

Aus der Medizinischen Klinik II
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. med. H. Schunkert

Einfluss von Simvastatin auf die Apoptose nach myokardialer Ischämie

Inauguraldissertation

zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck

- Aus der Medizinischen Fakultät -

vorgelegt von
Angelika Irmgard Heep
aus Frankfurt am Main

Lübeck 2005

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Gert Richardt

2. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Walter Raasch

Tag der mündlichen Prüfung: 19.06.2007

zum Druck genehmigt. Lübeck, den 19.06.2007

gez. Prof. Dr. med. Werner Solbach

-Dekan der Medizinischen Fakultät-

1 INHALTSVERZEICHNIS

1	Inhaltsverzeichnis	1
2	Einleitung	3
2.1	Myokardinfarkt: Definition und Bedeutung für die Gesellschaft	3
2.2	Pathophysiologie des Myokardinfarkts, Modulation und Modifikation der Infarktgröße	4
2.3	Apoptose und Nekrose.....	5
2.4	Reperfusionsschaden	7
2.5	Pleiotrope Effekte von HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren	8
2.6	Vorarbeiten	9
2.7	Fragestellung.....	11
3	Material und Methoden	12
3.1	Material	12
3.1.1	Geräte.....	12
3.1.2	Chemikalien und Reagenzien.....	12
3.1.3	Labormaterial.....	13
3.1.4	Antikörper	13
3.1.5	Oligonukleotide.....	13
3.1.6	Kits.....	13
3.1.7	Software	14
3.2	Versuchstiere.....	14
3.2.1	Tierhaltung.....	14
3.2.2	Medikamentenverabreichung an die Versuchstiere	14
3.3	Isoliert perfundiertes Rattenherz	15
3.3.1	Versuchsvorbereitung der Langendorff-Perfusion.....	15
3.3.2	Aufbau und Einstellung der Langendorff-Apparatur	15
3.3.3	Perfusionsprotokolle	16
3.4	Zellbiologische Methoden	18
3.4.1	Einbettung der Herzscheiben in Paraffin	18
3.4.2	Anfertigung von Paraffinschnitten	19
3.4.3	TUNEL-Assay	19
3.4.4	Propidiumiodidfärbung.....	20
3.4.5	Fluoreszenzmikroskopie	20
3.5	Proteinchemische und immunologische Methoden.....	23
3.5.1	Proteinisolation aus Rattenherzen.....	23
3.5.2	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	23
3.5.3	Gelelektrophoretische Trennung des Proteingemisches.....	24

3.5.4	Blotting: elektrophoretischer Transfer im Semi-Dry-Verfahren.....	25
3.5.5	Nachweisreaktion.....	25
3.5.6	Chemilumineszenzreaktion.....	26
3.5.7	Reblot.....	26
3.6	Molekularbiologische Methoden	26
3.6.1	RNA-Isolation.....	26
3.6.2	Polymerasekettenreaktion	27
3.6.3	Agarose-Gelelektrophorese.....	28
3.7	Statistische Auswertung	29
4	Ergebnisse	30
4.1	Ermittlung der optimalen Reperfusionzeit	30
4.2	Einfluss von Simvastatin auf die Apoptose nach Myokardischämie.....	31
4.3	Einfluss von Simvastatin auf die Apoptosemodulatoren Bcl-2 und Bax nach Ischämie und Reperfusion	32
4.4	Einfluss von Simvastatin auf die eNOS-Expression im Westernblot	34
5	Diskussion.....	36
5.1	Auswirkungen unterschiedlicher Reperfusionzeiten auf das Auftreten von Apoptose	36
5.2	Effekt von Statinen auf die Apoptose.....	38
5.3	Einfluss von Simvastatin auf die eNOS-Expression.....	40
5.4	Klinische Bezüge.....	42
6	Zusammenfassung	45
7	Literaturverzeichnis.....	46
8	Anhang	53
8.1	Genehmigung zur Durchführung von Versuchen an Wirbeltieren.....	53
9	Danksagung.....	54
10	Lebenslauf	55

2 EINLEITUNG

2.1 Myokardinfarkt: Definition und Bedeutung für die Gesellschaft

Die ehemals geltende WHO-Definition, in der der Myokardinfarkt durch das Auftreten von mindestens zwei der nachfolgend genannten drei Charakteristika: typische pektanginöse Beschwerden, pathologischer Anstieg kardialer Enzyme im Serum und infarkttypische EKG-Veränderungen inklusive der Ausbildung von Q-Zacken definiert war, wurde im Jahr 2000 aufgrund neuer laborchemischer Technologien von der European Society of Cardiology und dem American College of Cardiology neu definiert. Der Myokardinfarkt wird heute definiert durch den Nachweis des Untergangs von Myokardzellen, d.h. durch Nachweis von Markern der Myokardnekrose. Die höchste Sensitivität und Spezifität weist die Bestimmung des Troponin T oder I auf. Alternativ kann der Anstieg und Abfall des CK-MB bestimmt werden. Der positive Nachweis dieser Nekrosemarker muss mit mindestens einem der im folgenden genannten drei Merkmalen einhergehen: typische Angina pectoris, infarkttypische EKG-Veränderungen oder vorausgegangene Katheterintervention [1],[29].

Dem akuten Herzinfarkt als Haupttodesursache im Erwachsenenalter und der ischämischen Herzkrankheit als Ursache von mehr Todesfällen und Folgeerkrankungen als jede andere Krankheit in der entwickelten Welt, kommt eine immense volkswirtschaftliche Bedeutung zu [38],[55]. Die koronare Herzkrankheit ist die Hauptursache verfrühter Todesfälle in den Industrienationen und für 30 % aller Todesfälle bei Personen zwischen 35 und 64 Jahren verantwortlich [41]. Jedoch haben sowohl Veränderungen in der Inzidenz, zum Beispiel durch Reduzierung der Risikofaktoren, als auch in der Letalität, die Versorgungssituation von Koronarkranken und Patienten mit akutem Myokardinfarkt weltweit entscheidend verändert [37]. In den letzten Jahrzehnten haben bahnbrechende Veränderungen zu einer rapiden Senkung der „Inhospitalitäts-Mortalität“ geführt. So zum Beispiel die Einführung von Coronary Care Units in den 60ern, die Fortschritte der pharmakologischen Reperfusionstherapie in den 80ern und die Verbreitung von Katheterinterventionen in den 90er Jahren. Zusätzlich hat die Dauertherapie mit Aspirin, β -Blockern, ACE-Hemmern und Statinen zu einer verbesserten Langzeitprognose von Überlebenden der Akutphase

beigetragen. In den letzten Jahren ist somit in Deutschland die kardiovaskuläre Mortalität stark zurückgegangen. Dennoch bleibt der Myokardinfarkt, der immer noch für ein Drittel der Patienten tödlich endet, ein aus klinischer, psychologischer und sozialer Sicht zentrales Problem [2],[3],[38],[64].

2.2 Pathophysiologie des Myokardinfarkts, Modulation und Modifikation der Infarktgröße

Wird die Koronardurchblutung abrupt durch einen thrombotischen Verschluss einer meist atherosklerotischen Herzkranzarterie, unterbrochen, kommt es in der Regel zu einem Myokardinfarkt. Risikofaktoren für ein solches Ereignis sind u. a. Zigarettenrauchen, Hypertonus und Hyperlipidämie. Der pathophysiologische Ablauf gestaltet sich derart, dass zunächst ein atherosklerotischer Plaque einreißt oder ulzeriert und es nach Anlagerung einer einzelligen Thrombozytenschicht zur Thrombozytenaktivierung, -quervernetzung und -aggregation kommt. Die Gerinnungskaskade wird in Gang gesetzt und die Koronararterie wird durch einen Thrombus verschlossen. Andere Auslöser für einen akuten Myokardinfarkt können Koronararterienembolien, angeborenen Fehlbildungen, Koronararterienspasmen und Systemerkrankungen sein. Verantwortlich für die Modulation der Größe des Myokardinfarkts, sind die folgenden Faktoren: (1) Der Umfang des Versorgungsgebietes des Koronararteriengefäßes, (2) der Grad des Verschlusses, (3) die Dauer des Verschlusses, (4) das Vorhandensein einer Kollateralversorgung, (5) der Sauerstoffbedarf des betroffenen Myokards, (6) individuelle Faktoren, die eine frühe spontane Lyse des okklusiven Thrombus herbeiführen können und (7) die Angemessenheit der Herzmuskeldurchblutung im Infarktgebiet nach Flusswiederherstellung [55].

Für die Begrenzung der Infarktgröße sind insbesondere drei Punkte entscheidend: Eine frühe Reperfusion, eine Verringerung des myokardialen Energieverbrauchs und die Bereitstellung von Energiequellen im Myokard [16],[26],[47]. Zusätzliche, in Zusammenhang mit der Reperfusion stehende Faktoren, die für die Begrenzung der Infarktgröße eine Rolle spielen, sind die Verhinderung von Koronarspasmen, die Optimierung der systemischen Hämodynamik durch Erhöhung des koronaren Perfusionsdrucks und Reduzierung des linksventrikulären enddiastolischen Füllungsdrucks sowie die Entwicklung einer kollateralen Zirkulation [40].

2.3 Apoptose und Nekrose

Beim Untergang von Myokard im Rahmen eines Myokardinfarkts sind verschiedene Formen des Zelltods beteiligt. Zwei Hauptformen, die unterschieden werden, sind Apoptose und Nekrose. Der Begriff der Apoptose, wie man ihn heute versteht, ist als solcher seit 1972 bekannt, als Kerr, Wyllie und Currie eine besondere Form des Zelltods beschrieben. Erhält eine Zelle das Signal apoptotisch zu werden, so durchläuft sie eine genaue Abfolge von morphologischen Veränderungen, die mit dem Lichtmikroskop beobachtet werden können. Beginnend mit dem Zusammenziehen der Zellmembran über die Chromatinkondensation und Zellfragmentierung, bis hin zur Phagozytose der Apoptosekörperchen durch benachbarte Zellen, folgt die Apoptose einer bestimmten Reihenfolge [4]. Proapoptotische Faktoren führen auf zellulärer Ebene zunächst zu einem Verlust von Mikrovilli und Interzellularverbindungen, einer Schrumpfung des Zytoplasmas und zu Veränderungen der zytoplasmatischen Motilität mit der Bildung membranumschlossener Fortsätze („membrane blebbing“) und dem Auftreten von Blasen im Zytoplasma. Es kommt zur Distribution von Phosphatidylserin an der Zelloberfläche und Hyperkondensation des Kernchromatins sowie dessen Verdrängung in die Peripherie. Schlussendlich kommt es zum explosiven Zerfall der Zelle in membranumschlossene apoptotische Körperchen, die Reste des Nukleolus, der Mitochondrien und anderer Organellen enthalten. Die Plasmamembran behält während des gesamten Vorgangs ihre Integrität. Die apoptotischen Körperchen werden im umliegenden Gewebe phagozytiert. Sie verursachen, da sie ihre Inhalte nicht an die Umgebung freigeben, keine Entzündungsreaktion [62],[66]. Der apoptotische Zelltod lässt sich in zwei Phasen einteilen: die Latenzphase, in der die Zelle morphologisch noch völlig unauffällig erscheint, aber sich schon in der Vorbereitung zur Apoptose befindet und die Exekutionsphase, in der die oben beschriebenen Schritte ablaufen [48]. Wird die Zelle nicht phagozytiert, kommt es zu einem der Nekrose ähnlichen und als sekundäre Nekrose bezeichneten Vorgang, in dem die „apoptotic bodies“ degradiert werden [50].

Die Apoptose ist eine Form programmierten Zelltodes und spielt eine ganz unterschiedliche Rolle während der physiologischen Embryonalentwicklung und während des Erwachsenseins. Während der Embryonalentwicklung liegt die Hauptbedeutung der Apoptose in der Rückbildung rudimentärer Strukturen, der Kontrolle der Zellzahl und im Umbau von Geweben und Organen. Während des Erwachsenseins dient die Apoptose als Gegenspieler zur Mitose der Homöostase und der Vernichtung von Zellen, die potentiell

autoimmunreaktiv, maligne oder virusinfiziert sind [45],[57]. Die ursprüngliche Annahme, dass es bei differenzierten Zellen wie Kardiomyozyten keine Apoptose gibt, konnte in den letzten Jahren nicht mehr aufrechterhalten werden. Vielmehr stellte sich heraus, dass der Apoptose auch bei einer Reihe von kardiovaskulären Erkrankungen wie dem Myokardinfarkt, der Herzinsuffizienz und der Atherosklerose eine entscheidende Rolle zukommt [58]. Der Apoptose wird die Nekrose gegenübergestellt. Als Nekrose bezeichnet man die Form des Zelltods, die aus dem irreversiblen Schaden einer Zelle resultiert. Ursachen hierfür können Sauerstoffmangel, Temperaturextreme oder physikalische Schäden sein. Auf zellbiologischer Ebene laufen während der Nekrose die folgenden Vorgänge ab: In einem frühen Stadium kommt es zum Verlust der Integrität der Zellmembran, was einen Wassereinstrom in die Zelle zur Folge hat. Das Anschwellen der Zelle führt zum Platzen der Plasma- und Organellenmembranen. Die Zelle durchläuft nun einen generalisierten Prozess der Autodigestion mit Denaturierung und Koagulation zytoplasmatischer Proteine und es kommt zur Verbreitung zellulärer Inhalte in die Umgebung. Es resultiert eine lokale Entzündungsreaktion, die zur Anlockung von Makrophagen führt, die die Zellbestandteile phagozytieren und aktiviert werden [62],[66]. Die zur Nekrose führenden Schäden wirken meist auf ausgedehntere Gebiete ein, als nur auf eine Zelle und betreffen so häufig größere Zellverbände [48].

