzt und statt des gebräuchlichen destillierten Wassers Diethyl-pyrocbonat (DEPC) -Wasser verwendet, welches RNAsen inaktiviert.

Zunächst wurden etwa 50mg gefrorenes Gewebe aus der Herzspitze der nach Ischämie und Reperfusion entnommenen Herzen mit einem in DEPC-Wasser gereinigten Homogenisierungsstab (Ultra Turrax Stab, Janke&Kunkel–IKA Labortechnik, Staufen, BRD) in 1ml Trizol-Reagenz (TRIzol®Reagent, invitrogen, Karlsruhe) 10 bis 20 Sekunden lang homogenisiert und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Für die Phasenseparation wurden 200µl Chloroform (Trichlormethan/Chloroform, Carl Roth, Karlsruhe, BRD) zur Probe pipettiert, die Probe kräftig geschüttelt, 2-3 Minuten inkubiert und dann über 15 Minuten bei 10000 Umdrehungen pro Minute und 4°C zentrifugiert (Zentrifuge: Biofuge fresco, Heraeus, Hanau, BRD). Die wässrige Phase wurde anschließend abpipettiert und mit ihr der Trennschritt mit Chloroform noch zweimal wiederholt. Für die RNA-Präzipitation wurden 0,5ml Isopropanol (2-Propanol getrocknet, Merck, Darmstadt, BRD) zur Probe gegeben, diese geschüttelt, 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und dann über 10 Minuten bei 10000 Umdrehungen pro Minute und 4°C zentrifugiert. Vom erhaltenen RNA-Pellet wurde der Überstand vorsichtig abpipettiert und das Pellet gewaschen, indem 1ml 75%ige Ethanol-Lösung (Ethanol absolute, J.T. Baker, Mallinckrodt Baker, Griesheim, BRD; verdünnt in DEPC-Wasser) zugegeben und mit dem Pellet vermischt wurden. Danach wurde die Probe über 10 Minuten bei 13000 Umdrehungen pro Minute und 4°C zentrifugiert und der Überstand abpipettiert. Das Pellet wurde bei Raumtemperatur getrocknet und in 10µl DEPC-Wasser rekonstituiert. Abschließend wurde die RNA quantifiziert, indem mit einem Photometer (Ultrospec 3100 pro, GE Healthcare

Europe, München, BRD) die Konzentration der in der jeweiligen Probe enthaltenen RNA bestimmt wurde.

2.5.2 cDNA-Herstellung

Aus RNA kann mithilfe der Reversen Transkriptase die zu ihr komplementäre DNA hergestellt werden. Bei der Reversen Transkriptase handelt es sich um eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, die ausgehend von Start-Oligonukleotiden (Primern) aus Nucleotiden das Gegenstück einer vorgegebenen RNA zusammensetzt. Je nach verwendeten Primern kann so eine bestimmte RNA umgeschrieben werden oder, bei Zugabe unspezifischer Primer, die cDNA der gesamten RNA einer Gewebeprobe hergestellt werden. Da die RNA mehrfach als Vorlage für die cDNA-Bildung dienen kann, wird gleichzeitig mit der Umschreibung das vorgegebene genetische Material amplifiziert (s. Abb. 9).

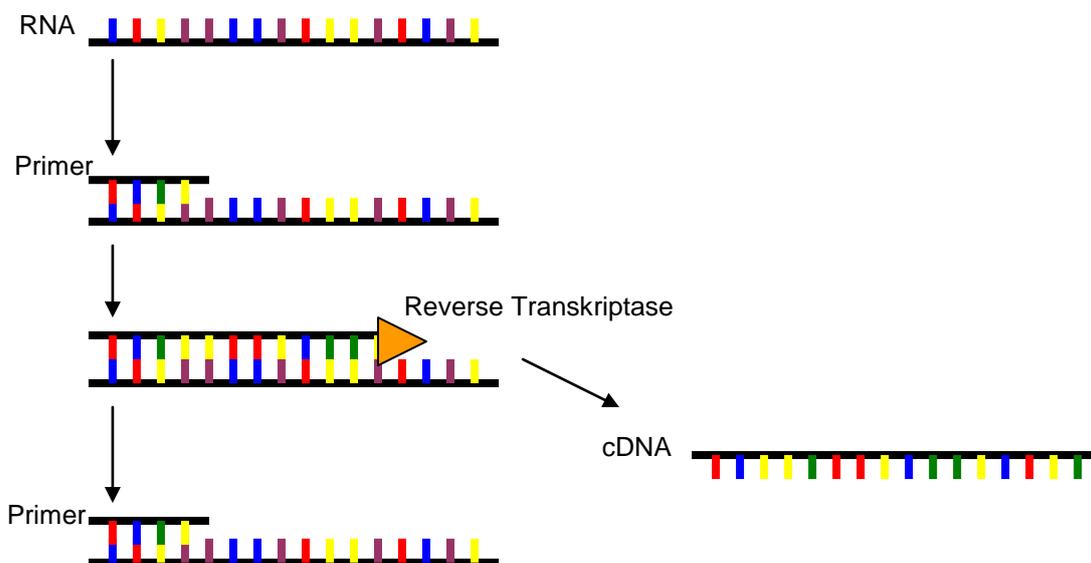


Abb. 9: Schema der Herstellung von cDNA. An die RNA können zugegebene Primer binden, spezifische für die Umschreibung einer bestimmten RNA oder unspezifische für die Umschreibung der gesamten vorgelegten RNA-Probe. Die Reverse Transkriptase baut ausgehend von den Primern aus zugegebenen Nucleotiden die cDNA nach dem Muster der vorgegebenen RNA zusammen. Dieselbe RNA kann mehrmals als Vorlage für die Reverse Transkriptase dienen.

Pro Probe wurden 1µg RNA, 1µl dNTPs (PCR Nucleotide Mix, Promega, Mannheim, BRD) und 1µl Random Primers (random hexamers, invitrogen, Karlsruhe, BRD) in ein PCR-Reaktionsgefäß gegeben und das Gemisch mit

DEPC-Wasser auf 10µl aufgefüllt. Zuerst wurde das Gemisch in einer PCR-Maschine (Mastercycler gradient, eppendorf, Hamburg, BRD) für 5 Minuten auf 65°C erhitzt, dann 1 Minute lang auf Eis gekühlt. Anschließend wurden zu jeder Probe 4µl 5xRT-Puffer (M-MLV RT 5 x Buffer, Promega, Mannheim, BRD), 4µl steriles Wasser und 1µl RNAsin (Promega, Mannheim, BRD) gegeben und das Gemisch für 2 Minuten bei 25°C erwärmt. Nach Zugabe von 1µl Reverser Transkriptase (M-MLV RT H(-) Point, Promega, Mannheim, BRD) wurden die Proben zunächst 10 Minuten auf 15°C, dann 50 Minuten auf 42°C und schließlich 15 Minuten auf 70°C erhitzt. Nachdem die Proben wieder aus Eis gekühlt waren, wurde je 1µl RNase H (Promega, Mannheim, BRD) zugegeben und noch einmal für 20 Minuten auf 37°C erhitzt.

2.5.3 Realtime-PCR

Hierbei wird die vorhandene DNA mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) vervielfältigt, wobei das Realtime-Verfahren zusätzlich noch eine Quantifizierung der DNA ermöglicht. Die PCR verläuft grundsätzlich nach folgendem Prinzip: zunächst wird bei 94°C die DNA denaturiert und jeder noch laufende enzymatische Prozess abgebrochen. Danach wird auf 54°C gekühlt, so dass zugegebene Primer an die DNA binden können. Die Primer werden je nach zu untersuchendem Gen ausgewählt und entsprechen dem 3'- und dem 5'-Ende dieses Gens. Von den Primern aus setzt die Polymerase bei 72°C zugegebene dNTPs zu einer Kopie der vorhandenen DNA zusammen. Über mehrere solche Zyklen aus Denaturierung, Primer-Annealing und DNA-Extension steigt die Menge der vorhandenen DNA exponentiell an (siehe Abb. 10)

Bei der Realtime-PCR wird zusätzlich noch eine spezifische Sonde zugegeben. Diese Sonde besteht aus einer gegengleichen Sequenz des zu untersuchenden Zielgens und trägt zusätzlich am 3'-Ende einen Quencherfarbstoff und am 5'-Ende einen Reporterfarbstoff. Wird die Sonde durch Licht der Wellenlänge 488nm angeregt, so wird die fluoreszierende Emission des Reporterfarbstoffs durch den Quencherfarbstoff über Fluoreszenz-Energietransfer (FRET) unterdrückt. Kommt es während der PCR-Reaktion zu einer Hybridisierung

zwischen Sonde und Zielgen, so können Exonukleasen die Farbstoffe abtrennen, woraufhin der Reporterfarbstoff Fluoreszenz emittiert, da er sich nicht mehr in räumlicher Nähe zum Quencherfarbstoff befindet (siehe Abb. 11).

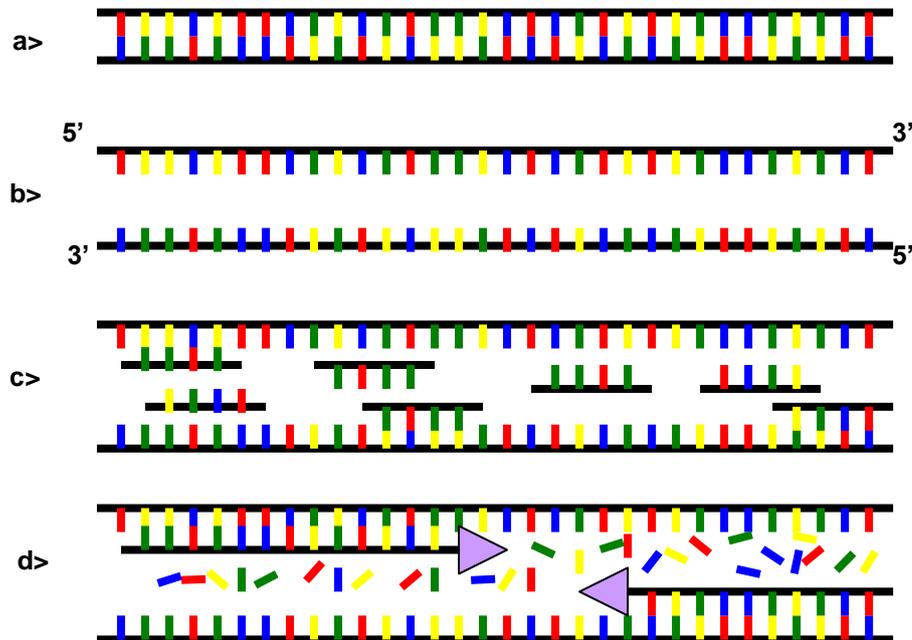


Abb. 10: Schematische Darstellung der PCR.