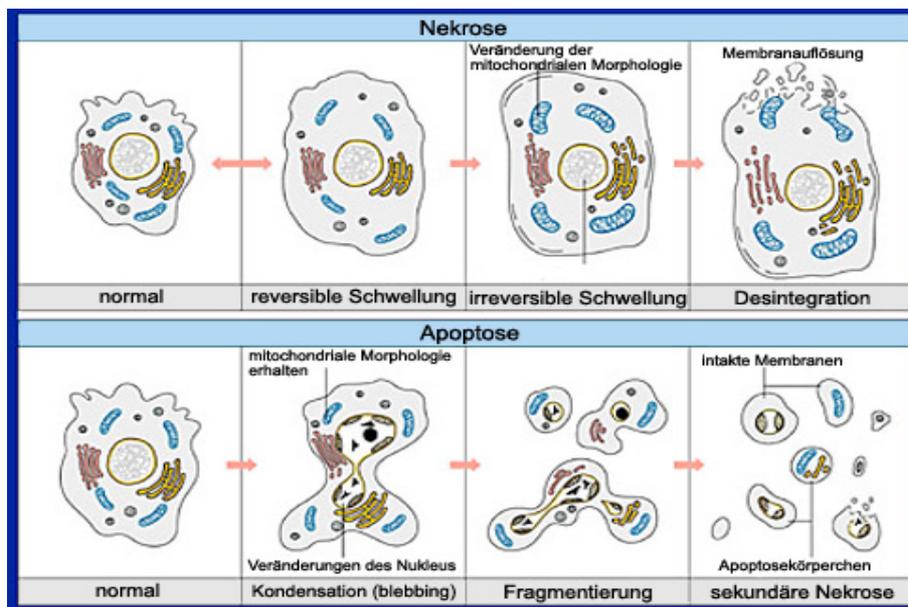


Abbildung 1: Morphologische Charakteristika von Nekrose und Apoptose

Die Nekrose beginnt mit dem Verlust der intrazellulären Homöostase welcher zum Einstrom von Wasser und extrazellulären Ionen führt. Intrazelluläre Organellen und die gesamte Zelle schwellen und platzen. Durch den Verlust der Integrität der Zellmembran werden die zytoplasmatischen

Inhalte inklusive lysosomaler Enzyme in die Extrazellulärflüssigkeit freigegeben. Aufgrund dessen ist die Nekrose in vivo oft mit weit reichendem Gewebeschaden und Entzündung assoziiert. Beim Ablauf der Apoptose kommt es zunächst zur Chromatinaggregation, nukleären und zytoplasmatischen Kondensation und zur Teilung des Zellkerns und des Zytoplasmas in membranumschlossene Vesikel (Apoptosekörperchen), die morphologisch intakte Organellen und Kernmaterial enthalten. In vivo werden diese Apoptosekörperchen schnell von Makrophagen oder umliegenden epithelialen Zellen erkannt und phagozytiert. Eine inflammatorische Reaktion folgt nicht. In vitro kommt es jedoch am Ende zur Schwellung und zum Platzen der Körperchen, einem als sekundäre Nekrose bezeichnetem Prozess [49].

2.4 Reperfusionsschaden

Arbeiten zum Thema „apoptotischer Zelltod“ zeigten, dass das Ausmaß der Apoptose im Rahmen einer Ischämie nicht nur von deren Dauer abhängig ist, sondern insbesondere auch in direktem Zusammenhang zum Vorhandensein und zur Dauer einer Reperfusion steht. Die Reperfusion ischämischen Myokards liefert noch nicht irreversibel geschädigtem Myokard lebensrettenden Sauerstoff. Sie ermöglicht diesen Zellen, aufgebrauchte Energiespeicher wieder zu füllen, entstandenen Schaden zu reparieren und ihre normale Kontraktionsfunktion wieder aufzunehmen. Somit ist die frühe Reperfusion führendes Therapieziel bei der Behandlung von Patienten mit Myokardinfarkt. Überraschenderweise stellte sich jedoch heraus, dass die Reperfusion den apoptotischen Zelltod ischämischer Kardiomyozyten beschleunigen kann [14]. Es werden also durch die rettende Reperfusion auch durchaus schädliche Prozesse in Gang gesetzt, die zu einem Untergang von Gewebe führen. Als Reperfusionsschaden wird deshalb derjenige Anteil an zu Grunde gegangenem Myokard bezeichnet, der durch Therapieoptimierung in der Reperusionsphase gerettet werden kann. Unter dem Ausdruck Reperfusionsschaden (reperfusion injury) wird streng genommen nur der Zellschaden verstanden, der ursächlich erst durch den Vorgang der Reperfusion ausgelöst wurde [14]. Kajstura et al. und Fliss und Gattinger berichteten, dass im Myokard von Ratten nach einer zwei Stunden dauernden permanenten Ischämie apoptotische Zellen nachgewiesen werden können, und dass der Ablauf der Apoptose durch 45-minütige Ischämie und anschließende einstündige Reperfusion beschleunigt werden kann. Apoptose war entweder nach prolongierter Ischämie ohne Reperfusion oder nach einer kürzeren Ischämie gefolgt von Reperfusion nachweisbar [15],[27],[66].

Sicher erwiesen ist, dass der Gesamtschaden eines Myokardinfarkts, der vornehmlich durch Nekrose ausgelöst wird, durch die Reperfusion begrenzt wird. Einzig die Apoptose wird durch die Reperfusion eventuell verstärkt [17].

Es stellte sich weiterhin die Frage, ob der Ablauf der Apoptose an die Reperfusion gebunden ist, oder ob es auch nach alleiniger Ischämie zur Apoptose kommen kann. Diese Frage konnte bisher nur unzureichend geklärt werden, dennoch überwiegt die Zahl wissenschaftlicher Publikationen, die den Ablauf der Apoptose nach Ischämie nur in Verbindung mit anschließender Reperfusion sehen.

So zeigten Gottlieb et al., dass Hasenherzen sowohl nach 0,5 Stunden als auch nach 4,5 Stunden dauernder Ischämie keine Anzeichen für Apoptose aufwiesen. Nach 30-minütiger Ischämie und vier Stunden dauernder Reperfusion wiesen jedoch alle Herzen apoptotische Zellen auf [18].

Der kritische Punkt bei der Klärung der Rolle der Reperfusion ist, ob während der Reperusionsphase Zellen geschädigt werden, die während der Ischämiephase noch nicht irreversibel geschädigt waren, oder ob die Reperfusion lediglich den Zelltod ohnehin verlorener Myozyten beschleunigt [17]. Die Verfügbarkeit von ATP scheint eine wichtige Rolle zu spielen bei der Entscheidung, ob Myozyten infolge ischämischer Veränderungen apoptotisch oder nekrotisch werden. Interessanterweise hat Apaf-1 (Apoptosis protease activating factor-1) eine Bindungsstelle für ATP, was erklären würde warum der ATP-Gehalt einer Zelle dafür verantwortlich ist, ob die Zelle, reicht ihr ATP-Vorrat aus, apoptotisch wird, oder, sind ihre Energiespeicher leer, nekrotisch wird [5]. Die Auffüllung der zellulären ATP-Speicher, der plötzliche Anstieg intrazellulären Kalziums und die Produktion freier Radikale sind Vorgänge, die unverzüglich durch die Reperfusion initiiert werden und den plötzlichen Anstieg apoptotischen Zelltods zu diesem Zeitpunkt erklären können [14],[45]. Auch wenn nicht klar ist, ob der programmierte Zelltod eine wichtige Rolle beim Ischämie/Reperfusionsschaden spielt und er keinen entscheidenden Anteil am initialen Gewebeschaden trägt, so bleibt jedoch zu eruieren, ob die Apoptose insbesondere im Grenzzonenbereich des Infarkts zum allmählichen Verlust funktionsfähigen Myokards beiträgt [17].

2.5 Pleiotrope Effekte von HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren

In unseren Versuchen beschäftigen wir uns mit den Auswirkungen von HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren auf den oben geschilderten Reperfusionsschaden. Für sämtliche günstigen Effekte der Statine hat man bis vor einigen Jahren allein ihre cholesterinsenkende Wirkung verantwortlich gemacht. Neue Studienergebnisse weisen darauf hin, dass Statine zusätzlich direkte Einflüsse auf das kardiovaskuläre System haben, die

unabhängig von ihrer cholesterinsenkenden Eigenschaft sind. Diese Eigenschaften werden als pleiotrope Effekte bezeichnet [21].

Statine verbessern die endotheliale Dysfunktion, die bei vielen kardiovaskulären Erkrankungen vorliegt. Als endotheliale Dysfunktion bezeichnet man eine verringerte Bioverfügbarkeit von NO. Statine stabilisieren die eNOS mRNA und steigern so die Expression und Aktivität der endothelialen NO-Synthase und erhöhen die Freisetzung von NO [33],[34],[36].

Statine wirken zudem antiinflammatorisch. Die Leukozyten-Endothelzell-Adhäsion wird verhindert und die Invasion von Entzündungszellen in geschädigte Gewebe reduziert. Der entstehende Gewebeschaden kann so vermindert werden [7].

Des Weiteren konnte für HMG-CoA-Reduktase-Hemmer ein antithrombotischer Effekt nachgewiesen werden. Zum einen reduzieren sie das Level an Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) in glatten Gefäßmuskelzellen und Endothelzellen, zum anderen steigern sie die Expression von tissue plasminogen activator (tPA). Das Gleichgewicht verschiebt sich in den Gefäßen so in Richtung vermehrter fibrinolytischer Aktivität [36].

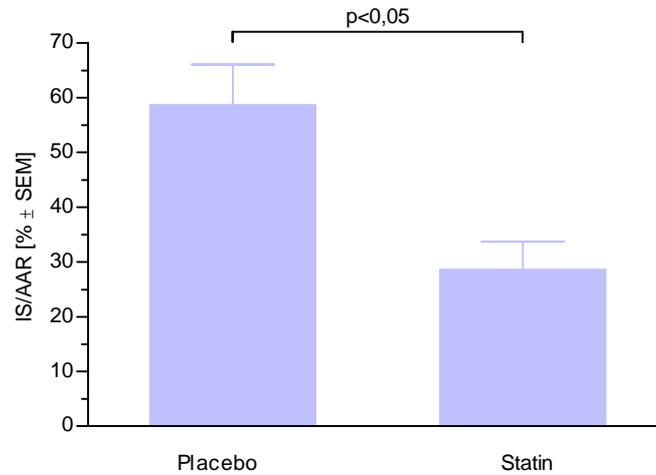
Chen et al. haben eine antiproliferative Wirkung bei Statinen festgestellt. Simvastatin reduzierte unabhängig vom Cholesterinspiegel die Media- und Intimaproliferation nach Gefäßverletzungen [7].

Die pleiotropen Wirkungen der HMG-CoA-Reduktase-Hemmer beschränken sich jedoch nicht auf vaskuläre Effekte sondern betreffen ebenso das Herz. Statine bewirken beispielsweise eine Änderung der Spannung der sakrolemmalen Na⁺/K⁺-Pumpe und beeinflussen so die Kontraktilität der Kardiomyozyten [19].

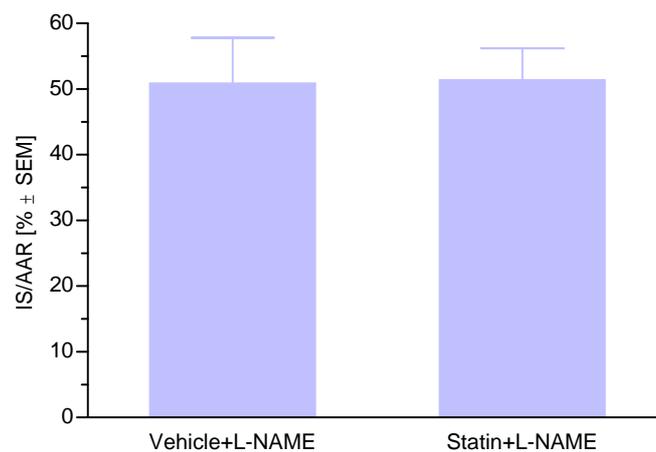
Statine senken zudem den CRP-Spiegel (C-reaktives Protein), einen Risikofaktor für die Entwicklung einer koronaren Herzkrankheit [8],[35],[54].

2.6 Vorarbeiten

In vorangegangenen Versuchen unserer Arbeitsgruppe wurde die Bedeutung dieser pleiotropen Effekte auf den Ischämie-Reperfusionsschaden näher untersucht. Nach Vorbehandlung von Wistar-Ratten mit Statin oder Placebo für eine Woche wurde durch temporäre Ligatur der linken Koronararterie ein Myokardinfarkt mit Reperfusion erzeugt. In diesen Versuchen konnte so eine Senkung des Ischämie-Reperfusionsschadens durch Statin um 49 % erzielt werden (IS/AAR: 59±7 % in Placebo-behandelten Tieren und 29±5 % in Statin-behandelten Tieren. p<0,05).

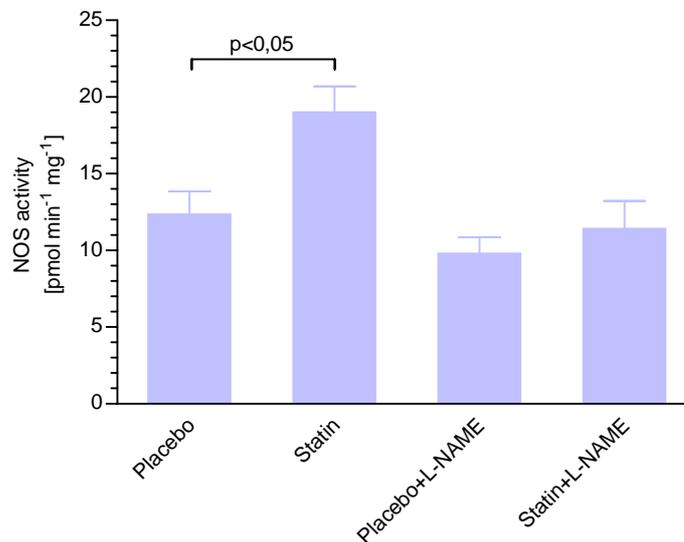


Ein weiteres Ziel dieser Studie war es, die Rolle der myokardialen endothelialen NO-Synthase bei der Infarktgrößenreduktion durch Statin zu klären. Hierzu wurde einem Teil der Versuchstiere 15 Minuten vor Verschluss der Koronararterie ein Bolus L-NAME, ein NOS-Inhibitor, verabreicht. Bei diesen Tieren konnte durch vorherige Statingabe keine Reduktion der Infarktgröße erzielt werden. Die Senkung der Infarktgröße wurde durch L-NAME vollständig verhindert, was der kardialen NOS eine entscheidende Rolle in der Vermittlung der kardioprotektiven Wirkung der Statine zuweist.



Ein weiteres Indiz für die Bedeutung der eNOS für die Kardioprotektion durch Statine waren die kardiale eNOS-Aktivität und die kardiale eNOS-Expression. Die Vorbehandlung

der Tiere mit Cerivastatin führte zu einem signifikanten Anstieg der NOS-Aktivität verglichen mit Placebo-behandelten Tieren [61].



Nachfolgende Experimente behandelten den Einfluss von Simvastatin bei akuter Verabreichung unmittelbar vor Beginn der Reperfusion. Diese Versuche, die *in vivo* an Wistar-Ratten durchgeführt wurden, zeigten, dass Simvastatin den Reperfusionsschaden nach 3-stündiger Reperfusion um 42 % im Vergleich zu den Kontrolltieren senkt. Dieser Effekt wurde über eine Aktivierung des PI 3-Kinase/Akt Pathways vermittelt und es konnte ein tendenzieller Anstieg der eNOS-Phosphorylierung gemessen werden. Gleichzeitige Gabe des PI 3-Kinase Inhibitors Wortmannin blockierte diesen kardioprotektiven Effekt vollständig [60].

2.7 Fragestellung

Die Ergebnisse der Vorversuche lassen die Frage unbeantwortet, ob die Infarktgrößenreduktion durch Statine auf eine Reduktion der Apoptose zurückzuführen ist. Deswegen wurde in den aktuellen Versuchen der Einfluss der Statine auf die Apoptose nach myokardialer Ischämie untersucht. Es handelt sich bei der beschriebenen Untersuchung um eine randomisierte und placebokontrollierte Studie, bei der im Rahmen der ersten Randomisierung eine Zuteilung in Medikamenten- und Placebogruppe und im Rahmen der zweiten Randomisierung eine Zuteilung in Ischämie- und Normoxiegruppe erfolgte.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Material

3.1.1 Geräte

Blotkammer	X-Cell Sure Lock	Invitrogen
Dispergierwerkzeug	UltraTurrax T8	IKA-Werke
PCR-Maschine	Uno	Biometria
UV-Kamera		
Fluoreszenzmikroskop	IX70	Olympus
Thermometer	testo 920	Testo
Photometer	Genesys 10uv	Thermo Spectronic
Vortexer	Genie 2	Scientific Industries
Zentrifugen	Biofuge pico 202 MK	Heraeus Sigma
Thermomixer	compact	Eppendorf
Schwenktisch	Duomax 1030	Heidolph Instruments
Power Supplies	Power Ease 500 EPS 300	Invitrogen Pharmacia Biotech
Langendorff-Apparatur:		
- Wasserbäder	B3	Haake
- Rollerpumpen	5058	Watson / Marlow
pH-Meter	pH 526	WTW
Ultraschallbad	Sonorex Super RK106	Bandelin
Magnetrührer	MR 3001	Heidolph
Elektrophoresekammer	Agagel Standard	Biometra
Waagen	R200D research U4100 universal	Sartorius Sartorius
Pipetten	Finnpipetten	ThermoLabsystems

3.1.2 Chemikalien und Reagenzien

Xylol	Merck
Proteinase K	Sigma
Rinderserumalbumin	Sigma
Propidiumiodid	Sigma
Mounting Medium	Sigma
DNase	Eurogentec
Trizol	Gibco
Chloroform	Merck
Agarose	Peqlab
Smart Ladder PCR Standard	Eurogentec
RPN 800 Rainbow Marker	Amersham

Ethidiumbromid	Pharmacia Biotech
Western Blot Running Buffer	Invitrogen
Western Blot Sample Buffer	Invitrogen
Western Blot Antioxidant	Invitrogen
Western Blot Transfer Buffer	Invitrogen
Skim Milk	Fluka BioChemika
PMSF (Phenylmethanesulfonyl-fluoride)	Sigma
Coomassie	Biorad
Cell Lysis Buffer (10x)	New England Biolabs
Tween 20	Bio-Rad
Fixierer	Sigma
Entwickler	Sigma
Folin	Sigma
Heparin Natrium	Roche
Thiopental Natrium	BYK

3.1.3 Labormaterial

Pipettenspitzen	Sarstedt
Pufferschalen	HASSA
Sterile 1 ml Spritzen	BD Plastipak
Plastik-Röhrchen 15 ml	Greiner
Reaktionsgefäße 0,5 ml, 1 ml, 1,5 ml	Sarstedt
Schraubcups 1,5 ml + Deckel	Sarstedt, Alpha
Coplin Jars	HASSA

3.1.4 Antikörper

NOS 3 rabbit polyclonal IgG	Santa Cruz
eNOS mouse monoclonal AB	Transduction lab.
Goat anti-mouse IgG HRP	DAKO
Goat anti-rabbit IgG HRP	DAKO

3.1.5 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden von der Firma MWG Biotech AG synthetisiert und als lyophilisiertes Pulver versandt. Dieses wurde in sterilem Millipore-Wasser gelöst, aliquotiert und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ tiefgefroren. Die Endkonzentration betrug $0,5\text{ }\mu\text{M}$.

Bax-a rev.	5' CTT CCA GAT GGT GAG CGA GG-3'
Bax-a forw.	5' GTT TCA TCC AGG ATC GAG CAG-3'
Bcl-2 rev.	5' AGC CAG GAG AAA TCA AAC AGA G-3'
Bcl-2 forw.	5' AGC TGC ACC TGA CGC CCT TC-3'

3.1.6 Kits

In Situ Cell Death Detection Kit Fluorescein (TUNEL) Roche

ECL Western Blot Analysis System
One Step RT-PCR-Kit

Amersham
Qiagen

3.1.7 Software

Lotus 1-2-3, Lotus IBM
Scion Images, Version Beta 4.0.2, Scion Corporation
Vision, Olympus
GraphPad Prism, Version 4, GraphPad Software

3.2 Versuchstiere

3.2.1 Tierhaltung

Die für diese Studie benötigten Tiere wurden nach den Richtlinien „Guide for the Care and Use of Laboratory Animals“ (US National Institutes of Health, NIH Publikation Nr. 85-23 in der revidierten Fassung von 1996) gehalten. Als Versuchstiere dienten männliche Wistar-Ratten (Charles River), die pathogenfrei aufgezogen und gehalten wurden. Die Tiere lebten bei einer Raumtemperatur von 20-22 °C, einem Hell-/Dunkel-Rhythmus von 10h/14h und erhielten eine Standard-Pellet-Diät, sowie Wasser ad libitum. Am Morgen des Versuchstages wurden die Ratten der „Gemeinsamen Tierhaltung der Universität zu Lübeck“ entnommen und bis zur Organentnahme reizarm gehalten. Zu diesem Zeitpunkt waren die Tiere ca. 60 Tage alt (mittleres Körpergewicht 266 g).

3.2.2 Medikamentenverabreichung an die Versuchstiere

Die Tiere wurden vor der Organentnahme sieben Tage lang jeden Tag zur gleichen Uhrzeit mit dem HMG-CoA-Reduktase-Hemmer Simvastatin gefüttert. Simvastatin wurde in Pulverform von der Firma MSD zur Verfügung gestellt, in Wasser gelöst und in einer Dosis von 20 mg/kg Körpergewicht verabreicht. Zu Beginn der Fütterungswoche wurde jedes Tier gewogen und markiert. Auf eine 1 ml-Spritze wurde eine gebogene Knopfkanüle aufgesetzt und durch diese zunächst 300 µl Wasser aufgezogen. Entsprechend des Körpergewichts der Ratte wurde jetzt durch die Knopfkanüle die berechnete Menge der Simvastatin-Lösung aufgezogen. So wurde ein Zurückbleiben des Medikaments in der Kanüle nach Applikation vermieden. Zur Fütterung wurden die Tiere im Nackenfell gegriffen und auf den Rücken gedreht. Mit der Knopfkanüle wurde zügig der Ösophagus

sondiert und das Medikament appliziert. Das insgesamt so verabreichte Volumen betrug gewichtsadaptiert ca. 550-600 μ l. Die Tiere der Kontrollgruppe wurden ebenfalls gewichtsadaptiert durch Sondierung mit 550 μ l Wasser gefüttert. Bei ruhiger Handhabung tolerierten die Tiere diese Fütterungsart nach einer ein- bis zweitägigen Eingewöhnungsphase gut.

3.3 Isoliert perfundiertes Rattenherz

3.3.1 Versuchsvorbereitung der Langendorff-Perfusion

Die Versuchstiere wurden mit Thiopental in einer Dosis von 0,025 g narkotisiert. Zunächst wurde mit einer scharfen Schere der Bauchraum der Tiere eröffnet und 1250 IE Heparin in die Vena cava inferior injiziert. Dies verhinderte eine Thrombosierung in den Blutgefäßen vor Entnahme des Herzens. Sofort im Anschluss wurde der Thorax durch einen Schnitt durch das Zwerchfell und zwei seitliche Schnitte, die die Rippen durchtrennten, eröffnet. Das Herz wurde unter Mitnahme eines kurzen Segmentes der Aorta ascendens isoliert und sofort in eiskalte Krebs-Henseleit-Lösung gelegt. Mit zwei Pinzetten wurde die Aorta ascendens gefasst und das Herz an die Langendorff-Apparatur angehängt. Die Zeit von der Eröffnung des Bauchraumes der Versuchstiere bis zur retrograden Perfusion des Herzens betrug weniger als eine Minute.

3.3.2 Aufbau und Einstellung der Langendorff-Apparatur

Der Aufbau der Langendorff-Apparatur ließ die Perfusion von vier Herzen gleichzeitig zu. Diese konnten zeitgleich auch nach unterschiedlichen Protokollen perfundiert werden. Die Herzen wurden mit einem konstanten Fluss von 8 ml/min. perfundiert. Die Krebs-Henseleit-Lösung hatte eine konstante Temperatur von 37 °C, der pH wurde durch Begasung mit CO₂ auf 7,4 +/- 0,04 eingestellt. Die Herzen wurden durch eine doppelwandige Glaskammer, die mit 37 °C warmem Wasser durchspült wurde, vor dem Auskühlen geschützt.

Krebs-Henseleit-Lösung:	ad 10 l Aqua dest.
Titriplex	0,1 g
NaCl	73 g
MgCl-Hexahydrat	2,14 g
KCl	3 g
CaCl	2,72 g
Glukose	20 g
Natriumhydrogencarbonat	14 g
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	0,3 g

3.3.3 Perfusionsprotokolle

Nach Kanülierung der Aorta ascendens wurde jedes Herz zunächst für zehn Minuten ohne Intervention perfundiert. Die weitere Perfusion erfolgte nach dem Normoxie- oder Ischämie-Protokoll. Nach Ende der Perfusion wurden die Herzen in je fünf bis sechs horizontale Scheiben geteilt, welche einzeln in Eppendorfgläsern in flüssigem Stickstoff schockgefroren wurden. Die anschließende Lagerung erfolgte bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.3.3.1 Normoxische Versuche

In Vorversuchen zur Etablierung der Reperfusionzeit wurden Kontrollherzen nach der 10-minütigen Eingewöhnungsphase kontinuierlich für 90, 150 oder 210 Minuten mit einem konstanten Fluss von 8 ml/min. perfundiert. Die Herzen der medikamentös vorbehandelten Tiere und ihrer Kontrolltiere wurden in den folgenden Versuchen 120 Minuten ohne Intervention perfundiert.