- a> Ausgangspunkt ist ein vorgegebener DNA-Doppelstrang.
- b> Bei 94°C wird die DNA denaturiert und in Einzelstränge aufgeteilt.
- c> Bei 54°C binden zugegebene Primer an den komplementären Abschnitten der Einzelstrang-DNA (Annealing).
- d> Bei 72°C ergänzt die Polymerase mit zugegebenen Nucleotiden die Einzelstränge zu Doppelsträngen, so dass nach Abschluss eines Reaktionszyklus die doppelte Menge DNA vorliegt. Diese DNA kann im nächsten Zyklus erneut verdoppelt werden, so dass die DNA-Menge exponentiell ansteigt.

Mit dem exponentiellen Anstieg der durch PCR amplifizierte DNA steigt somit auch die Stärke des Fluoreszenzsignals an. Es wird gemessen, wann das Fluoreszenzsignal zum ersten Mal eine bestimmte Schwelle überschreitet, und die entsprechende Zykluszahl als sog. CT-Wert angegeben. Da die DNA-Menge umso früher ansteigt, je mehr DNA in der Ausgangsprobe vorhanden war, überschreitet auch das Fluoreszenzsignal das Grundrauschen umso früher, je mehr DNA des Zielgens in der Probe enthalten war. Demnach kann aus dem CT-Wert rückgeschlossen werden, dass umso mehr DNA des Zielgens in der Ausgangsprobe vorhanden war, je niedriger der CT-Wert ausfällt (siehe Abb. 12).

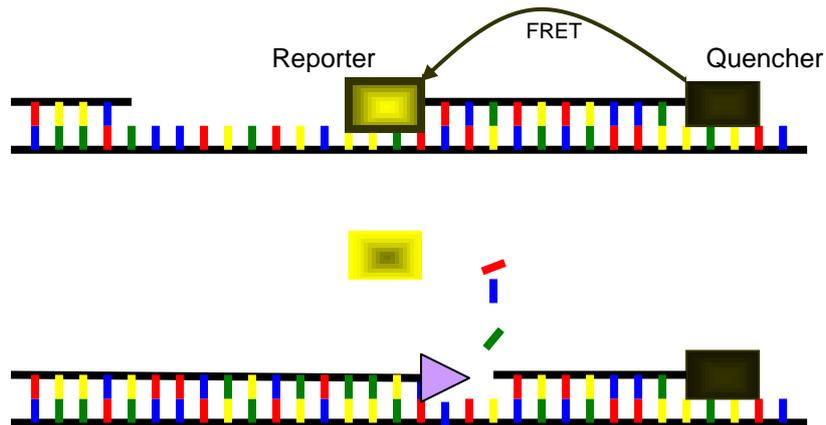


Abb. 11: Schematische Darstellung der Realtime-PCR. Zur vorgegebenen DNA wird eine Sonde gegeben, die komplementär zum vervielfältigten Zielgen ist und am 5'-Ende einen Reporterfarbstoff, am 3'-Ende einen Quencherfarbstoff trägt. Ist die Sonde intakt, so wird bei Anregung durch Licht der Wellenlänge 488nm die Emission des Reporters durch den Quencher unterdrückt. Wird während der PCR-Reaktion die räumliche Nähe zwischen Reporter und Quencher aufgehoben, so kann der Reporterfarbstoff ein Fluoreszenzsignal emittieren, dessen Anstieg aufgezeichnet werden kann und als Maß für die amplifizierte DNA dient.

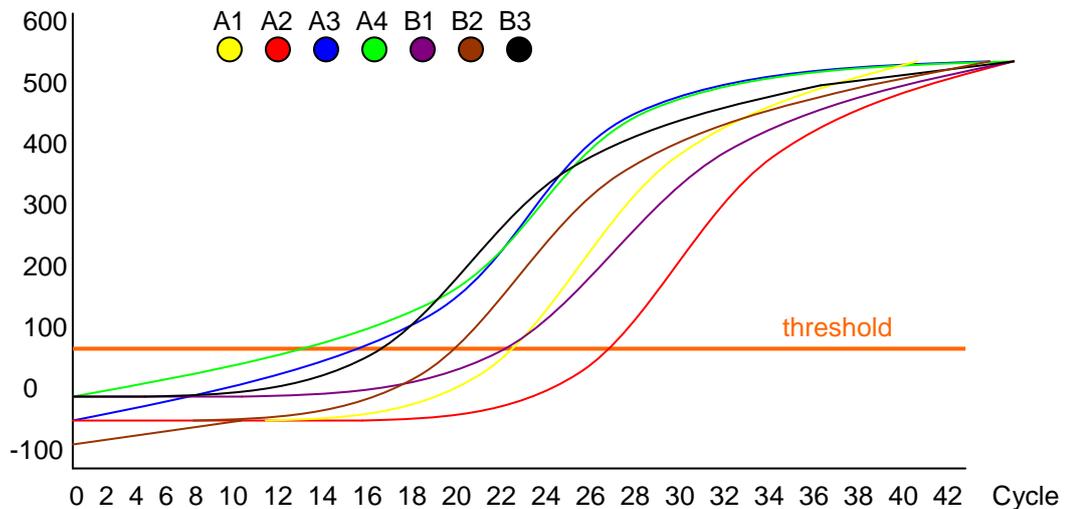


Abb. 12: CT-Wert-Bestimmung bei der Realtime-PCR. Der Anstieg der Fluoreszenz in den unterschiedlichen Proben (hier A1 bis B3) wird aufgezeichnet und gemessen, bei welcher Zykluszahl die Fluoreszenz zum ersten Mal das Grundrauschen, markiert durch den threshold-Wert, überschreitet. Diese Zykluszahl wird als CT-Wert festgehalten. Je mehr DNA in der Ausgangsprobe vorhanden war, desto früher steigt die Fluoreszenz an und desto geringer ist demnach der CT-Wert. Im hier gezeigten Beispiel überschreitet die Fluoreszenz in der Probe A4 als erstes nach dreizehn Zyklen den threshold. Die Probe A2 benötigt dagegen 27 Zyklen, bis die Fluoreszenz über das Grundrauschen ansteigt. Demnach enthält die Probe A4 (CT-Wert = 13) am meisten, die Probe A2 (CT-Wert = 27) am wenigsten Ziel-DNA.

Eine quantitativ genauere Aussage ist möglich, wenn zusätzlich zu den interessierenden Proben eine Standardreihe mit in die Realtime-PCR-Reaktion einbezogen wird. Dazu wird eine Probe bekannter DNA-Konzentration mehrfach verdünnt und die einzelnen Verdünnungen in der Realtime-PCR-Reaktion mitgemessen. Dadurch entsteht eine Standardreihe bekannter Konzentrationen, auf der die Ergebnisse der zu untersuchenden Proben eingeordnet werden können. So erhält man absolute Konzentrationswerte anstelle der relativen Vergleichswerte der CT-Wert-Bestimmung (siehe Abb. 13).

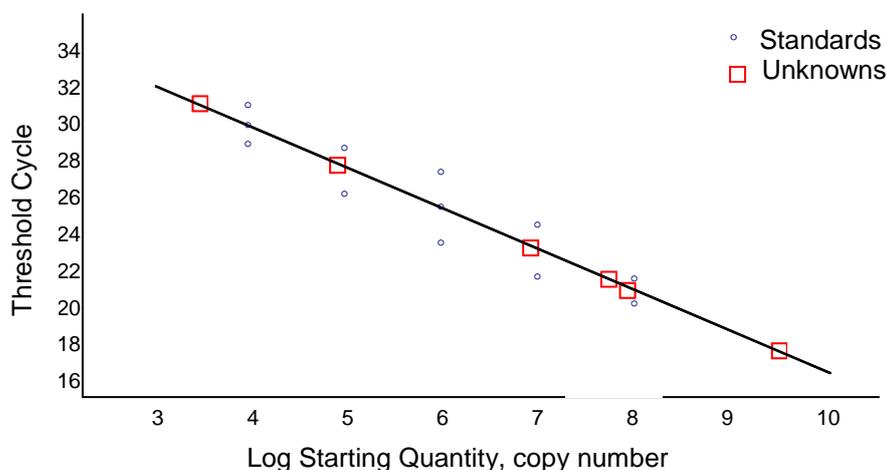


Abb. 13: Quantitative Konzentrationsbestimmung bei der Realtime-PCR mittels Standardreihe. Zusätzlich zu den untersuchten Proben (Unknowns) werden Standards mit bekannter Konzentration (z.B. 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 und 10^8 mol) mit in die Realtime-PCR miteinbezogen. Aus den erhaltenen CT-Werten und den Konzentrationen der Standards kann eine Standardkurve erstellt werden, auf der dann die zu untersuchenden Proben anhand ihrer CT-Werte eingeordnet werden können. Damit lassen sich die absoluten Konzentrationswerte der Proben von der Kurve ablesen.

Um die Ergebnisse der einzelnen untersuchten Proben miteinander vergleichbar machen zu können, müssen sie an einem sog. Housekeeping-Gen normiert werden. Housekeeping-Gene sind Gene, deren Produkte in jeder Zelle proportional zur Gesamtproteinproduktion hergestellt werden. Produziert eine Zelle viel RNA, so produziert sie auch viel Housekeeping-Genprodukt. Produziert die Zelle hingegen wenig RNA, so wird auch wenig Housekeeping-Genprodukt hergestellt. Indem man die Ergebnisse, die für die Konzentrationen der Zielgen-Produkte erhalten wurden, auf die Ergebnisse für die

Housekeeping-Gene bezieht, erhält man absolute Werte, die unabhängig von der Gesamtproteinproduktion der jeweiligen Gewebeprobe sind und miteinander verglichen werden können. Dazu zieht man die CT-Werte der Housekeeping-Gene von denen der Zielgene ab, bzw. teilt bei Verwendung einer Standardreihe die Konzentrationswerte der Ziel-DNA durch die der Housekeeping-DNA. Ein Protein, dessen DNA gut als Housekeeping-Gen verwendet werden kann, ist z.B. das 18S-Protein.

Für die Realtime-PCR in der vorliegenden Arbeit wurden Standardreihen für TNF- α und 18S hergestellt, die jeweils Proben mit 10^9 , 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 und 10^4 Mol enthielten. Jeweils 5 μ l dieser Proben, sowie der Proben, die durch die cDNA-Herstellung erhalten worden waren, wurden mit je 1,25 μ l ABI Sondenmix (Murine Tnf alpha (probe dye FAM), Applied Biosystems, Applera, Darmstadt, BRD, bzw. Eukaryotic 18SrRNA endogenous control (probe dye VIC), Applied Biosystems, Applera, Darmstadt, BRD), 12,5 μ l Master Mix (iQTM Supermix, BIO-RAD Laboratories, München, BRD) und 6,25 Wasser versetzt und in Dreifachbestimmung in die Wells einer Realtime-PCR-Platte pipettiert. In einem iCycler (BIO-RAD Laboratories, München, BRD) wurde danach die Realtime-PCR durchgeführt.

Vor der eigentlichen Analyse wurden die erhaltenen Werte miteinander verglichen. Da für jede Probe drei Werte bestimmt wurden, konnte beurteilt werden, ob die Werte in etwa im selben Bereich liegen. Nach Ausschluss von Ausreißerwerten wurde der Mittelwert der Dreifachbestimmung errechnet und für die weitere Auswertung verwendet. Hierbei wurden die CT-Werte der 18S-Bestimmung von denen der TNF- α -Bestimmung abgezogen, bzw. die Konzentrationswerte der TNF- α -Bestimmung durch die der 18S-Bestimmung dividiert.

Für die statistische Auswertung der Ergebnisse, wie auch für die Auswertung aller anderen Ergebnisse, wurde das StatView Statistik-Programm verwendet (Abacus Concepts, Inc., Berkeley, CA, USA).

3. Ergebnisse

Insgesamt wurden bei 60 Mäuse die Herzkranzarterien ligiert, 30 5-Lipoxygenase (LOX)-KO-Mäuse und 30 Wildtyp-Mäuse. Die erfolgreiche Operation wurde anhand von EKG-Aufzeichnungen überprüft (siehe Abb. 14).

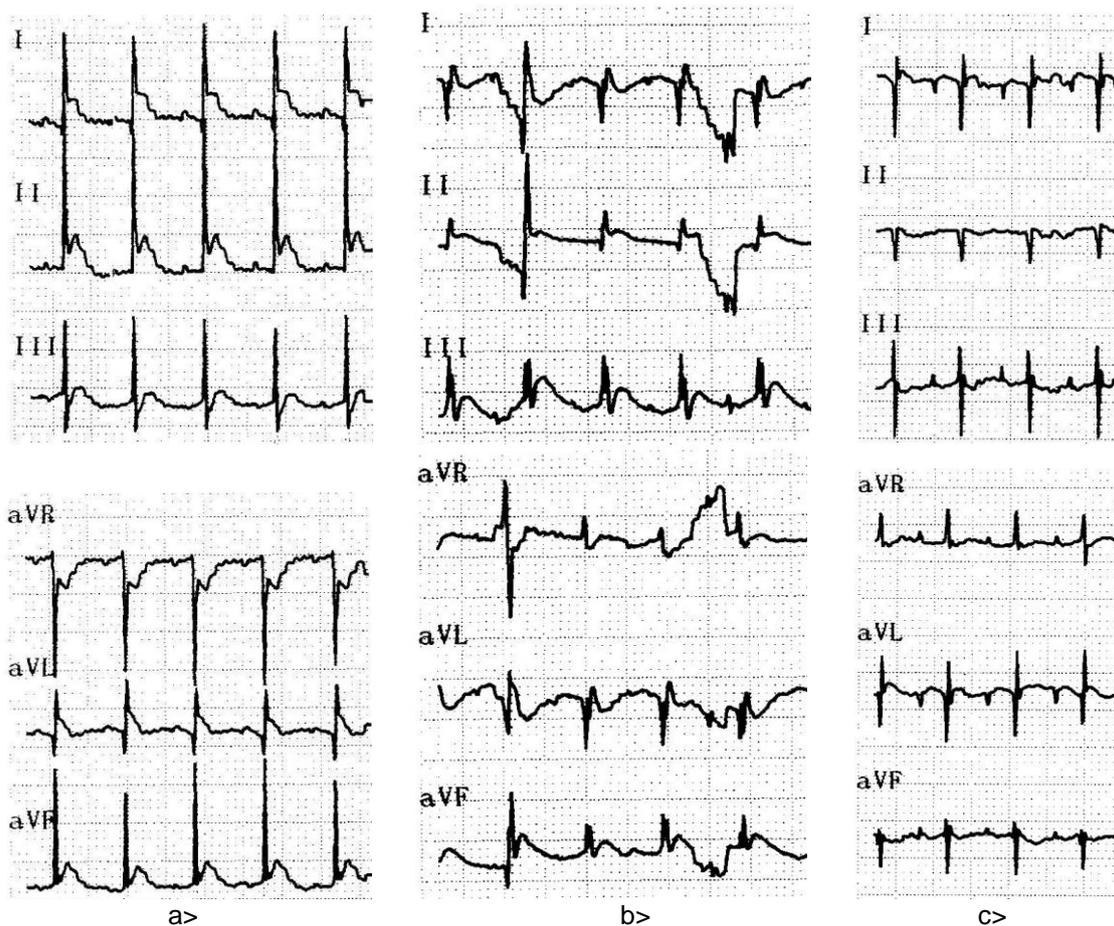


Abb. 14: EKG-Aufzeichnungen während Ischämie und Reperfusion am Mäuseherz

- a> Unmittelbar nach Ischämiebeginn
- b> Unmittelbar vor Ischämieende (30 Minuten nach Ischämiebeginn)
- c> Nach Reperfusion

Der Beginn der Ischämie äußert sich durch ST-Hebungen, hier besonders in den Ableitungen I, II und aVL zu sehen. Die mit Dauer der Ischämie zunehmende Unregelmäßigkeit des EKGs geht mit Einsetzen der Reperfusion zurück. In I, II und aVL sind jetzt Q-Zacken als Zeichen der vorangegangenen Ischämie zu sehen.

Während der Operation verstarben acht 5-LOX-KO-Mäuse und zehn Wildtyp-Mäuse. Von den verbleibenden Mäusen konnten für die Infarktgrößenbestimmung die Herzen von zehn 5-LOX-KO-Mäusen und sieben Wildtypmäusen verwendet werden. Je fünf Herzen konnten für die Bestimmung

der Entzündungsparameter (Einwanderung neutrophiler Granulozyten und TNF- α -Expression) herangezogen werden. Für alle Auswertungen wurden Mittelwerte und Standardfehler der jeweils erhobenen Größen berechnet und die absoluten Unterschiede zwischen den beiden Versuchstiergruppen mit einer ANOVA bestimmt. Es wurde von einer statistischen Signifikanz der Unterschiede ausgegangen, wenn im zweiseitigen Test $p < 0,05$ war.

Infarktgrößenbestimmung

Nach 30 Minuten Ischämie durch Okklusion der linken vorderen absteigenden Herzkranzarterie und 24 Stunden Reperfusion wurden die Größe des ischämischen Areals gemessen (Area at risk, AAR), sowie der Anteil von vitalem und abgestorbenem Gewebe (Infarktanteil).

Beim Ausmaß der Area at risk zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den 5-LOX-KO-Mäusen und den Wildtyp-Mäusen. Bei den 5-LOX-KO-Mäusen bewegte sich der Anteil der AAR am linken Ventrikel um 35,9% ($\pm 1,5\%$), bei den Wildtyp-Mäusen um 35,1% ($\pm 2,1\%$) (siehe Abb. 15).

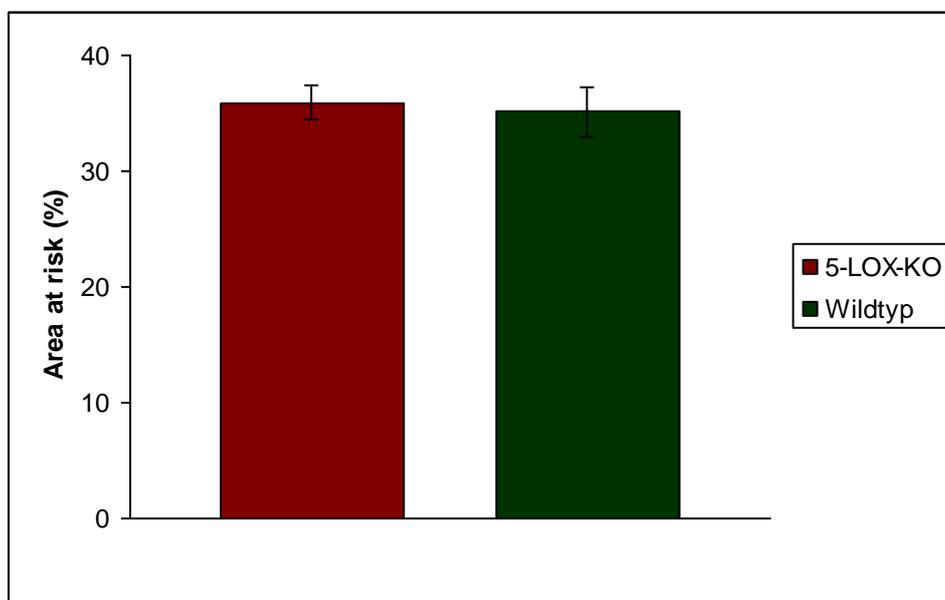


Abb. 15: Prozentualer Anteil der Area at risk am linken Ventrikel. Es ergibt sich kein signifikanter Unterschied zwischen 5-LOX-KO-Mäusen (35,9% \pm 1,5%) und Wildtyp-Mäusen (35,1% \pm 2,1%).