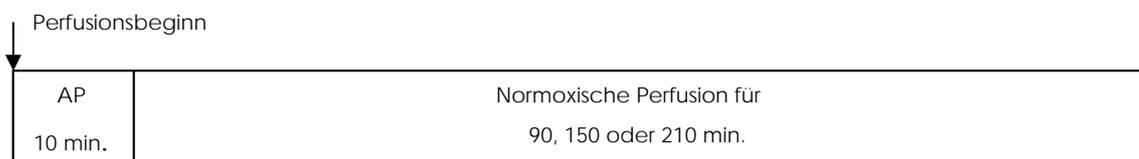


Abbildung 2: Normoxisches Perfusionsprotokoll der Vorversuche

Herzen nicht medikamentös vorbehandelter Tiere wurden in den Vorversuchen nach einer 10-minütigen Adaptationsphase (AP) für 90, 150 oder 210 Minuten bei konstanten Flussverhältnissen und konstantem pH perfundiert. Sie dienen als Kontrollgruppe bei den Versuchen zur Ermittlung der Reperfusionzeit.

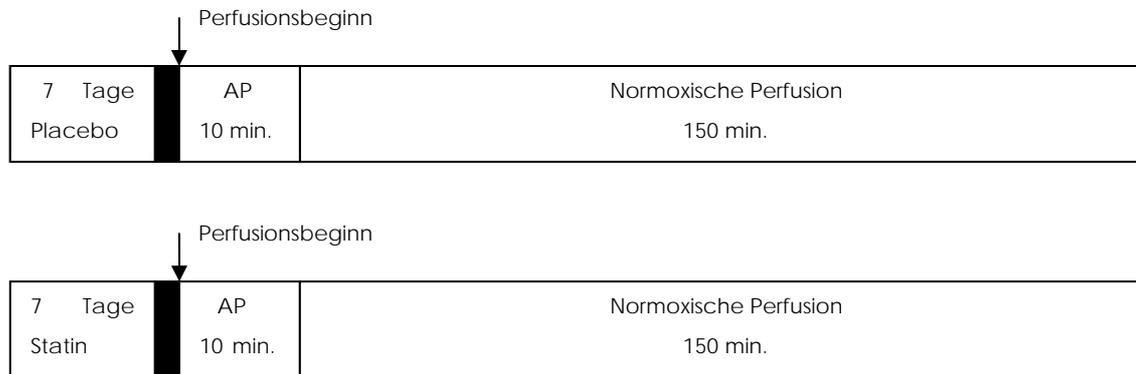


Abbildung 3: Normoxisches Perfusionsprotokoll der Hauptversuche

In den normoxischen Perfusionsversuchen wurden nach 7-tägiger Vorbehandlung der Wistar-Ratten mit Placebo bzw. Simvastatin die Herzen entnommen und über die Aorta sofort an der Langendorff-Apparatur kanüliert. Nach einer 10-minütigen Adaptationsphase (AP), in der die korrekte Perfusion der Herzen kontrolliert wurde, erfolgte eine 150-minütige Perfusion bei konstanter Flussgeschwindigkeit von 8ml/min und konstantem pH.

3.3.3.2 Ischämie/Reperfusion-Versuche

Zur Bestimmung der optimalen Reperfusionzeit wurden in anfänglichen Versuchen Herzen nicht medikamentös vorbehandelter Wistar-Ratten mit verschiedenen Reperfusionzeiten perfundiert. Die Reperfusionzeit im Anschluss an die 30-minütige Ischämie betrug 60, 120 oder 180 Minuten. Nach Auswertung dieser Versuche wurde für die Versuche an den Herzen der medikamentös vorbehandelten Tiere und ihren Kontrolltieren eine Reperfusionzeit von 120 Minuten gewählt. Die sich anschließenden Versuche mit den medikamentös vorbehandelten Tieren und den Kontrolltieren, die der Ischämiegruppe zugeordnet waren, wurden nach dem folgenden Protokoll durchgeführt: Zu Beginn der 11. Minute wurde der Perfusionsfluss unmittelbar vor den Herzen durch Abklemmung der zuführenden Schläuche für 30 Minuten unterbrochen. Die so hervorgerufene Myokardischämie wird als globale „Stop-flow-Ischämie“ bezeichnet. In der sich anschließenden 120-minütigen Reperfusionphase wurden alle Herzen erneut mit einer konstanten Flussgeschwindigkeit von 8 ml/min. perfundiert.

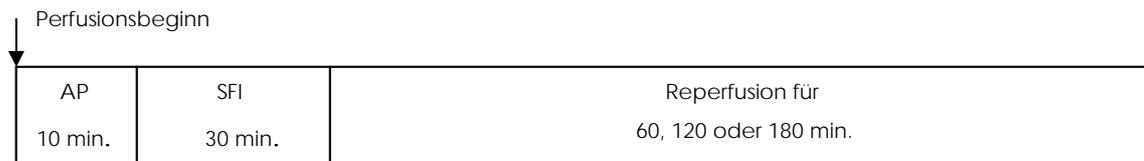


Abbildung 4: Ischämie/Reperusionsprotokoll der Vorversuche

In den Vorversuchen zur Ermittlung der Reperusionszeit wurde bei der Perfusion nicht medikamentös vorbehandelter Herzen nach einer 10-minütigen Adaptationsphase (AP) eine 30-minütige Flussunterbrechung (Stop-flow-Ischämie, SFI) durchgeführt. Anschließend erfolgte eine 60, 120 oder 180 Minuten dauernde Reperfusion.

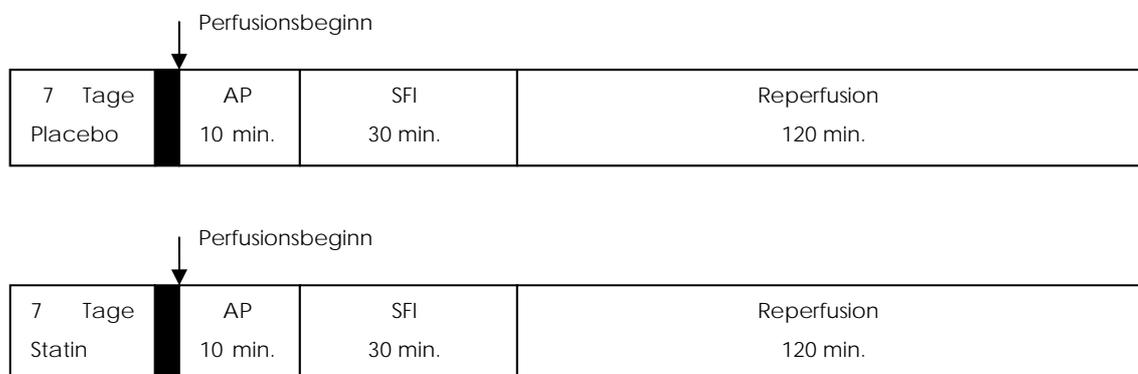


Abbildung 5: Ischämie/Reperusionsprotokoll der Hauptversuche

In den Ischämie/Reperusionsversuchen wurden nach 7-tägiger Vorbehandlung der Wistar-Ratten mit Placebo bzw. Simvastatin die Herzen entnommen und über die Aorta sofort an der Langendorff-Apparatur kanüliert. Nach einer 10-minütigen Adaptationsphase (AP) erfolgte eine totale Flussunterbrechung (Stop-flow-Ischämie, SFI) für 30 Minuten. Darauf folgte die zwei Stunden dauernde Reperusionsphase, bei der mit konstanten Flussverhältnissen von 8 ml/min und konstantem pH perfundiert wurde.

3.4 Zellbiologische Methoden

3.4.1 Einbettung der Herzscheiben in Paraffin

Direkt im Anschluss an die Perfusion der Rattenherzen wurde pro Herz jeweils eine Herzscheibe (immer aus gleicher Höhe) in 3,7 % Formaldehydlösung gebracht und bei 4 °C für 24 bis 48 Stunden gelagert, bevor sie im Institut für Pathologie in Paraffin eingebettet wurde. Die Paraffinblöcke wurden bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C aufbewahrt.

3.4.2 Anfertigung von Paraffinschnitten

Die Paraffinblöcke wurden zunächst auf eine Tiefkühlplatte gelegt und nach ausreichender Kühlung in ein Mikrotom eingespannt. Die Schnittdicke betrug 5 µm. Jeweils zwei Schnitte eines Herzens wurden auf einen Objektträger aufgezogen und direkt im Anschluss mit dem TUNEL-Assay analysiert. Die Paraffinschnitte wurden nicht gelagert.

3.4.3 TUNEL-Assay

Während der Apoptose kommt es zu charakteristischen Doppelstrangbrüchen in der genomischen DNA. Diese Strangbrüche finden zwischen Nukleosomen statt und führen zu mono- und oligonukleosomalen DNA-Fragmenten mit ein- bis vier Basen langen Überhängen an den 3'-OH-Enden. Die TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase – mediated dUTP nick end labeling) – Methode funktioniert folgendermaßen: Das Enzym TdT hängt an die entstehenden freien Enden mit Fluoreszein markierte dNTP-Nukleotide an, die fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen werden können.

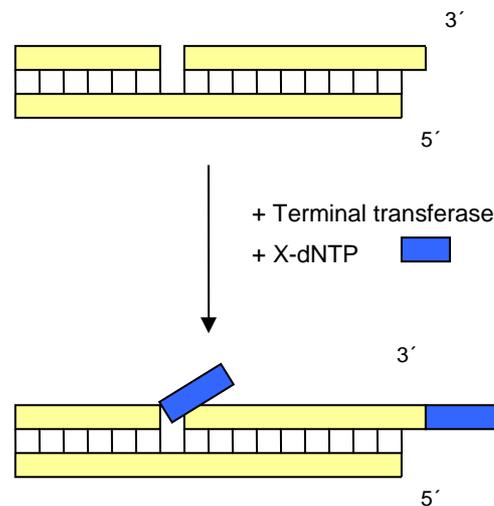


Abbildung 6: Schematische Darstellung des TUNEL-Assays

Extensiver DNA-Abbau ist ein charakteristisches Merkmal in frühen Stadien der Apoptose. Die DNA-Spaltung erzeugt sowohl doppelsträngige mono- und oligonukleosomale DNA-Fragmente, also auch einzelsträngige DNA-Brüche. Beide Arten von DNA-Strangbrüchen lassen sich durch enzymatische Markierung der freien 3'-OH-Enden mit modifizierten Nukleotiden (X-dNTP, X= Fluoreszein) nachweisen. Das im TUNEL-Assay verwandte Enzym ist die terminale Deoxynucleotidyltransferase (TdT). Die TdT labelt stumpfe Enden doppelsträngiger DNA-Brüche ohne Gegenvorlage [49].

Zur Schmelzung des Paraffins wurden die Objektträger eine Stunde bei 60 °C inkubiert und anschließend zur Immersion fünf Minuten in Xylol gewaschen. Die Objektträger durchliefen dann eine absteigende Alkoholreihe von 100 %, 95 %, 90 %, 80 %, 70 % (eine Minute pro Konzentration) und wurden zum Schluss für eine Minute in einem Coplinjar mit Aqua dest. gewaschen. Der TUNEL-Assay der Firma Roche wurde nach Anleitung durchgeführt.

3.4.3.1 Positivkontrollen

Positivkontrollen wurden vor der Inkubation mit TdT für zehn Minuten mit 2%iger DNase-Lösung bedeckt.

3.4.3.2 Negativkontrollen

Für Negativkontrollen wurden die Präparate nach Anleitung behandelt, es wurde lediglich auf die Gabe von TdT verzichtet.

3.4.4 Propidiumiodidfärbung

Im Anschluss an das Protokoll des TUNEL-Assays wurden die Objektträger mit 1%iger Propidiumiodidlösung bedeckt und für fünf Minuten bei Raumtemperatur gefärbt. Die Objektträger wurden mit Antifade Mounting Medium beschichtet und mit Deckgläschen bedeckt. Bis zur Auswertung wurden sie bei 4 °C unter Ausschluss von Licht aufbewahrt.

3.4.5 Fluoreszenzmikroskopie

Die Auswertung des TUNEL-Assays erfolgte an einem Fluoreszenzmikroskop der Reihe IX 70 von Olympus mit Hilfe der Software „Vision“. Die Fluoreszenzlichtanregung bei 536 nm regt alle mit Propidiumiodid gefärbten Zellen rot an. Propidiumiodid, ein Farbstoff, der an DNA bindet und somit alle Zellen anfärbt, dient zur Ermittlung der Gesamtzellzahl. Die Anregung bei 495 nm regt alle fluoreszein-gefärbten Zellen, das heißt die TUNEL-positiven Zellen, zur Fluoreszenz an. Zunächst wurden einmalig bei 150facher Vergrößerung die Gesamtzellzahl von 20 Gesichtsfeldern an unterschiedlichen Herzen ermittelt und der Mittelwert errechnet. Diese Zahl galt nun als Gesamtzellzahl für jedes im Folgenden auf TUNEL-positive Zellen ausgezählte Gesichtsfeld. Bei gleicher

Vergrößerung wurden nun an jedem Schnitt die TUNEL-positiven Zellen von 20 Gesichtsfeldern ausgezählt und der Mittelwert errechnet. Da pro Herz zwei Schnitte gefärbt worden waren, wurden somit 40 Gesichtsfelder pro Herz ausgezählt. Die umgebenden Myofibrillen wurden als Anhaltspunkt gewertet, dass es sich bei den TUNEL-positiven Zellen um Kardiomyozyten handelte. Mit Hilfe der folgenden Formel konnte der Anteil TUNEL-positiver Zellen berechnet werden:

$$\text{Anteil (TUNEL - positive Zellen)} = \frac{\text{Mittelwert (TUNEL - positive Zellen)} \times 100}{\text{Mittelwert (Gesamtzellzahl)}}$$

Die Differenzierung zwischen Kardiomyozyten und anderen Zellen, wie zum Beispiel Endothelzellen, Fibrozyten oder Makrophagen, erfolgte anhand morphologischer Kriterien lichtmikroskopisch bei oben genannter Vergrößerung.

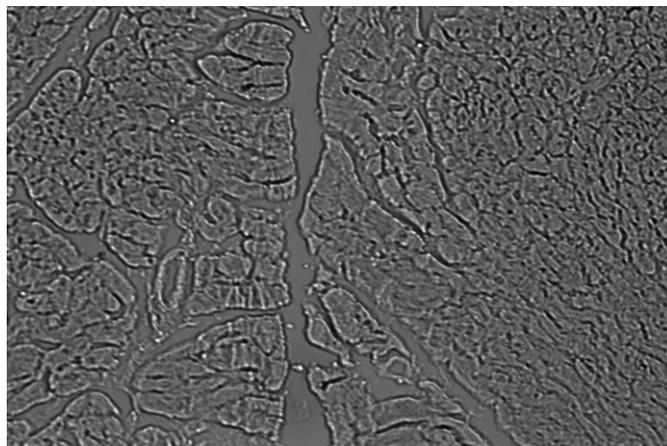


Abbildung 7: Durchlicht

150fache Vergrößerung eines Paraffinschnitts im Durchlicht.

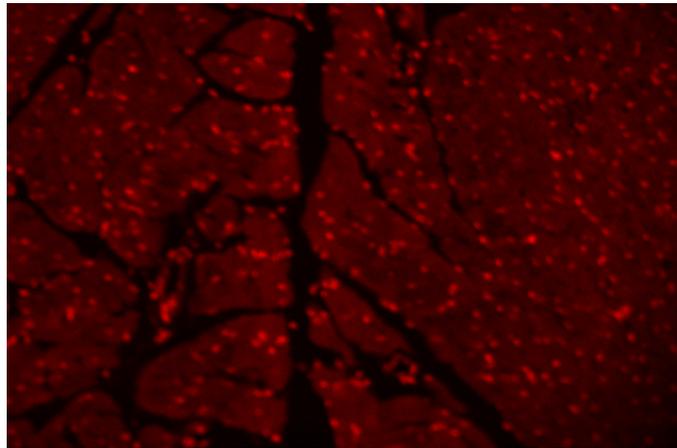


Abbildung 8: Propidiumiodidfärbung

Fluoreszenzlichtanregung mit Licht von 536 nm, das alle propidiumiodidgefärbten Zellen zeigt. 150fache Vergrößerung. Propidiumiodid ist ein Farbstoff, der an DNA bindet und somit alle Zellen anfärbt. Die Färbung mit Propidiumiodid und Mikroskopie bei 536 nm diente der Ermittlung der Gesamtzellzahl im eingestellten Gesichtsfeld.

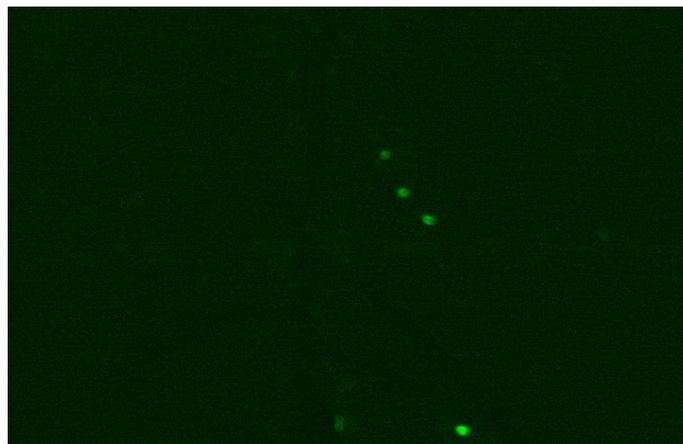


Abbildung 9: TUNEL-Färbung

150fache Vergrößerung des identischen Bildausschnittes wie oben. TUNEL-positive Zellen sind bei Anregung durch Licht von 495 nm Wellenlänge sichtbar. In diesem Bildausschnitt sind vier Zellen deutlich als TUNEL-positiv zu erkennen.

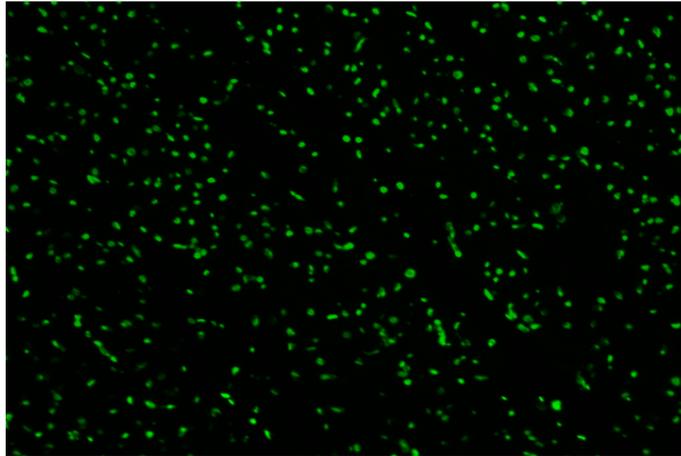


Abbildung 10: Positivkontrolle

150fache Vergrößerung einer Positivkontrolle. Der Paraffinschnitt wurde vor der Inkubation mit TdT mit DNase behandelt um die Funktion des TUNEL-Tests zu überprüfen. Es erscheinen nun alle Zellen bei 495 nm fluoreszenzgelabelt.

3.5 Proteinchemische und immunologische Methoden

3.5.1 Proteinisolation aus Rattenherzen

Für die Proteinisolation wurde jeweils die gleiche Scheibe der bei -80 °C tiefgefrorenen Rattenherzen verwendet. Das Gewicht der Scheiben betrug zwischen 100 und 150 mg. Den Proben wurde $5\ \mu\text{l}$ Lysispuffer pro 1 mg Gewebe zugegeben, bevor sie mit Hilfe des UltraTurrax auf Eis homogenisiert wurden. Das Homogenat wurde bei 4 °C und 14000 upm für fünf Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß gegeben, das Pellet verworfen. Das Proteinisolat wurde bei -20 °C gelagert.

Lysispuffer :

10x Lysispuffer	300 μl
PMSF	300 μl
Aqua dest. steril	2,4 ml

3.5.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proben wurden nach der Lowry-Methode für die Protein-Konzentrationsbestimmung vorbereitet. Je $50\ \mu\text{l}$ des Proteinhomogenats wurden zum Ansatz einer 10fachen und einer 20fachen Verdünnung mit NaCl verwendet. Die Standardreihe wurde aus Rinderserumalbumin (BSA) und NaCl angesetzt und bestand aus acht verschiedenen Konzentrationen

zwischen 20 µg/ml und 200 µg/ml. Die Extinktionsmessung der Standardreihe und der Proben erfolgte bei 750 nm gegen einen Leerwert (NaCl). Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Software „Lotus 1-2-3“. Anschließend wurden 300 µl des Proteinhomogenats mit 100 µl 4fach SDS im Schraubcup vermischt, gevortext und bei 98 °C für zehn Minuten inkubiert. Die Proben wurden ein bis zwei Minuten auf Eis gestellt bevor sie 30 Minuten bei 4 °C mit 14000 upm zentrifugiert wurden. Die Proben wurden wieder auf Eis gestellt. 300 µl des Überstandes wurden in ein neues Eppendorfgesäß pipettiert und mit 1fach SDS-Page auf eine einheitliche Proteinkonzentration von 5 µg/µl verdünnt. Nach Vortexen wurden die Proben aliquotiert und bei –20 °C gelagert.

Lowry-Mix:

Na ₂ CO ₃ 2 %	9 ml
Na-K-Tartrat (100mM)	0,5 ml
CuSO ₄	0,5 ml

Folin-Reagenz:

Folin	2 ml
NaCl	4 ml

SDS-Page-Buffer: **ad 10 ml Aqua dest.**

Tris-HCl Puffer (pH 6,8)	5 ml
SDS (Sodiumdodecylsulfate)	0,8 g
Glycerol	4 ml
Bromphenolblau	4 mg
DTT (Dithiothreitol)	0,62 g

3.5.3 Gelelektrophoretische Trennung des Proteingemisches

Die Trennung des zu untersuchenden Proteingemisches erfolgte nach Molekulargewicht mittels diskontinuierlicher SDS-Gelelektrophorese (Towbin 1979, Khyse-Andersen 1984). Dieses Verfahren erreicht eine hohe Trennleistung und Bandenschärfe und ermöglicht einen effizienten Transfer. Es wurde ein 1 mm dickes 3-8%iges Tris-Acetate-Gel verwandt. Jeweils 10 µl (entsprechend 50 µg Protein) der Proben wurden auf das Gel aufgetragen. Die Gelelektrophorese erfolgte für 70 Minuten bei konstant 150 V.

Elektrophoresepuffer	ad 1 l Aqua dest.
20x SDS Running Buffer (Tris-Acetate)	50 ml

3.5.4 Blotting: elektrophoretischer Transfer im Semi-Dry-Verfahren

Für den elektrophoretischen Transfer wählten wir das Verfahren des Semi-Dry-Blots, welches im Vergleich zum Wet-Transfer-Verfahren kurze Transferzeiten und geringe Puffervolumina zulässt. Als Blottingmembran wurde eine PVDF-Membran verwendet. Die Transferdauer betrug eine Stunde bei einer konstanten Spannung von 30 Volt. Zur Kontrolle des Transfers wurde das Gel anschließend mit Coomassie gefärbt.

3.5.5 Nachweisreaktion

Um unspezifische Bindung der Nachweisreagenzien zu verhindern, wurde der Proteinblot vor Beginn der Nachweisreaktion abgesättigt. Als Blocking-Solution diente 1 % BSA / 5 % Milchpuffer in PBST. Die Membran wurde für 90 Minuten bei Raumtemperatur in Blocking-Solution inkubiert. Der Primärantikörper (Verdünnung 1:1000) wurde ebenfalls in Milchpuffer gelöst. Die Bindung des Primärantikörpers erfolgte bei 4 °C über Nacht. Anschließendes Waschen in PBST (viermal sieben Minuten) entfernte überschüssige Antikörperlösung und unspezifisch gebundene Antikörpermoleküle. Als Sekundärantikörper dienten Meerrettich-Peroxidase-gekoppelte Immunglobuline. Die Inkubation des Sekundärantikörpers erfolgte für eine Stunde bei Raumtemperatur. Nach Entfernung der Zweitantikörperlösung wurde die Membran wie zuvor viermal für je sieben Minuten in PBST gewaschen.

PBST:	ad 2 l Aqua dest.
Na ₂ HPO ₄ x H ₂ O	23 g
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	5,92 g
NaCl	11,68 g

mit 10 M NaOH auf pH 7,5 einstellen
+ 2 ml Tween20

Milchpuffer:	ad 50 ml PBST
Skim Milk	2,5 g
BSA	0,5 g

3.5.6 Chemilumineszenzreaktion

Um die gebundenen Antikörper zu detektieren wurde die ECL (enhanced chemiluminescence)-Methode verwandt und die Signale durch Exposition eines Röntgenfilms aufgefangen. Die Röntgenfilme wurden digitalisiert und mit Hilfe der Software „Scion Image“ ausgewertet. Die Intensität der Bande wurde abzüglich des Hintergrundes über die Pixeldichte gemessen. Der Vergleich der Proben untereinander wurde durch Verwendung eines internen Standards ermöglicht.

3.5.7 Reblot

Wurde beim Auswerten der Röntgenfilme ersichtlich, dass es im Verlauf der Nachweisreaktion zu Fehlern gekommen war, so wurde die Membran für die Wiederholung des Blots aufbewahrt und die Nachweisreaktion wiederholt. Hierzu wurde die Membran in Strippingpuffer gelegt und in einem Schüttelwasserbad bei 50 °C 30 Minuten lang inkubiert. Die Membran wurde nachfolgend dreimal für je 10 Minuten in PBST gewaschen. Im Anschluss daran wurde die Nachweisreaktion beginnend mit der Blockierung wie in 3.5.5 beschrieben fortgesetzt.