Auch das Ausmaß des Infarktanteils an der Area at risk war bei 5-LOX-KO-Mäusen und Wildtyp-Mäusen vergleichbar. Bei den 5-LOX-KO-Mäusen betrug der Infarktanteil 55,8% ($\pm 6,6\%$), bei den Wildtyp-Mäusen 61,7% ($\pm 3,9\%$) (siehe Abb. 16, $p = n.s.$).

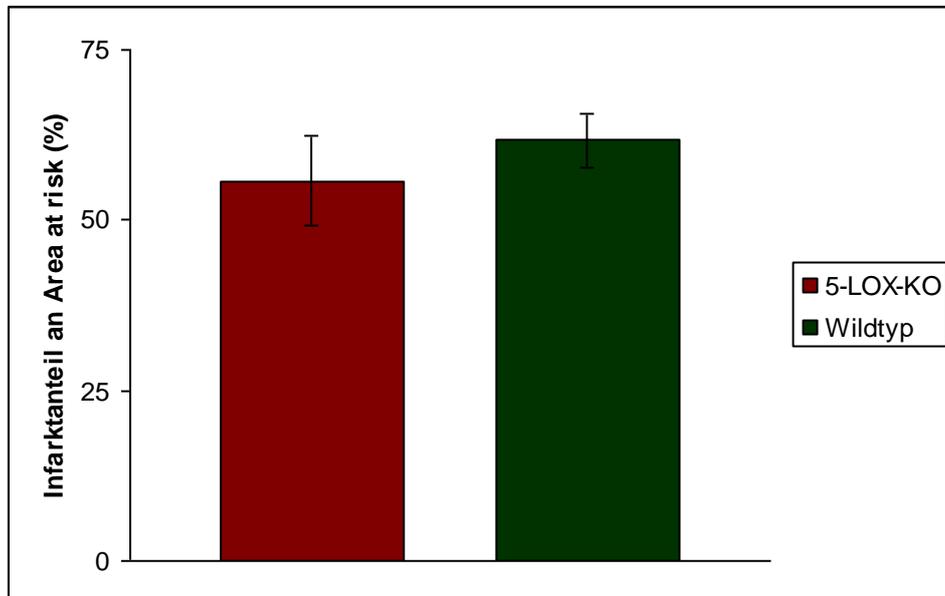


Abb. 16: Prozentualer Anteil des Infarkts an der Area at risk. Es ergibt sich kein signifikanter Unterschied zwischen 5-LOX-KO-Mäusen (55,8% \pm 6,6%) und Wildtyp-Mäusen (61,7% \pm 3,9%).

Einwanderung neutrophiler Granulozyten

Nach 30 Minuten Ischämie und 24 Stunden Reperfusion wurden die in das reperfundierte Myokardgewebe eingewanderten neutrophilen Granulozyten angefärbt und ausgezählt. Im Gegensatz zur Infarktgröße ergab sich hier ein signifikanter Unterschied zwischen 5-LOX-KO-Mäusen und Wildtyp-Mäusen. Bei den 5-LOX-KO-Mäusen wurden 613 eingewanderte Neutrophile gezählt (± 30), bei den Wildtyp-Mäusen 374 (± 59) (siehe Abb. 17, $p = 0,006$).

TNF- α -Expression

Nach 30 Minuten Ischämie und 24 Stunden Reperfusion wurde das Ausmaß der Expression des Entzündungsmarkers TNF- α im reperfundierten Gewebe bestimmt und an der Expression von 18S normiert. Das Verhältnis von TNF- α -

zu 18S-Expression war nicht signifikant unterschiedlich und betrug für die 5-LOX-KO-Mäuse $3,4 (\pm 0,94)$, für die Wildtyp-Mäuse $1,4 (\pm 0,19)$ (siehe Abb. 18).

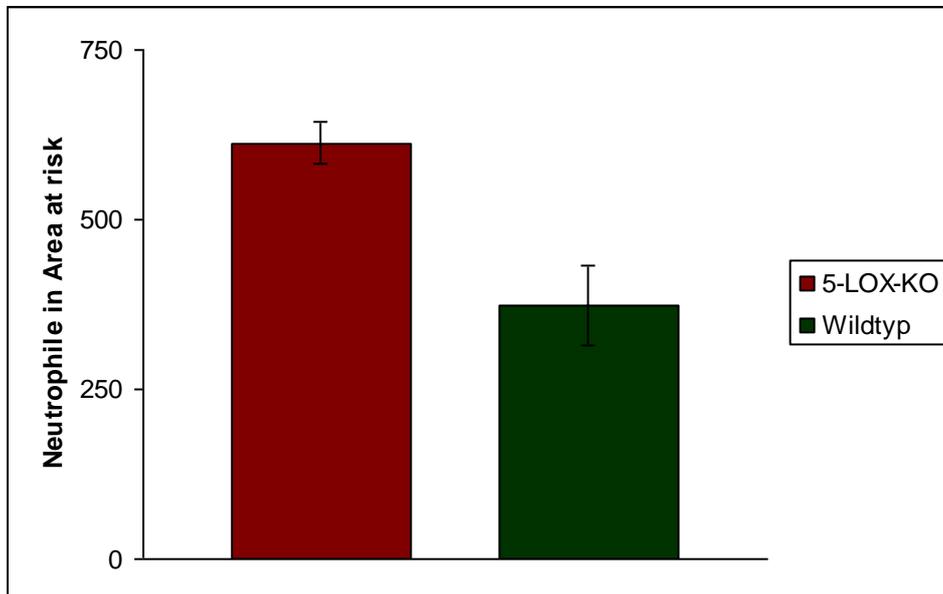


Abb. 17: Anzahl neutrophiler Granulozyten in der Area at risk. Der Unterschied zwischen den 5-LOX-KO-Mäusen (613 ± 30) und den Wildtyp-Mäusen (374 ± 59) ist signifikant mit $p = 0,006$.

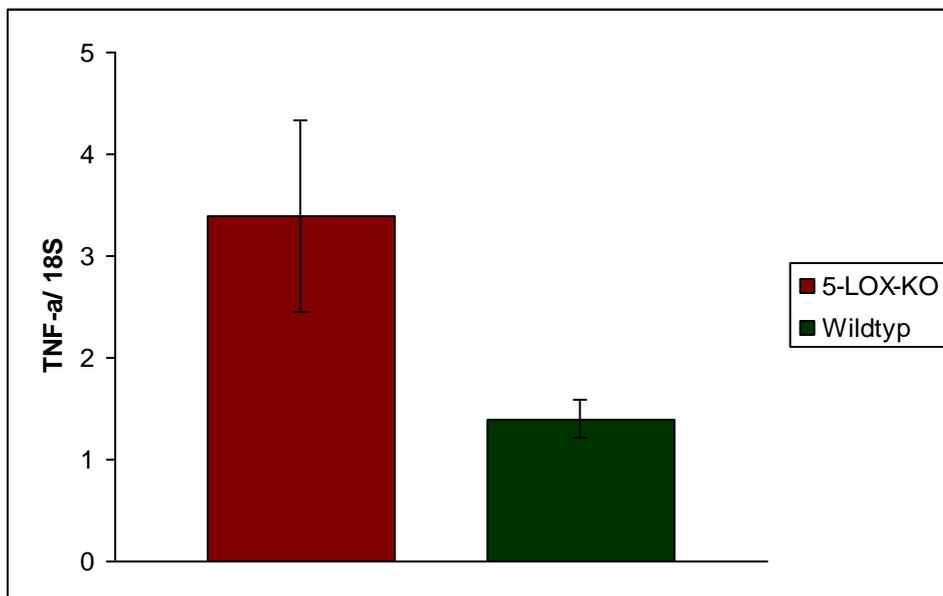


Abb. 18: Verhältnis von TNF-a-Expression zu 18S-Expression. Der Unterschied zwischen 5-LOX-KO-Mäusen ($3,4 \pm 0,94$) und Wildtyp-Mäusen ($1,4 \pm 0,19$) ist nicht signifikant.

4. Diskussion

In der vorliegenden Studie sollte mit Hilfe eines Maus-Modells herausgefunden werden, ob durch eine Ausschaltung der Leukotriene ein signifikanter Effekt auf die pathogenetischen Ereignisse nach Ischämie und Reperfusion im Herzmuskel zu erreichen ist. Bei einem Vergleich zwischen 5-Lipoxygenase-KO Mäusen und Wildtyp-Mäusen zeigte sich nach Ischämie und Reperfusion kein Unterschied in der Größe des resultierenden Infarktes und auch kein Unterschied in der Expression des Entzündungsmarkers TNF- α . Allerdings konnte ein deutlicher Unterschied in der Infiltration des reperfundierten Gewebes mit neutrophilen Granulozyten nachgewiesen werden. Bei 5-Lipoxygenase-KO-Mäusen zeigten sich im reperfundierten Gewebe weitaus mehr eingewanderte Neutrophile als im entsprechenden Gewebe der Wildtyp-Mäuse.

Vorausgegangene Studien hatten gezeigt, dass nach Myokardischämie vermehrt Leukotriene gebildet werden, woraus auf ihre Bedeutung für die pathophysiologischen Prozesse nach der Ischämie geschlossen wurde. Sasaki et al untersuchten z.B. im Tiermodell an der Ratte die Mengen an Leukotrien B₄ im Herzgewebe nach Okklusion der linken Herzkranzarterie. Gegenüber nichtischämischen Herzen fanden sie bis zu achtfach erhöhte Leukotrienkonzentrationen in Herzen nach Myokardinfarkt und folgerten daraus, dass die Leukotriene an der Reaktion des Herzens auf Ischämie maßgeblich beteiligt sein müssten (Sasaki et al, 1988). In einer klinischen Studie untersuchten Carry et al die Leukotrienausscheidung im Urin bei Patienten mit ischämischen Herzerkrankungen im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe. Sie fanden deutlich erhöhte Mengen, insbesondere von Leukotrien E₄, bei Patienten mit instabiler Angina pectoris und akutem Myokardinfarkt, und zogen daraus den Schluss, dass die Leukotriene während ischämischer Episoden im Herzmuskel freigesetzt werden und maßgeblich an den weiteren pathophysiologischen Entwicklungen im Herzen beteiligt sind. Ihre Folgerung war, dass in der Hemmung der Leukotrien-Biosynthese erhebliches therapeutisches Potential läge, insbesondere bei der Begrenzung von

Myokardschaden und funktionellen Ausfällen nach Ischämie im Herzen (Carry et al, 1992). Im Hinblick auf diese Studien hätte erwartet werden können, dass bei 5-Lipoxygenase-KO-Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen ein deutlicher Unterschied in der Reaktion auf Koronarischemie zu sehen ist.

Außerdem hatten Studien mit Inhibitoren der 5-Lipoxygenase bzw. der Leukotriene teilweise nachweisbare positive Effekte auf den Herzmuskel nach Ischämie gezeigt. Bednar et al untersuchten z.B. das antithrombotische Therapeutikum Nafazatrom, dessen hemmende Wirkung auf den Arachidonsäure-Metabolismus über die 5-Lipoxygenase bereits an einer Melanom-Zelllinie nachgewiesen wurde (Honn & Dunn, 1982). Die Autoren konnten einen positiven Effekt von Nafazatrom aufzeigen und darstellen, dass bei Hunden, die mit Nafazatrom behandelt worden waren, kleinere Infarktgrößen auftreten (Bednar et al, 1985). Fiedler zeigte außerdem, dass der Effekt der kleineren Infarkte auch bei Ratten und Kaninchen repliziert werden kann (Fiedler, 1983a und b, 1984). Mullane et al untersuchten die Wirkung von REV-5901, einem spezifischen Inhibitor der 5-Lipoxygenase, der zusätzlich an Endorganen wie z.B. dem Herz als Antagonist der Leukotriene fungiert. Nach Koronarokklusion und Reperfusion bei anästhesierten Hunden zeigte sich eine reduzierte Infarktgröße nach vorausgehender Behandlung mit REV-5901 im Gegensatz zu den Herzen der unbehandelten Hunde (Mullane et al, 1987). Auch Sasaki et al fanden einen positiven Effekt bei der Überprüfung eines selektiven 5-Lipoxygenase-Inhibitors an Ratten. Eine einzige orale Dosis des Inhibitors AA-861, die vor der Okklusion der linken Herzkranzarterie gegeben wurde, reichte aus, um die Infarktgröße um 34,4% zu verringern (Sasaki et al, 1988). Bei Betrachtung dieser Studien ist es eher überraschend, dass bei Ausschaltung der 5-Lipoxygenase in KO-Mäusen ein kardioprotektiver Effekt ausbleibt.

Andererseits konnten auch z.B. Maxwell et al keinen positiven Effekt eines Inhibitors der Leukotrien-Biosynthese finden. Sie untersuchten an Hunden, ob durch die Infusion von BW A4C, einem selektiven Hemmer der 5-Lipoxygenase, vor der Okklusion der linken vorderen absteigenden Herzkranzarterie ein langsames Fortschreiten des Myokardschadens durch Ischämie zu erreichen

sei. Weder beim regionalen myokardialen Blutfluss noch bei der Infarktgröße zeigte sich ein Unterschied zwischen behandelten und unbehandelten Tieren (Maxwell et al, 1991). Shekher und Singh untersuchten den Effekt von FPL-55712, einem Leukotrien-Rezeptor-Antagonist, bei Ischämie und Reperfusion an isolierten Rattenherzen und an intakten Rattenherzen in vivo. Zwar zeigten sich an den isolierten Herzen positive Effekte des Antagonisten, bei den Herzen in vivo ließ sich die Infarktgröße jedoch nicht durch FPL-55712-Gabe verkleinern (Shekher und Singh, 1997). Hahn et al überprüften LY266283, einen selektiven Antagonisten des Leukotrien B₄ Rezeptors, bezüglich seines Effekts auf die Infarktgröße bei Hunden, fanden aber ebenfalls keine verringerte Wirkung (Hahn et al, 1990). Das Ausbleiben eines kardioprotektiven Effekts bei 5-Lipoxygenase-KO-Mäusen würde sich demnach im Rahmen dieser Untersuchungsergebnisse erklären lassen.

Um so erstaunlicher ist es allerdings, dass sich bei den 5-Lipoxygenase-KO-Mäusen nicht nur kein Effekt auf die Infarktgröße zeigen ließ, sondern sogar eine Erhöhung der Entzündungsparameter im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen. Die Anzahl in das reperfundierte Gewebe eingewanderter neutrophiler Granulozyten war bei den KO-Tieren signifikant höher, und auch die Mengen von exprimiertem TNF- α zeigten höhere Werte. Hier liegt also nicht nur kein positiver Effekt des Gen-knockouts vor, vielmehr scheint die akute Entzündungsreaktion sogar gefördert zu werden.

Das besonders auffällige Ergebnis bei der Anzahl eingewanderter Neutrophiler erfordert eine genauere Betrachtung der Rolle dieser Zellen bei Ischämie und Reperfusion des Myokards und ihrer Beziehung zu den Leukotrienen. Neutrophile Granulozyten sind normalerweise ein wichtiger Bestandteil der Immunabwehr des Organismus, da sie in der Lage sind, eingedrungene Pathogene zu suchen, zu erkennen und zu zerstören. Bei Ischämie und Reperfusion des Myokards senden allerdings Endothelzellen und Kardiomyozyten ähnliche Signale aus wie z.B. bei einer Infektion, so dass sich die Reaktion der Neutrophilen gegen diese körpereigenen Zellen wendet (Mullane et al, 1988). Neutrophile können mehr als 20 proteolytische Enzyme exprimieren, die in der Folge besonders die extrazelluläre Matrix der Umgebung

zersetzen. Außerdem sind Neutrophile Hauptproduzenten reaktiver Sauerstoff-Spezies, wie z.B. des Superoxid-Anions. Dieses Anion kann zu Wasserstoffperoxid, Hydroxylradikalen oder Hypochlorsäure umgewandelt werden, die wiederum fähig ist, toxische Chloramine zu bilden. Alle diese reaktiven Substanzen sind in der Lage, umliegendes Gewebe anzugreifen und zu zerstören, und werden hauptsächlich für den Schaden nach Myokardischämie verantwortlich gemacht (Saeed et al, 2005). Die schädigende Wirkung wird verstärkt durch die Beteiligung der Neutrophilen an der Entstehung endothelialer Ödeme und die Freisetzung proteolytischer Enzyme (Siminiak & Ozawa, 1993). Der durch die Neutrophilen ausgelöste Entzündungsprozess ist daher zwar einerseits notwendig, um den folgenden Umbau des Infarktgewebes in eine stabile Narbe einzuleiten, andererseits aber auch Hauptursache von Gewebeerstörung und Myokardschaden unmittelbar nach Myokardinfarkt (Vinten-Johansen, 2004). Entsprechend konnte eine direkte positive Korrelation zwischen der Granulozytenzahl und der Schwere des Krankheitsbilds nachgewiesen werden (Ricevuti et al, 1991). In verschiedenen Tiermodellen erwies sich, dass die Entfernung von Neutrophilen aus dem Blutstrom zu einer deutlichen Abnahme der Infarktgröße führt (Romson et al, 1983, Frangogiannis, 2002). Mit Relevanz für die Klinik wurde auch gezeigt, dass eine besonders reliable prädiktive Aussage bezüglich eines überdurchschnittlich hohen Risikos, an einem Herzinfarkt zu versterben, aus der erhöhten Anzahl neutrophiler Granulozyten zu gewinnen ist (Horne et al, 2005). Daraus wurde der Schluss gezogen, dass durch eine Hemmung der Neutrophileninvasion eine verbesserte Therapie bei Myokardinfarkt entwickelt werden kann (Wysocki, 1992).

Bevor sich die neutrophilen Granulozyten an der Entwicklung der Entzündungsreaktion nach Ischämie und Reperfusion beteiligen, müssen sie erst in das reperfundierte Gewebe gelangen. Dies geschieht durch Chemotaxis über verschiedene Signalstoffe. Zu diesen Signalstoffen gehören der Komplementfaktor 5a (C5a), Platelet activating factor (PAF), Interleukine und Zytokine, vor allem aber auch Tumor necrosis factor alpha (TNF- α) und Leukotrien B₄, das direkt in Kardiomyozyten und Endothelzellen gebildet

werden kann (Vermeiren et al, 2000). Einmal an Ort und Stelle können die Neutrophilen selbst große Mengen von Leukotrien B₄ bilden, die Chemotaxis aufrechterhalten und weitere Neutrophile in das betroffene Gewebe locken (Ford et al, 1980). Insgesamt stellt sich Leukotrien B₄ so als stärkster Anziehungsfaktor für Neutrophile dar (Ford-Hutchinson, 1990). Auch die Degranulation der neutrophilen Granulozyten im Gewebe wird u.a. durch Leukotrien B₄ ausgelöst, was durch einen spezifischen LTB₄-Rezeptor auf der Neutrophilenmembran geschieht (Lewis et al, 1990). Vor allem spricht aber die Tatsache, dass in ischämischem Gewebe zuerst die Leukotrien-Konzentration ihren Höhepunkt erreicht und danach maximale Neutrophilen-Infiltration und – Wirkung gemessen werden können, für eine kausale Beziehung zwischen Leukotrien-Synthese und Neutrophileneinwanderung bzw. –wirkungsentfaltung (Williams, 1996). Die Bedeutung der Leukotriene in diesem Prozess geht sogar soweit, dass sich Varianten des Leukotrien-Gens identifizieren lassen, die für ein spezielles Herzinfarkttrisiko bestimmter ethnischer Gruppen verantwortlich sind (Helgadottir et al, 2006).