Reblot-Puffer :	ad 100 ml Aqua dest.
200 mM Tris	31,25 ml
10% SDS	20 ml
Mercaptoethanol	699 µl

3.6 Molekularbiologische Methoden

3.6.1 RNA-Isolation

Das Myokardgewebe wurde bis zur RNA-Isolation in Eppendorfgläsern bei -80 °C gelagert. Die Herzscheiben wurden gewogen und pro 100 mg Gewebe mit 750 µl Trizol versetzt. Mit einem UltraTurrax wurden die Herzstückchen ca. fünf Minuten in Reagenzglasern auf Eis homogenisiert. Das Homogenat wurde fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, bevor zur DNA-Extraktion 200 µl Chloroform / 100 mg Gewebe zugegeben wurden. Es folgte eine Zentrifugation für 15 Minuten bei 4 °C und 13000 upm. Die

wässrige Phase wurde abpipettiert und in ein neues Eppendorfgefäß gefüllt. Nach Zugabe von 500 µl Isopropanol pro 100 mg Gewebe wurde dies zur Präzipitation der Nukleinsäuren zehn Minuten inkubiert. Es folgte eine weitere Zentrifugation für 15 Minuten. Der Überstand wurde verworfen und 1 ml 75%iges Ethanol zum Auswaschen von Salzen zugegeben. Bei 10000 upm wurde fünf Minuten bei 4° C zentrifugiert, der Überstand verworfen und der Waschschrift wiederholt. Das Pellet wurde zehn Minuten luftgetrocknet und in 50 µl DEPC gelöst. Nach einer 10-minütigen Inkubation bei 60 °Grad wurden zur Bestimmung der RNA-Konzentration 1/10 des Endvolumens mit 70 µl DEPC verdünnt und die Absorption bei 260 nm gemessen. Die RNA-Isolate wurden bei -80 °C tiefgefroren.

3.6.2 Polymerasekettenreaktion

3.6.2.1 RT-PCR

Die RNA-Isolate wurden auf Eis aufgetaut. Es wurde zunächst eine Stocklösung von jeder Probe angesetzt, die 1000 ng RNA / µl enthält, um gleiche Pipettierolumina zu ermöglichen. Die PCR wurde mit einem OneStep RT-PCR Kit der Firma Qiagen durchgeführt. Für mehr als eine Probe wurde zunächst ein Mastermix zusammenpipettiert, der pro Probe die folgenden Komponenten in den angegebenen Volumina enthielt:

Mastermix:	ad 25 µl Aqua dest. steril
5x Qiagen OneStep RT-PCR Buffer	5 µl
dNTP Mix	1 µl
5x Q-Solution	5 µl
Primer Bax forward	0,15 µl
Primer Bax reverse	0,15 µl
Primer Bcl-2 forward	0,15 µl
Primer Bcl-2 reverse	0,15 µl
Qiagen OneStep RT-PCR Enzyme Mix	1 µl

Die Primer waren in einer Endkonzentration von 0,6 µM pro Reaktion enthalten. Jeder Reaktion wurden 1000 ng RNA einer Probe zugesetzt (hierbei wurden Doppelansätze vorgenommen). Die Polymerasekettenreaktion lief nach folgendem Protokoll ab:

PCR-Ablauf:

Reverse Transkription	30 Minuten	50 °C
PCR-Aktivierung	15 Minuten	95 °C
3-Step-Cycling (28x):		
- Denaturierung	1 Minute	94 °C
- Annealing	50 Sekunden	54 °C
- Extension	30 Sekunden	72 °C
Final Extension	10 Minuten	72 °C

Zuvor war durch Zyklenreihen die optimale Zyklenzahl ermittelt worden. Sowohl Bax als auch Bcl-2 befanden sich bei 28 Zyklen in der linearen Amplifikationsphase.

Die Proben wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei -20 °C aufbewahrt.

3.6.3 Agarose-Gelelektrophorese

Für die Agarose-Gelelektrophorese wurden 1,5%ige Agarosegele eingesetzt. Zur Sichtbarmachung der DNA unter UV-Licht wurde den Agarosegelen $0,5\text{ }\mu\text{g/ml}$ Ethidiumbromid zugegeben. Je $20\text{ }\mu\text{l}$ einer Probe wurden mit $1,5\text{ }\mu\text{l}$ eines Ladepuffers gemischt und auf das Gel aufgetragen. Als Marker diente „SmartLadder“ der Firma Eurogentec. Die Elektrophorese erfolgte bei konstant 100 Volt für 60 Minuten. In direktem Anschluss erfolgte die Auswertung mit einer UV-Kamera und der Software „Scion Images“ vom digitalen Foto des Gels. Hierbei wurde die Intensität der Bande abzüglich des Hintergrundes bestimmt. Je höher der Wert war, desto stärker war die Bandenintensität und desto höher das Produkt der PCR.

TAE-Puffer (50x):	ad 1 l Aqua dest.
--------------------------	--------------------------

= Tris-Acetate + EDTA-Puffer

Trisbase	242 g
Eisessig	57,1 ml
EDTA 0,5 M (pH 8)	100 ml

Ladepuffer (6x):	ad 10 ml Aqua dest.
-------------------------	----------------------------

Bromphenolblau	0,025 g
Xylencyanol	0,025 g
Ficoll	1,5 g

3.7 Statistische Auswertung

Die Darstellung der Ergebnisse im Text erfolgte in Form von arithmetischen Mittelwerten \pm Standardabweichung vom Mittelwert. In den Abbildungen wurde der Standardfehler dargestellt. Die statistische Auswertung zu den unter 4.1 geschilderten Ergebnissen zur Ermittlung der geeigneten Reperfusionzeit wurden mittels einer Dunnett-Analyse durchgeführt. Die Auswertung der Ergebnisse 4.2 – 4.4 erfolgte durch Two-way-ANOVA-Testung.

4 ERGEBNISSE

4.1 Ermittlung der optimalen Reperfusionzeit

Zur Ermittlung der geeignetsten Reperfusionzeit führten wir zunächst Experimente an Herzen nicht medikamentös behandelte Tiere durch. Die Untersuchung des Anteils TUNEL-positiver Zellen nach jeweils 30-minütiger Ischämie und unterschiedlich langen Reperfusionzeiten ergab folgendes Ergebnis: Nach alleiniger Ischämie von 30 Minuten konnten mit dem TUNEL-Assay kaum apoptotischen Zellen detektiert werden. Der Anteil TUNEL-positiver Zellen betrug $0,05 \% \pm 0,04 \%$ ($n=3$). Erst nach einer Reperfusionphase konnten vermehrt apoptotische Zellen nachgewiesen werden. Nach einer einständigen Reperfusion lag der Anteil positiver Zellen bei $0,32 \% \pm 0,17 \%$ ($n=3$), nach zweistündiger Reperfusion ergab die Zählung TUNEL-positiver Zellen $1,34 \% \pm 0,01 \%$ ($n=3$) und eine dreistündige Reperfusion führte zu einem Anteil von $0,61 \% \pm 0,16 \%$ TUNEL-positiver Zellen ($n=4$). Der höchste Anteil TUNEL-positiver Zellen konnte somit nach einer Reperfusionzeit von zwei Stunden nachgewiesen werden. Es kam zu einem vierfachen Anstieg des Anteils TUNEL-positiver Zellen gegenüber einer einständigen Reperfusion ($p < 0,01$). Der Anteil positiver Zellen gegenüber einer dreistündigen Reperfusion ist ca. doppelt so hoch ($p < 0,01$). Um die Folgen der langen Perfusiondauer an sich abschätzen zu können wurden drei Herzen für drei Stunden und 40 Minuten ohne jegliche Intervention perfundiert (Kontrolle, K). Das Resultat waren $0,20 \% \pm 0,11 \%$ TUNEL-positiver Zellen ($n=3$). Vergleicht man die Herzen der beiden Gruppen, die insgesamt drei Stunden und 40 Minuten perfundiert wurden, so zeigt die Ischämie / Reperfusion - Gruppe eine Erhöhung des Anteils TUNEL-positiver Zellen um das dreifache gegenüber der Normoxie-Gruppe (K) ($p < 0,02$).

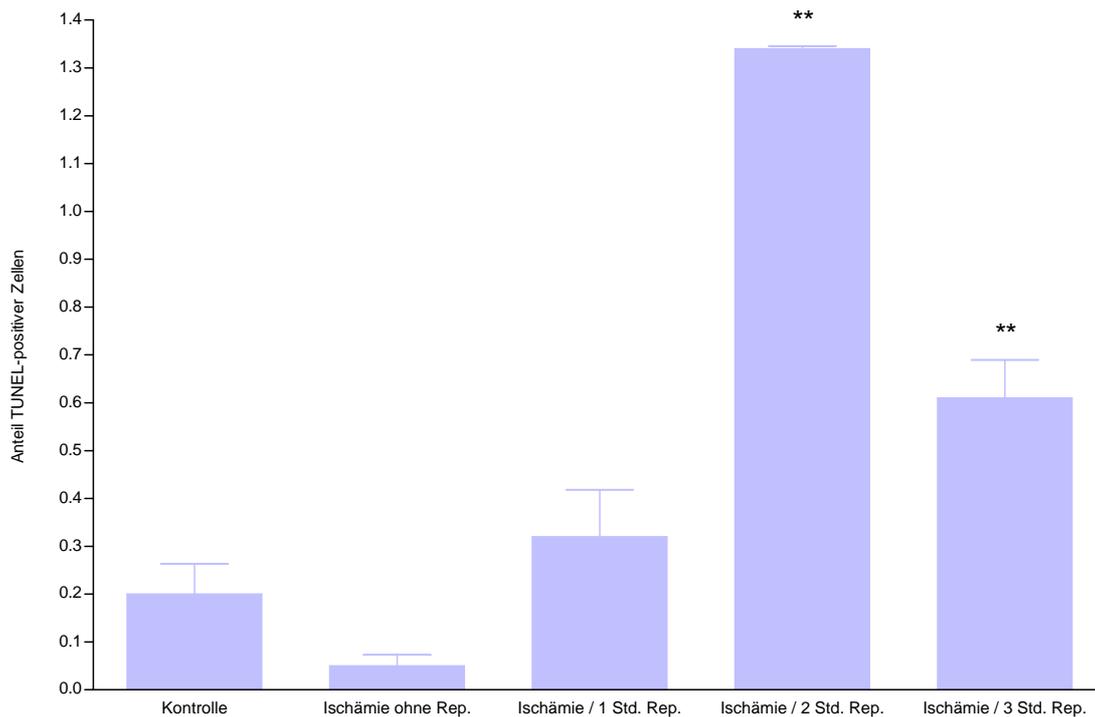


Abbildung 11: Reperfusionversuche

Die Ermittlung der optimalen Reperfuionszeit mit dem TUNEL-Assay ergab, dass eine alleinige Ischämie kein geeigneter Stimulus zur Auslösung von Apoptose darstellt. Eine einstündige Reperfusion führte zu einem geringgradigen Anstieg TUNEL-positiver Zellen gegenüber der alleinigen Ischämie. Erst eine Reperfuionsphase von zwei Stunden erwies sich als signifikant gegenüber der Kontrolle. Dargestellt sind die MW \pm SEM. ** = P < 0,01 vs. Kontrolle.

4.2 Einfluss von Simvastatin auf die Apoptose nach Myokardischämie

Der TUNEL-Assay an den Herzen der mit Simvastatin vorbehandelten Tiere und ihrer Kontrollgruppe ergab folgendes Ergebnis: Wie die Grafik Abbildung 12 zeigt, ergab sich unter Normoxie kein signifikanter Unterschied im Anteil TUNEL-positiver Zellen zwischen den Placebo- und Statin-Gruppen (0,05 % \pm 0,04 % (n=3) vs. 0,09 % \pm 0,05 % (n=5)). Unter Ischämie und Reperfusion kam es ebenfalls zu keinem signifikanten Einfluss durch Verabreichung des Simvastatins (1,08 % \pm 0,48 % , n=5) gegenüber dem Placebo (1,06 % \pm 0,26 % , n=5). Sowohl unter Placebo, als auch unter Simvastatin führte die Ischämie / Reperfusion zu einem signifikanten Anstieg TUNEL-positiver Zellen.

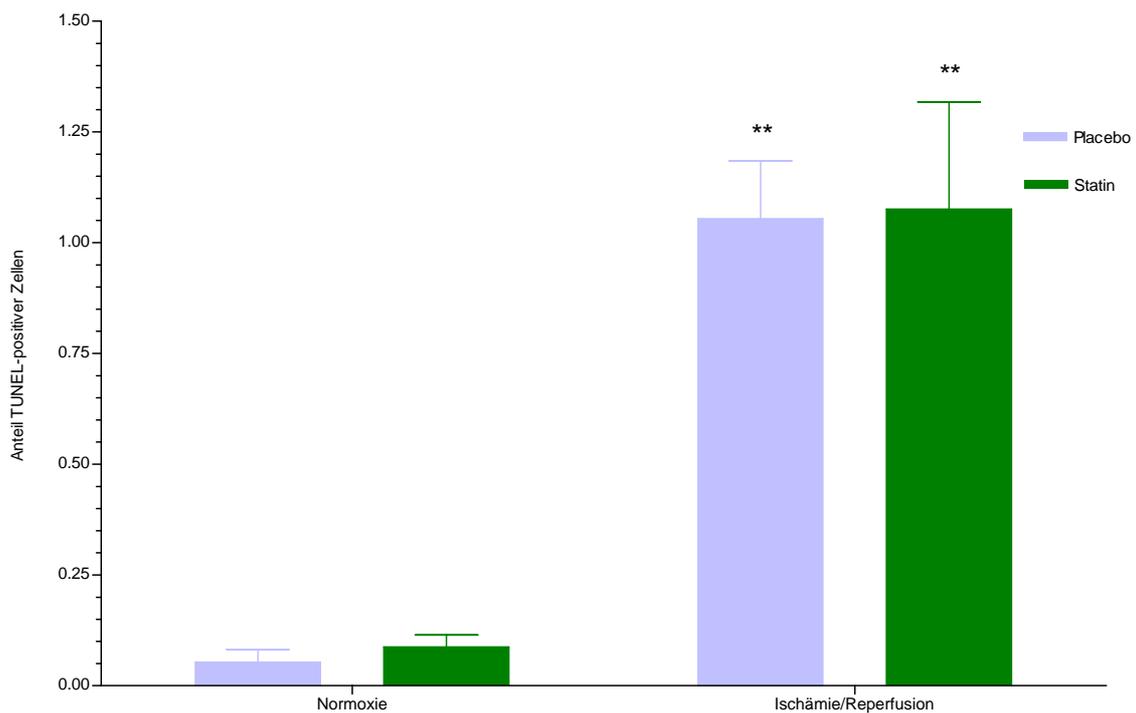


Abbildung 12: TUNEL-Assay

In beiden Subgruppen der Ischämie / Reperfusionsgruppe (I/R+Placebo und I/R+Statin) kam es gegenüber den Normoxie-Gruppen zu einem deutlichen Anstieg TUNEL-positiver Zellen. Die Verabreichung von Simvastatin hatte weder in den normoxischen, noch in den Ischämie / Reperfusionsversuchen eine Veränderung im Anteil TUNEL-positiver Zellen zur Folge. Die Ergebnisse sind dargestellt als MW \pm SEM. ** = P < 0,01 vs. korrespondierender Normoxie-Gruppe.