Insbesondere in Anbetracht dieser Umstände erhebt sich die Frage, wieso in 5-Lipoxygenase-KO-Mäusen, die nicht zur Synthese von Leukotrienen in der Lage sind, eine derart höhere Infiltration von Neutrophilen zu verzeichnen ist. Eine Ursache deutet sich in der ebenfalls erhöhten Menge von im reperfundierten Gewebe exprimierten TNF- α an, welcher ebenfalls Signalwirkung auf Neutrophile besitzt und diese in das reperfundierte Gewebe zu locken vermag. Allerdings bleibt die Ursache einer verstärkten TNF- α -Expression unklar, ebenso wie die Frage, ob die vergleichsweise geringe Erhöhung dieses Entzündungsmarkers die deutlich verstärkte Infiltration der Neutrophilen wirklich ausreichend zu erklären vermag. TNF- α wird hauptsächlich von aktivierten Makrophagen produziert, Zellen, die durch das Fehlen der 5-Lipoxygenase nicht weiter beeinflusst werden sollten. Es ist daher nicht direkt ersichtlich, warum TNF- α in den KO-Mäusen verstärkt exprimiert werden sollte.

Die Effekte der 5-Lipoxygenase und ihrer Produkte sind organspezifisch. Fauler und Frolich verglichen z.B. den vasokonstriktorischen Effekt der Leukotriene auf

verschiedene Organe und fanden unter anderem einen vergleichsweise geringen Effekt in der Niere gegenüber einem stark ausgeprägten Effekt in der Lunge (Fauler und Frolich, 1989). Damit wäre auch zu vermuten, dass die Ausschaltung der 5-Lipoxygenase organspezifische Effekte hat. In der Tat waren nach Ischämie und Reperfusion der Nieren von 5-Lipoxygenase-KO-Mäusen Gewebeschaden und Entzündung der Niere weitaus geringer sind als bei Wildtyp-Mäusen (Chatterjee et al, 2004). Dieser Effekt lässt sich auch mit dem medikamentösen 5-Lipoxygenase-Inhibitor Zileuton replizieren (Patel et al, 2004). Ebenso zeigte sich, dass 5-Lipoxygenase-KO-Mäuse bei Verschluss splanchnischer Arterien resistenter sind (Cuzzocrea et al, 2003). Im Gegensatz dazu zeigte sich kein protektiver Effekt des Knockouts bei zerebraler Ischämie (Kitagawa et al, 2004), analog unserer eigenen Befunde am Herzen.

Ein Grund, warum in den Leukotrien-defizienten Mäusen eine ausgeprägtere Neutrophilen-Infiltration nachweisbar ist, kann aber auch darin liegen, dass Neutrophile von vielen verschiedenen Mediatoren angezogen werden können und nicht auf Leukotriene zur Steuerung ihrer Chemotaxis angewiesen sind. Neben dem bereits erwähnten TNF- α werden Neutrophile auch von Komplementfaktor 5a (C5a), Interleukin-1 (IL-1), Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-8 (IL-8), Neutrophil Activating Peptide-1 (NAP-1), Platelet Activating Factor (PAF) und Macrophage Inflammatory Protein-2 (MIP-2) angelockt (Vinten-Johansen, 2004). Die Entstehung aller dieser Mediatoren wird durch reaktive Sauerstoffspezies vermittelt, z.T. unter Mitwirkung von Nuclear Factor- κ B (NF- κ B), einem Transkriptionsfaktor, der durch reaktive Sauerstoffspezies aktiviert wird und die Expression der Zytokine beeinflusst. Insbesondere wird die Neutrophileninfiltration aber auch über den Cyclooxygenase-Weg gesteuert. Die Beteiligung von Reaktionsprodukten dieses Wegs an der Entwicklung von Entzündung und Gewebeschaden nach Ischämie wurde bereits mehrfach gezeigt (Iadecola et al, 1999). Mit genauerem Bezug auf die an der Entzündungsentwicklung beteiligten Neutrophilen wurde von Takeyoshi et al nachgewiesen, dass durch den selektiven COX-2 Inhibitor FK3311 die Zahl der eingewanderten Neutrophilen in ischämischem Gewebe stark reduziert werden kann (Takeyoshi et al, 2001). Im Rückschluss kann gefolgert werden, dass

neutrophile Granulozyten auch über COX-2-abhängige Signalwege in ischämische Gewebeareale gezogen werden. Diese Signalwege sind es vermutlich auch, die bei den 5-Lipoxygenase-KO-Mäusen für die Neutrophilen-Infiltration und Erhöhung der Entzündungsparameter verantwortlich sind. Cyclooxygenase-Pfade werden durch das Ausschalten der 5-Lipoxygenase in keiner Weise beeinträchtigt. Im Gegenteil ist es wahrscheinlich, dass dieser Pfad bei den 5-Lipoxygenase-KO-Mäusen verstärkt in Anspruch genommen wird, um den Mangel an Leukotrienen auszugleichen. Sowohl 5-Lipoxygenase als auch die Cyclooxygenasen COX-1 und COX-2 benötigen als Ausgangssubstanz Arachidonsäure, die aus Phospholipiden der Zellmembran synthetisiert wird. Geht man von einer begrenzten Verfügbarkeit dieser Arachidonsäure aus, so wird klar, dass bei Ausfall der 5-Lipoxygenase um so mehr Arachidonsäure als Substrat für den Cyclooxygenase-Weg zur Verfügung steht. Die vorliegenden Ergebnisse, dass sich Infarktgrößen bei 5-Lipoxygenase-KO-Mäusen und Wildtyp-Mäusen nicht unterscheiden und dass Entzündungsparameter bei den KO-Mäusen eher erhöht sind, sind also durchaus plausibel, wenn man davon ausgeht, dass der Effekt der 5-Lipoxygenase-Blockade durch die verstärkte Aktivierung des Cyclooxygenase-Wegs maskiert bzw. sogar überkompensiert wird. Zu einem ähnlichen Schluss kommen Goulet et al, die eine Arachidonsäure-induzierte Entzündung bei 5-Lipoxygenase-KO-Mäusen und Wildtypmäusen auslösten und nur eine unwesentlich geringfügigere Ausprägung der Entzündung bei den KO-Mäusen feststellen konnten (Goulet et al, 1994). Wurde der Cyclooxygenase-Weg allerdings vorher durch Indomethacin gehemmt, so war die Entzündung bei den KO-Mäusen deutlich geringer ausgeprägt.

Neben den beiden Hauptpfaden des Arachidonsäure-Metabolismus, der Umwandlung durch 5-Lipoxygenase oder Cyclooxygenase, ist auch noch eine Metabolisierung der Arachidonsäure durch andere Lipoxygenasen möglich (Kumar et al, 2004). Dadurch entstehen aus der Arachidonsäure zunächst HPETEs (hydroperoxyeicosatetraenoic acids) und in einem zweiten Schritt HETEs (hydroxyeicosatetraenoic acids). HETEs sind neben den Leukotrienen weitere potente Mediatoren der Leukozyten-Chemotaxis und -Adhäsion, sind

also auch an der Infiltration von Neutrophilen in Entzündungsgebiete beteiligt. Auch sie werden durch das bei Ausfall der 5-Lipoxygenase in KO-Tieren vermehrt vorliegende Substrat Arachidonsäure verstärkt produziert werden und könnten so zu der erhöhten Anzahl eingewanderter Neutrophiler im reperfundierten Gewebe beitragen.

Ein weiterer Grund dafür, dass bei 5-Lipoxygenase-KO-Mäusen nach Ischämie und Reperfusion im Herzmuskel eine verstärkte Entzündungsreaktion nachzuweisen ist, liegt wohl auch darin, dass durch die Ausschaltung der 5-Lipoxygenase nicht nur die Bildung der Leukotriene ausfällt, sondern auch die der Lipoxine. Insbesondere Lipoxin A₄ ist nachweislich an der Eingrenzung und Reduktion von Entzündungsreaktionen beteiligt (Takano et al, 1997, Goh et al, 2001). Indem durch den Ausfall der 5-Lipoxygenase keine Synthese dieses Entzündungshemmers möglich ist, wird indirekt die resultierende Entzündungsreaktion gegenüber der von Tieren mit intakter Lipoxin-Synthese verstärkt.

Zusammenfassend kann man also sagen, dass die Leukotriene in der Tat eine Rolle bei der pathogenetischen Entwicklung nach Ischämie und Reperfusion im Herzmuskel spielen, worauf auch schon ihre verstärkte Bildung nach Myokardischämie hinweist. Untersuchungen der Wirkung von Leukotrienen in vielen verschiedenen Studien deuten darauf hin, dass durch Leukotriene die nach Myokardischämie eintretende akute Entzündung verstärkt wird und somit die Hemmung der Leukotrienwirkung durch Ausschaltung der 5-Lipoxygenase einen positiven Effekt haben sollte. Dieser wird aber durch andere Mediatoren kompensiert, so dass mit einer isolierten Blockade der 5-Lipoxygenase insgesamt keine Abschwächung der Entzündungsreaktion zu erzielen ist. Außerdem wird durch eine Blockade der 5-Lipoxygenase nicht ausschließlich die Leukotrien-Produktion gehemmt, sondern auch die Bildung der Lipoxine, die einen hemmenden Einfluss auf Entzündungen haben. Insgesamt wurde in der vorliegenden Untersuchung nachgewiesen, dass trotz der großen Bedeutung der 5-Lipoxygenase in Entzündungsprozessen bei 5-Lipoxygenase-KO-Mäusen die Ausschaltung der Leukotrienproduktion keinen Einfluss auf den Reperfusionsschaden nach Myokardischämie hat, wodurch die Komplexität des

Zusammenwirkens der verschiedenen Arachidonsäurederivate und der Steuerung ihrer Balance im Verlauf von Entzündungsprozessen eindrucksvoll verdeutlicht wird.

5. Zusammenfassung

Leukotriene sind, neben anderen Arachidonsäuremetaboliten, wichtige Mediatoren in Entzündungsprozessen. Um ihre Rolle bei den pathophysiologischen Prozessen nach Ischämie und Reperfusion des Herzmuskels aufzuklären, wurden Wildtyp-Mäuse und 5-LOX-KO-Mäuse, die keine Leukotriene produzieren können, untersucht. Die linke vordere Herzkranzarterie wurde für 30min ligiert und 24h in vivo reperfundiert. Bei den KO-Mäusen fand sich zwar eine signifikant höhere Anzahl eingewanderter Neutrophiler im reperfundierten Gewebe, dagegen ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen Wildtyp- und KO-Mäusen bezüglich der resultierenden Infarktgröße und bezüglich der im Gewebe gemessenen Menge an TNF- α . Demnach lässt sich kein Einfluss der 5-Lipoxygenase-Ausschaltung auf den Entzündungsprozess nach Myokardischämie und die Entstehung eines Reperfusionsschadens feststellen.