4.3 Einfluss von Simvastatin auf die Apoptosemodulatoren Bcl-2 und Bax nach Ischämie und Reperfusion

In der folgenden Grafik ist das Verhältnis des antiapoptotischen Proteins Bcl-2 zu dem proapoptotisch wirkenden Protein Bax dargestellt. Je höher der Wert ist, desto größer ist der Schutz der Zelle vor der Apoptose. Die Verabreichung von Simvastatin führte unter Normoxie nicht zu einer signifikanten Verschiebung des Bcl-2/Bax- Verhältnisses gegenüber der Placebo-Gruppe ($4,6 \pm 1,2$, n=5 vs. $5,5 \pm 1,3$, n=5). Auch unter Ischämie / Reperfusion ergab sich durch Simvastatin kein Einfluss auf das Verhältnis der beiden Apoptosemodulatoren im Vergleich zum Placebo ($4,2 \pm 0,8$, n=4 vs. $3,9 \pm 0,6$, n=4). Betrachtet man die Auswirkung der Ischämie / Reperfusion, so zeigte sich auch hier sowohl unter Statin als auch unter Placebo keine Wirkung auf das Bcl-2 / Bax- Verhältnis.

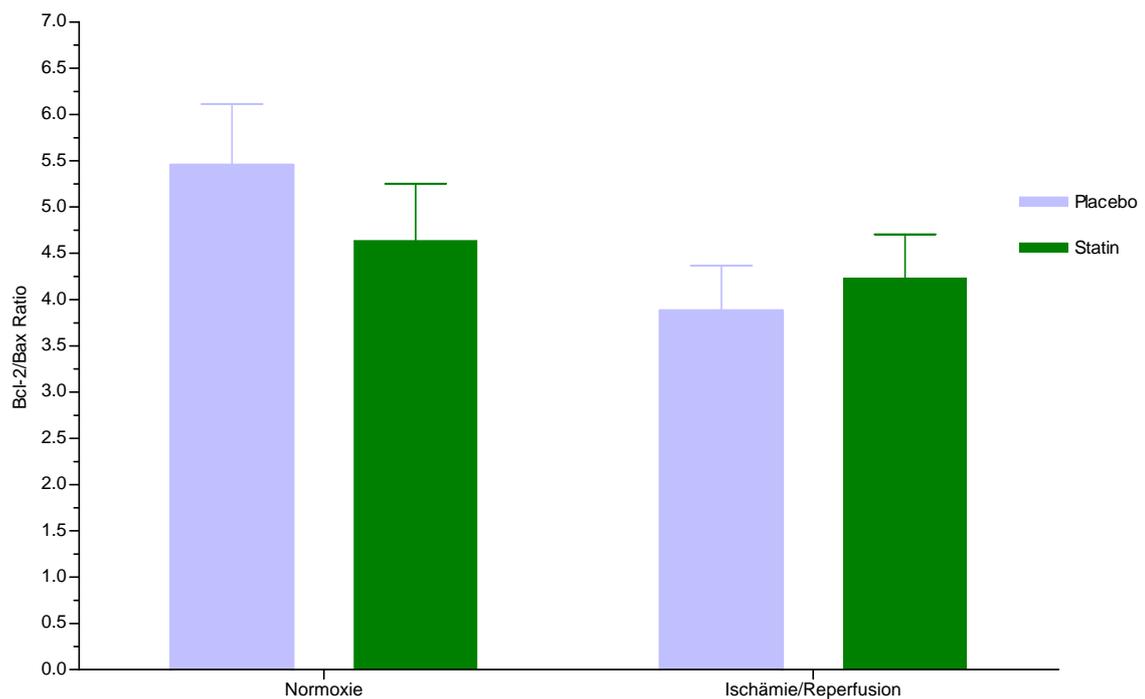


Abbildung 13: PCR Bcl-2 / Bax Ratio

Die Grafik zeigt das Verhältnis der beiden apoptoseregulatorischen Proteine Bcl-2 und Bax an. Das Verhältnis, in dem antiapoptotisches Bcl-2 und proapoptotisches Bax in der Zelle zueinander vorliegen, bestimmt, ob Apoptose induziert oder inhibiert wird. Es zeigte sich in unseren Versuchen, dass die Verabreichung von Simvastatin keinen Einfluss auf diese beiden Proteine ausübt und zu keiner Verschiebung des Verhältnisses führt. Die Ergebnisse sind dargestellt als $MW \pm SEM$.

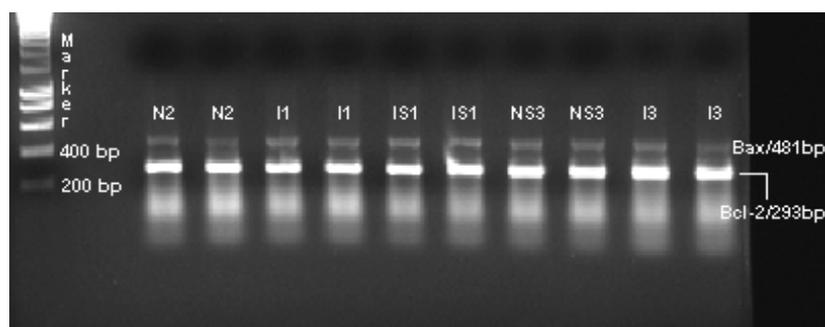


Abbildung 14: PCR Bcl-2 / Bax

Abbildung eines digitalen Fotos einer PCR. Im linken Bereich ist der Marker aufgetragen. Von den Proben wurden jeweils Doppelansätze angefertigt (N=Normoxie + Placebo, I=Ischämie / Reperfusion + Placebo, NS= Normoxie + Statin, IS= Ischämie / Reperfusion + Placebo, Zahl= Nummerierung der Proben). Die Bande für Bax erscheint bei 481 Basenpaaren (bp), die Bcl-2-Bande bei 293 Basenpaaren.

4.4 Einfluss von Simvastatin auf die eNOS-Expression im Westernblot

Die Auswertung der Röntgenfilme erfolgte wie in Kapitel 3.5.6 beschrieben. Sämtliche Zahlenangaben sind prozentuale Angaben bezogen auf die Pixeldichte des internen Standards. Die Administration des Simvastatins führte unter Normoxie nicht zu einer statistisch relevanten Änderung der eNOS-Expression gegenüber der unbehandelten Normoxie-Gruppe ($105 \% \pm 34,4 \%$, $n=5$ vs. $100 \% \pm 16,1 \%$, $n=5$). Vergleicht man die Simvastatin-Gruppe mit der Placebo-Gruppe unter ischämischen Bedingungen, so stellt sich auch hier kein Einfluss auf die eNOS-Expression dar ($139,4 \%$, $n=3$ vs. $85,5 \% \pm 29,5 \%$, $n=3$). Betrachtet man den Effekt von Ischämie und Reperfusion in beiden Gruppen (Statin und Placebo) auf die eNOS-Expression, so stellt sich auch hier verglichen mit der Normoxie keine Differenz dar.

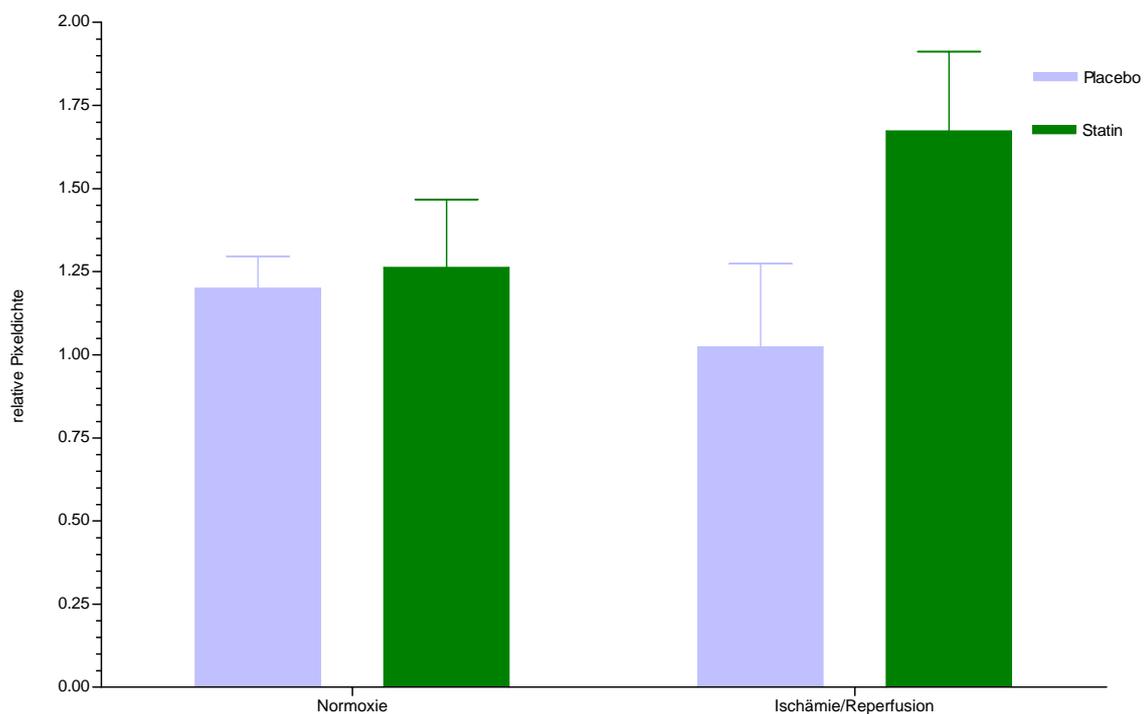


Abbildung 15: Westernblot des Proteins eNOS

Die Auswertung der Westernblots des Proteins eNOS ergab sowohl unter Normoxie als auch bei Ischämie und Reperfusion keinen Einfluss des Statins auf die eNOS-Expression gegenüber den korrespondierenden Placebo-Gruppen. Die Ergebnisse sind dargestellt als $MW \pm SEM$.

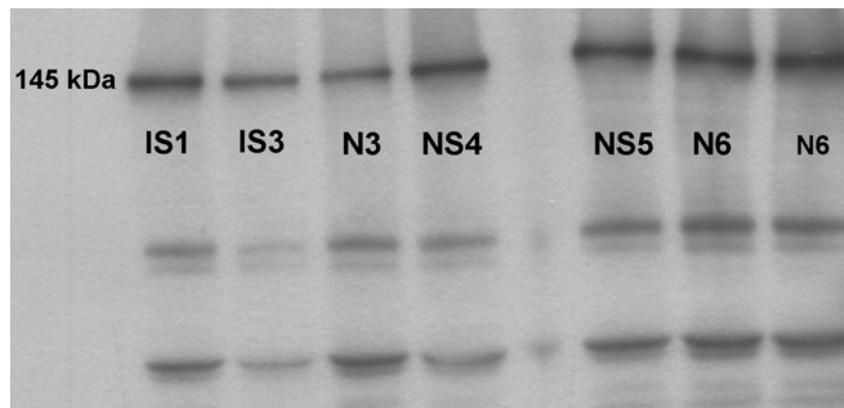
**Abbildung 16: Western Blot eNOS**

Abbildung eines Western Blots des Proteins eNOS. Die Bande des Proteins erscheint bei 145 kDa. N=Normoxie + Placebo, NS=Normoxie + Statin, I=Ischämie + Placebo, IS=Ischämie + Statin, Zahl= Probennummer.

5 DISKUSSION

5.1 Auswirkungen unterschiedlicher Reperfusionzeiten auf das Auftreten von Apoptose

Wie unter 2.4 dargestellt konnte in den letzten Jahren deutlich gezeigt werden, dass eine alleinige Ischämie keinen adäquaten Auslöser für die mit den aktuell zur Verfügung stehenden Methoden nachweisbare Apoptose darstellt. Entscheidender Faktor für den energieabhängig ablaufenden Vorgang der Apoptose scheint eine auf die Ischämie folgende ausreichend lange Reperfusionphase zu sein [53]. An diesem Punkt ist detailliertere Information über das Zeitfenster unabdingbar, in dem apoptosemodulierende Substanzen getestet werden können.