Abstract:

Leukotrienes are arachidonic acid derivatives that function as important mediators in inflammatory response reactions. To investigate their role in the pathophysiological processes after ischemia and reperfusion of the heart, wildtype mice and 5-LOX-KO-mice that cannot produce leukotrienes were compared using a mouse model of myocardial ischemia and reperfusion. The left anterior coronary artery was ligated for 30 minutes and then reperfused for 24 hours. This yielded no significant difference between wildtype and KO mice with regard to infarct size and amount of TNF- α measured in the heart tissue, even though there was a significantly larger number of infiltrating neutrophils in the heart tissue of the KO mice. We conclude that there is no effect of the 5-lipoxygenase-knockout on the inflammatory response following myocardial ischemia or on the developing reperfusion injury.

6. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Eicosanoide und ihre Biosynthese

Abb. 2: Leukotriene und ihre Biosynthese

Abb. 3: Ischämie und Reperfusion im menschlichen Herzen

Abb. 4: Inaktivierung des 5-Lipoxygenase-Gens der Maus

Abb. 5: Schematische Zeichnung der Anatomie der linken vorderen absteigenden Herzkranzarterie (LAD) bei der Maus

Abb. 6: Infarktgrößenbestimmung

Abb. 7: Schema der immunhistochemischen Anfärbung von Neutrophilen

Abb. 8: Spezifische Anfärbung neutrophiler Granulozyten

Abb. 9: Schema der Herstellung von cDNA

Abb. 10: Schematische Darstellung der PCR

Abb. 11: Schematische Darstellung der Realtime-PCR

Abb. 12: CT-Wert-Bestimmung bei der Realtime-PCR

Abb. 13: Quantitative Konzentrationsbestimmung bei der Realtime-PCR mittels Standardreihe

Abb. 14: EKG-Aufzeichnungen während Ischämie und Reperfusion am Mäuseherz

Abb. 15: Prozentualer Anteil der Area at risk am linken Ventrikel

Abb. 16: Prozentualer Anteil des Infarkts an der Area at risk

Abb. 17: Anzahl neutrophiler Granulozyten in der Area at risk

Abb. 18: Verhältnis von TNF- α -Expression zu 18S-Expression

7. Literaturverzeichnis

- Bednar, M, B Smith, A Pinto, KM Mullane (1985). *Nafazatrom-induced salvage of ischemic myocardium in anesthetized dogs is mediated through inhibition of neutrophil function*. *Circ Res* **57**(1): 131-141.
- van Bilsen, M, W Engels, GJ van der Wusse, RS Reneman (1989). *Significance of myocardial eicosanoid production*. *Mol Cell Biochem* **88**(1-2): 113-121.
- Carry, M, V Korley, JT Willerson, L Weigelt (1992). *Increased urinary leukotriene excretion in patients with cardiac ischemia. In vivo evidence for 5-lipoxygenase activation*. *Circulation* **85**(1): 230-236.
- Chatterjee, PK, NS Patel, S Cuzzocrea, PA Brown, KN Stewart, H Mota-Filipe, D Britti, W Eberhardt, J Pfeilschifter, C Thiemermann (2004). *The cyclopentenone prostaglandin 15-deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J2 ameliorates ischemic acute renal failure*. *Cardiovasc Res* **61**: 630-643.
- Chen, XS, R James, E Sheller, EN Johnson, CD Funk (1994). *Role of leukotrienes revealed by targeted disruption of the 5-lipoxygenase gene*. *Nature* **372**(6502): 179-182.
- Cuzzocrea, S, A Rossi, I Serraino, R Di Paola, L Dugo, T Genovese, AP Caputi, L Sautebin (2003). *5-lipoxygenase knockout mice exhibit a resistance to splanchnic artery occlusion shock*. *Shock* **20**: 230-236.
- Deng, P, SP Zhao, HY Dai, XS Guan, HG Huang (2006). *Atorvastatin reduces the expression of COX-2 mRNA in peripheral blood monocytes from patients with acute myocardial infarction and modulates the early inflammatory response*. *Clin Chem* **52**(2): 300-303.
- Denzlinger, C (1996). *Biology and pathophysiology of leukotrienes*. *Critical Reviews in Oncology/ Hematology* **23**: 167-223.
- Fauler, J, JC Frolich (1989). *Cardiovascular effects of leukotrienes*. *Z Kardiol* **78**(19): 661-667.
- Fiedler, VB (1983a). *Reduction of myocardial infarction and dysrhythmic activity by nafazatrom in the conscious rat*. *Eur J Pharmacol* **88**: 263-267.

- Fiedler, VB (1983b). *The effects of oral nafazatrom (= Bay g 6575) on canine coronary artery thrombosis and myocardial ischemia*. Basic Res Cardiol **78**: 266-280.
- Fiedler, VB (1984). *Reduction of acute myocardial ischemia in rabbit hearts by nafazatrom*. J Cardiovasc Pharmacol **6**: 318-324.
- Fiedler, VB, M Mardin (1985). *Effects of nafazatrom and indomethacin on experimental myocardial ischemia in the anesthetized dog*. J Cardiovasc Pharmacol **7**: 983-989.
- Ford, HA, MA Bray, MV Doigt, ME Shipley, MJ Smith (1980). *Leukotriene B₄, a potent chemokinetic and aggregating substance released from polymorphonuclear leukocytes*. Nature **286**: 264-265.
- Ford-Hutchinson, AW (1990). *Leukotriene B₄ in inflammation*. Crit Rev Immunol **10**(1): 1-12.
- Frangogiannis, NG, CW Smith, ML Entman (2002). *The inflammatory response in myocardial infarction*. Cardiovasc Res **53**: 31-47.
- Frantz, S, K Hu, J Widder, B Bayer, CC Witzal, I Schmidt, P Galuppo, J Strotmann, G Ertl, J Bauersachs (2004). *Peroxisome proliferator activated-receptor agonism and left ventricular remodeling in mice with chronic myocardial infarction*. Br J Pharmacol **141**(1): 9-14.
- Frantz, S, L Calvillo, J Tillmanns, I Elbing, C Dienesch, H Bischoff, G Ertl, J Bauersachs (2005). *Repetitive postprandial hyperglycemia increases cardiac ischemia/reperfusion injury: prevention by the α -glucosidase inhibitor acarbose*. FASEB J **19**(6): 591-593.
- Funk, CD, XS Chen (2000). *5-Lipoxygenase and Leukotrienes – Transgenic Mouse and Nuclear Targeting Studies*. Am J Respir Crit Care Med **161**(2): 120-124.
- Funk, CD, XS Chen, EN Johnson, L Zhao (2002). *Lipoxygenase genes and their targeted disruption*. Prostaglandins Other Lipid Mediat **68-69**: 303-312.
- Goh, J, AW Baird, C O'Keane, RW Watson, D Cottell, G Bernasconi, NA Petasis, C Godson, HR Brady, P Macmathuna (2001). *Lipoxin A₄ and aspirin-triggered 15-epi-lipoxin A₄ antagonize THF- α stimulated*

- neutrophil-enterocyte interactions in vitro and attenuate TNF-alpha induced chemokine release and colonocyte apoptosis in human intestinal mucosa ex vivo.* J Immunol **167**: 2772-2780.
- Goulet, JL, JN Snouwaert, AM Latour, TM Coffman, BH Koller (1994). *Altered inflammatory responses in leukotriene-deficient mice.* Proc Natl Acad Sci USA **91**: 12852-12856.
- Hahn, RA, BR MacDonald, PJ Simpson, BD Potts, CJ Parli (1990). *Antagonism of leukotriene B₄ receptors does not limit canine myocardial infarct size.* J Pharmacol Exp Ther **253**(1): 58-66.
- Helgadottir, A, A Manolescu, A Helgason, G Thorleifsson, U Thorsteinsdottir, DF Gudbjartsson, S Gretarsdottir, KP Magnusson, G Gudmundsson, A Hicks, T Jonsson, SF Grant, J Sainz, SJ O'Brien, S Sveinbjornsdottir, EM Valdimarsson, SE Matthiasson, AI Levey, JL Abramson, MP Reilly, V Vaccarino, ML Wolfe, V Gudnason, AA Quyyumi, EJ Topol, DJ Rader, G Thorgeirsson, JR Gulcher, H Hakonarson, A Kong, K Stefansson (2006). *A variant of the gene encoding leukotriene A₄ hydrolase confers ethnicity-specific risk of myocardial infarction.* Nat Genet **38**: 68-74.
- Honn, KV, JR Dunn (1982). *Nafazatrom (Bay G 6575) inhibition of tumor cell lipooxygenase activity and cellular proliferation.* FEBS Lett **139**: 65-68.
- Horne, BD, JL Anderson, JM John, A Weaver, TL Bair, KR Jensen, DG Renlund, JB Muhlestein (2005). *Which white blood cell subtypes predict increased cardiovascular risk?* J Am Coll Cardiol **45**(10): 1638-1643.
- Iadecola, C, C Forster, S Nogawa, HB Clark, ME Ross (1999). *Cyclooxygenase-2 immunoreactivity in the human brain following cerebral ischemia.* Acta Neuropathol **98**(1): 9-14.
- Karmazyn, M (1986). *Contribution of prostaglandins to reperfusion-induced ventricular failure in isolated rat hearts.* Am J Physiol **251** (1 Pt 2): H133-H140.
- Karmazyn, M (1989). *Synthesis and relevance of cardiac eicosanoids with particular emphasis on ischemia and reperfusion.* Can J Physiol Pharmacol **67**(8): 912-921.

- Karmazyn, M, M Tani, JR Neely (1993). *Effect of prostaglandins I₂ (prostacyclin) and F₂ alpha on function, energy metabolism, and calcium uptake in ischaemic/reperfused hearts*. Cardiovasc Res **27**(3): 396-402.
- Khan, Z, CD Tripathi (2005). *Leukotrienes and Atherosclerosis*. Indian Heart J **57**(2): 175-180.
- Kitagawa, K, M Matsumoto, M Hori (2004). *Cerebral ischemia in 5-lipoxygenase knockout mice*. Brain Res **1004**(1-2): 198-202.
- Klein, HH, S Puschmann, J Schaper, W Schaper (1981). *The mechanism of the tetrazolium reaction in identifying experimental myocardial infarction*. Virchows Arch **393**: 287-297.
- Kumar, V, AK Abbas, N Fausto (Hrsg.). *Robbins and Cotran's Pathologic Basis of Disease*. 7. Ausgabe, Elsevier, Philadelphia, PA, USA, 2004.
- Letts, LG (1987). *Leukotrienes: role in cardiovascular physiology*. Cardiovasc Clin **18**(1): 101-113.
- Lewis, RA, KF Austen, RJ Soberman (1990). *Leukotrienes and other products of the 5-lipoxygenase pathway – Biochemistry and relation to pathobiology in human diseases*. NEJM **323**(10): 645-655.
- Maclouf, J, A Sala, G Rossoni, F Berti, R Muller-Peddinghaus, G Folco (1996). *Consequences of transcellular biosynthesis of leukotriene C₄ on organ function*. Haemostasis **26** Suppl 4: 28-36.
- Maxwell, MP, C Marston, MR Hadley, JA Salmon, LG Garland (1991). *Selective 5-lipoxygenase inhibitor BW A4C does not influence progression of tissue injury in a canine model of regional myocardial ischaemia and reperfusion*. J Cardiovasc Pharmacol **17**(4): 539-545.
- Michael, LH, ML Entman, CJ Hartley, KA Youker, J Zhu, SR Hall, HK Hawkins, K Berens, CM Ballantyne (1995). *Myocardial ischemia and reperfusion: a murine model*. Am J Physiol **269**(6 Pt 2): H2147-H2154.
- Mullane, K, MA Hatala, R Kraemer, W Sessa, W Westlin (1987). *Myocardial salvage induced by REV-5901: an inhibitor and antagonist of the leukotrienes*. J Cardiovasc Pharmacol **10**(4): 398-406.
- Mullane, KM, W Westlin, R Kraemer (1988). *Activated neutrophils release mediators that may contribute to myocardial injury and dysfunction*

- associated with ischemia and reperfusion. Ann N Y Acad Sci* **524**: 103-121.
- Patel, NSA, S Cuzzocrea, PK Chatterjee, R Di Paola, L Sautebin, D Britti, C Thiemermann (2004). *Reduction of renal ischemia-reperfusion injury in 5-lipoxygenase knockout mice and by the 5-lipoxygenase inhibitor zileuton. Mol Pharmacol* **66**: 220-227.
- Patrignani, P (2003). *Aspirin insensitive eicosanoid biosynthesis in cardiovascular disease. Thrombosis Res* **110**(5-6): 281-286.
- Ricevuti, G, A Mazzone, D Pasotti, S de Servi, G Specchia (1991). *Role of granulocytes in endothelial injury in coronary heart disease in humans. Atherosclerosis* **91**(1-2): 1-14.
- Romson, JL, BG Hook, SL Kunkel, GD Abrams, MA Schork, BR Lucchesi (1983). *Reduction of the extent of ischemic myocardial injury by neutrophil depletion in the dog. Circulation* **67**: 1016-1023.
- Saeed, SA, MA Wagar, AJ Zubairi, H Bhurgri, A Khan, SA Gowani, SN Wagar, MI Choudhary, S Jalil, AH Zaidi, I Ara (2005). *Myocardial ischemia and reperfusion injury: reactive oxygen species and the role of the neutrophil. J Coll Physicians Surg Pak* **15**(8): 507-514.
- Samulesson, B (1983). *Leukotrienes: mediators of immediate hypersensitivity reactions and inflammation. Science* **220** (4597): 568-575.
- Sasaki, K, A Ueno, M Katori, R Kikawada (1988). *Detection of leukotriene B₄ in cardiac tissue and its role in infarct extension through leukocyte migration. Cardiovasc Res* **22**(2): 142-148.
- Schoen, FJ (2004). *The Heart*, in: V Kumar, AK Abbas, N Fausto (Hrsg.) *Robbins and Cotran's Pathologic Basis of Disease, 7. Ausgabe*, Elsevier, Philadelphia, PA, USA, 2004, 555-618.
- Schorr, K, I Woditsch (1992). *Endogenous prostacyclin preserves myocardial function and endothelium-derived nitric oxide formation in myocardial ischemia. Agents Actions Suppl* **37**: 312-319.
- Schorr, K (1993). *The effect of prostaglandins and thromboxane A₂ on coronary vessel tone – mechanisms of action and therapeutic implications. Eur Heart J* **14** Suppl 1: 34-41.

- Shea, MJ, JJ Murtagh, SR Jolly, GD Abrams, B Pitt, BR Lucchesi (1984). *Beneficial effects of nafazatrom on ischemic reperfused myocardium*. Eur J Pharmacol **102**(1): 63-70.
- Shekher, A, M Singh (1997). *Role of eicosanoid inhibition of ischemia reperfusion injury: intact and isolated rat heart studies*. Methods Find Exp Clin Pharmacol **19**(4): 223-229.
- Shinmura, K, K Tamaki, T Sato, H Ishida, R Bolli (2005). *Prostacyclin attenuates oxidative damage of myocytes by opening mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channels via the EP3 receptor*. Am J Physiol Heart Circ Physiol **288**(5): H2093-H2101.
- Siminiak, T, T Ozawa (1993). *Neutrophil mediated myocardial injury*. Int J Biochem **25**(2): 147-156.
- Takano, T, S Fiore, JF Maddox, HR Brady, NA Petasis, CN Serhan (1997). *Aspirin-triggered 15-epi-lipoxin A₄ (LXA₄) and LXA₄ stable analogues are potent inhibitors of acute inflammation: evidence for anti-inflammatory receptors*. J Exp Med **185**: 1693-1704.
- Takeyoshi, I, Y Sunose, S Iwazaki, H Tsutsumi, M Aiba, M Kasahara, S Ohwada, K Matsumoto, Y Morishita (2001). *The effect of a selective cyclooxygenase-2 inhibitor in extended liver resection with ischemia in dogs*. J Surg Res **100**(1): 25-31.
- Taylor, AA, AC Gasic, TM Kitt, SB Shappell (1989). *A specific leukotriene B₄ antagonist protects against myocardial ischemia-reflow injury*. Clin Res **37**: 528A.
- Vermeiren, GLJ, MJ Claeys, D Van Bockstaele, B Grobбен, H Slegers, L Bossaert, PG Jorens (2000). *Reperfusion injury after focal myocardial ischaemia: polymorphonuclear leukocyte activation and its clinical implications*. Resuscitation **45**(1): 35-61.
- Vinten-Johansen, J (2004). *Involvement of neutrophils in the pathogenesis of lethal myocardial reperfusion injury*. Cardiovasc Res **61**(3): 481-497.
- Wargovich, TJ, WW Nichols, JL Mehta (1987). *Platelets and arachidonic acid derivatives in myocardial ischemia in animal models*. Cardiovasc Clin **18**(1): 115-133.

- Willerson, JT, LM Buja (1990). *Protection of the myocardium during myocardial infarction: pharmacologic protection during thrombolytic therapy*. Am J Cardiol **65**(19): 351-411.
- Williams, FM (1996). *Neutrophils and myocardial reperfusion injury*. Pharmacol Ther **72**(1): 1-12.
- Wysocki, H (1992). *The role of polymorphonuclear neutrophils in myocardial damage during ischemia and reperfusion*. Arch Immunol Ther Exp **40**(1): 49-53.

Danksagung

Bei PD Dr. Stefan Frantz möchte ich mich für die freundliche Überlassung des Dissertationsthemas bedanken, für Beratung und Unterstützung während der Erstellung der Arbeit, sowie für das Korrekturlesen der Dissertation.

Frau Dr. Anna Adamek danke ich ganz besonders für ihre ausdauernde Hilfe mit der sie mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand, von der Einarbeitung in die labortechnischen Methoden bis hin zur Auswertung der Ergebnisse.

Vielen herzlichen Dank auch an Frau Charlotte Dienesch für die Durchführung von Ischämie und Reperfusion der Mäuseherzen und an Frau Helga Wagner für die Durchführung der Immunhistochemie. Weiterhin ein herzliches Dankeschön an Frau Barbara Bayer und Frau Heidi Scheuermann für Unterstützung und Mithilfe bei der Durchführung der Arbeit. Bei der gesamten Laborgruppe möchte ich mich für die immer freundliche Atmosphäre und die vielen aufmunternden Worte ganz herzlich bedanken.

Beim Direktor der Medizinischen Klinik, Herrn Prof. Dr. Ertl, bedanke ich mich für die Überlassung der Laborräume zur Durchführung der Arbeit.

Abschließend möchte ich mich ganz herzlich bei meinen Eltern und Großeltern bedanken, ohne deren Unterstützung mir die Erstellung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Susanne Jung
Geburtsdatum 31.01.1976
Geburtsort Nürnberg

Schulbildung

1982-85 Grundschule Muhr am See
1985-94 Simon-Marius-Gymnasium Gunzenhausen

Hochschulausbildung

1994-2000 Studium der Diplompsychologie an der Universität Eichstätt
 1997/98 DAAD-Auslandsstudienjahr an der University of
 Illinois at Urbana-Champaign, USA
 1999/2000 Diplomprüfung und Diplomarbeit
2001-04 Studium der Biomedizin an der Julius-Maximilians-Universität
 Würzburg
 07/2004 Abschluss mit Bachelor of Science
2004-08 Studium der Humanmedizin an der Julius-Maximilians-Universität
 Würzburg
 09/2004 Ärztliche Vorprüfung
 11/2008 Zweite Ärztliche Prüfung

Praktisches Jahr

08/2007 – 12/2007 Wahlfach Anästhesie am Universitätsklinikum Würzburg
12/2007 – 03/2008 Chirurgie am Leopoldina-Krankenhaus Schweinfurt
03/2008 – 07/2008 Innere Medizin am Leopoldina-Krankenhaus Schweinfurt