Klainguti et al. konnten bei der Perfusion von Rattenherzen mit dem Langendorff-Modell zeigen, dass eine 20-minütige Ischämie und eine sich anschließende 40 Minuten dauernde Reperfusion keinen ausreichenden Stimulus darstellen, um Apoptose nachzuweisen. Eine Folge von 40 Minuten Ischämie und 2h Reperfusion führte jedoch zu einem deutlichen Anstieg der Apoptose [30].

In den Versuchen von Dumont et al., die an Mäuseherzen durchgeführt wurden, stellte sich eine 15-30-minütige Ischämie und eine zwischen 30 und 90 Minuten dauernde Reperfusion als adäquates „Apoptosefenster“ heraus [11].

Untersuchungen von Scarabelli et al. an Kardiomyozyten der Ratte ergaben, dass erst nach einer zweistündigen Reperfusionphase im Anschluss an eine 30-minütige Ischämie eine homogene Distribution TUNEL-positiver Zellen im Vergleich zu kürzeren Reperfusionzeiten zu beobachten ist [52].

Das sich in unseren Versuchen als optimal ergebende Zeitfenster zum Nachweis von Apoptosevorgängen war eine 30 Minuten dauernde Ischämie und eine zweistündige Reperfusion. Bei kürzerer Reperfusionsdauer zeigte sich noch kein signifikanter Anstieg apoptotischer Zellen im Vergleich zu den Kontrollen. Interessant ist jedoch, dass nach länger als zwei Stunden dauernder Reperfusion, die Anzahl der mit unseren Methoden nachweisbaren apoptotischen Zellen wieder abnimmt. Eine Erklärung dieses Effekts kann die von Majno und Joris beschriebene Theorie sein, dass ab diesem Punkt eine so genannte zweite Phase der Apoptose abläuft, d.h. die Apoptose soweit fortgeschritten ist, dass sie

mit nekroseähnlichen Veränderungen einhergeht, wie z.B. dem Zerfall der apoptotischen Körperchen. Die zu einem späten Zeitpunkt in der apoptotischen Zelle ablaufenden Veränderungen sind der Nekrose sehr ähnlich und somit auch durch apoptosespezifische Nachweismethoden von nekrotischen Zellen nur schwer zu unterscheiden [39]. Die Zelle ist zu diesem Zeitpunkt folglich auch nicht mehr durch apoptoseblockierende Maßnahmen vor dem Zelltod zu bewahren und somit für unsere Untersuchungen nicht von Bedeutung. Betrachtet man die Apoptoseraten des TUNEL-Assays in der Literatur, so findet man bei ähnlichem Versuchsaufbau große Schwankungen, die auf die unterschiedliche Durchführung des Assays in Bezug auf Gewebetyp und Gewebepräparation zurückzuführen sind, da die Färbekinetik abhängig ist von der Erreichbarkeit der DNA-Strangbrüche für die Färbereagenzien [23],[50].

Eine entscheidende Rolle bei den Untersuchungen zum zeitlichen Fenster der Apoptose bei Ischämie / Reperfusionsversuchen scheinen spezies- und methodenabhängige Unterschiede zu spielen. Beispielsweise ist der Apoptosenachweis durch Annexin-V-Labeling zeitlich früher möglich als der Nachweis der Apoptose mit dem TUNEL-Assay, da die Exposition des durch Annexin-V markierten Phosphatidylserins einen der ersten Schritte beim Ablauf der Apoptose darstellt [11],[12]. Es kommt somit sicherlich auf die gewählten Methoden an, wie das Apoptosefenster festgelegt wird. Fest steht jedoch, dass die Reperfusion eine entscheidende Rolle spielt.

Die Sensitivität des TUNEL-Assays ist hoch, da apoptotische Vorgänge nachgewiesen werden können, noch bevor es zu morphologischen Veränderungen der Zelle kommt oder DNA-Fragmente im Zytoplasma nachweisbar sind [5],[49]. Die Spezifität des TUNEL-Assays hat sich in den letzten Jahren jedoch als etwas eingeschränkt herausgestellt. Während des Vorgangs der Apoptose erzeugen zwei apoptosespezifische DNAsen, die Ca-abhängige DNase 1 und die pH-abhängige DNase 2, Doppelstrangbrüche in der internukleosomalen DNA mit ein oder zwei Basen langen Überhängen am 3'-Ende. Unterschiedliche Endo- und Exonukleasen führen andererseits während der Nekrose zu Doppelstrangbrüchen mit glatten Enden [62].

Die Technik des TUNEL-Assays wurde in Abschnitt 3.4.3 bereits erläutert, es sollen jedoch noch einige wichtige Erkenntnisse hinzugefügt werden. Zum einen detektiert der TUNEL-Assay auch Einzelstrangbrüche, wodurch auch einige nekrotische Zellen TUNEL-positiv erscheinen können, zum anderen ist die Exposition von 3'-OH-Überhängen kein alleiniges Apoptosekennzeichen. Dieses kann auch während unspezifischer Schäden oder

Synthese- u. Reparaturvorgängen auftreten. Die Anzahl der typischen Doppelstrangbrüche in apoptotischen Zellen, das heißt solche mit Überhängen am 3'-OH-Ende, ist jedoch so groß, dass diese anhand des Grades der Fluoreszenz von nicht-apoptotischen Zellen unterschieden werden können [22],[28],[31],[50],[62],[66].

Die Technik des TUNEL-Assays ist sehr empfindlich und erfordert eine sorgfältige Standardisierung und Titration der proteolytischen Vorbehandlung und der TdT-Konzentration. Andernfalls resultiert eine hohe Fraktion TUNEL-positiver Nicht-Kardio-myozyten [31],[50].

Das Ausmaß der positiv gelabelten Zellen variiert erheblich abhängig vom experimentellen Design: Der Ischämiedauer, der Spezies und der Sensitivität des Assays im einzelnen Labor. Zu beachten gilt außerdem, dass das Zeitfenster in dem apoptotische Zellen mit dem TUNEL-Assay nachgewiesen werden können, begrenzt ist [28].

Trotz dieser Einschränkungen hat sich der TUNEL-Assay als ein wichtiges Instrument zum Nachweis des programmierten Zelltodes etabliert, da er die einzige Möglichkeit bietet, Apoptose semiquantitativ im Myokard zu messen [62].

5.2 Effekt von Statinen auf die Apoptose

Einen bisher nur wenig untersuchten Teilaspekt der pleiotropen Effekte der HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren stellt ihr Einfluss auf die Apoptose dar. Die wenigen bisher publizierten Daten lassen noch keine eindeutige Aussage zu. Die unterschiedlichen Auswirkungen der Statine auf den apoptotische Zelltod scheinen vor allem vom Typ des Gewebes, aber auch von den pharmakologischen Eigenschaften des Statins abhängig zu sein [7],[20].

Die Ergebnisse der Studien von Guijarro et al. zeigten, dass lipophile Statine, wie Atorvastatin, Simvastatin und Lovastatin an glatten Gefäßmuskelzellen Apoptose induzieren, während hingegen Pravastatin, ein hydrophiles Statin, keinen Einfluss auf die Apoptose nahm. Es ist anzunehmen, dass durch die hydrophilen Eigenschaften des Pravastatins kein wirksamer Medikamentenspiegel im Zytoplasma erreicht werden kann [20].

Chen et al. untersuchten den Einfluss von Statinen auf den Akt-Signaltransduktionsweg in Endothelzellen und glatten Muskelzellen [7]. Akt fungiert durch die Phosphorylierung von Caspasen als antiapoptotisches Protein [6],[9]. Während Statine den Akt-Signal-

transduktionsweg in Endothelzellen aktivieren und die Apoptose hemmen, blockieren sie die Akt-Aktivierung in glatten Muskelzellen und induzieren über Wirkungen auf die Phosphatidylinositol 3-Kinase oder Rho die Apoptose [7].

In vorausgegangenen Versuchen unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass Statine zu einer deutlichen Senkung der Myokardinfarktgröße nach Reperfusion führen. Diese Infarktgrößensenkung war unabhängig von Veränderungen des Plasmacholesterinspiegels und trat im Zusammenhang mit einer erhöhten eNOS-Aktivität auf. Diese Resultate zeigen auf, dass Statine neben ihrer cholesterinsenkenden Wirkung weitere klinisch interessante Effekte haben [61]. Die Frage, ob der oben beschriebene Effekt der statinvermittelten Senkung der Infarktgröße auf die Verminderung einer bestimmten Form des Zelltods, nämlich der Apoptose, zurückzuführen ist, führte zu den in dieser Arbeit beschriebenen Versuchen.

In dem von uns verwandten Modell konnten wir keinen pro- oder antiapoptotischen Effekt von Simvastatin auf Kardiomyozyten erkennen. Die Analyse des TUNEL-Assays zeigte sowohl unter normoxischen als auch unter ischämischen Bedingungen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Placebogruppen und den Simvastatingruppen.

Viele Gene stehen in engem Zusammenhang mit der Regulation des programmierten Zelltodes. Als herausragend wichtige Genfamilie bei dieser Regulation hat sich die „Bcl-2-Familie“ erwiesen, zu der die beiden Proteine Bcl-2 und Bax gehören. Das Verhältnis von Bcl-2, als antiapoptotischer Regulator, und Bax, als proapoptotischer Regulator, spielt eine entscheidende Rolle bei der Frage, ob eine Zelle apoptotisch wird oder nicht [66]. Über verschiedene Domänen fügen sich die einzelnen Mitglieder der Bcl-2-Familie zu Heterodimeren zusammen, die jedoch im Gegensatz zu den isoliert vorliegenden Proteinen dann keine apoptoseregulatorische Wirkung mehr haben. Somit entscheidet das Verhältnis, in dem die einzelnen Bcl-2-Familienmitglieder vorliegen, über das Schicksal der Zelle. Das Überwiegen des antiapoptotischen Proteins Bcl-2 schützt somit die Zelle vor der Apoptose, während ein Überwiegen von Bax die Entstehung der Apoptose fördert [63]. Es gibt jedoch noch weitere Mechanismen, über die die Mitglieder der Bcl-2-Familie in der Lage sind, die Apoptose zu regulieren. Über Formation zu Kanälen in der Mitochondrienmembran können sie zur Freisetzung von Cytochrom c führen oder direkt die Aktivität von Caspasen über Adaptermoleküle regulieren. Durch Interaktion mit anderen mitochondrialen Proteinen, wie VDAC (voltage dependent anion channel) oder ANT (adenosine nucleotide

transporter) können ebenso Kanäle formiert werden, die Cytochrom c freisetzen oder die mitochondriale Homöostase regulieren [24].

Bei der Auswertung des Bcl-2 / Bax-Verhältnisses konnten in unseren Versuchen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Kontrollgruppen und den Simvastatingruppen festgestellt werden. Zu beachten ist jedoch, dass in der PCR von Bcl-2 und Bax ein tendenzieller Apoptoseanstieg in der Ischämie - Placebo - Gruppe, gegenüber der Normoxie - Placebo - Gruppe nachgewiesen werden konnte. Kritisch anzumerken ist, dass es aufgrund der niedrigen n-Werte bei der Bcl-2 / Bax-PCR schwierig ist, signifikante Unterschiede zu erreichen. Es ist somit zu sagen, dass die statinvermittelte Senkung der Infarktgröße wahrscheinlich nicht apoptosevermittelt ist.

5.3 Einfluss von Simvastatin auf die eNOS-Expression

Laufs et al. demonstrierten in Versuchen an Zellkulturen humaner Endothelzellen, dass Simvastatin die eNOS-Downregulation durch oxLDL blockiert und die eNOS-Proteinlevel über das Ausgangslevel anhebt. Der Mechanismus, der zum Anstieg der eNOS-Expression führt, ist am ehesten die Hemmung der HMG-CoA-Reduktase, da der Effekt durch gleichzeitige L-Mevalonat-Gabe gehemmt wird. Die Steigerung der eNOS-Expression erwies sich als abhängig von der Simvastatinkonzentration und der Dauer der Simvastatinbehandlung [33]. In weiteren Versuchen wiesen Laufs und Liao in ihren Experimenten nach, dass Statine keinen Einfluss auf die eNOS-Gen-Transkription haben, sondern ihr Effekt auf eine Erhöhung der mRNA-Halbwertszeit zurückzuführen ist. Die Aktivierung von Rho führt nämlich zu einer Downregulation der eNOS-Expression, zum anderen kommt es durch Rho-vermittelte Veränderungen im Zytoskelett zur eNOS mRNA-Destabilisierung und Hemmung der mRNA-Translokation. Die Inhibition der Rho-GTPase-Aktivität durch HMG-CoA-Reduktase-Hemmer führt somit zur eNOS mRNA-Stabilisierung und Steigerung der eNOS-Aktivität [34].

Martínez-González et al. erkannten ebenso, dass Statine auf einem posttranskriptionellen Weg die Stabilisierung der eNOS mRNA-Halbwertszeit bewirken und so einen kompensatorischen Mechanismus schaffen, der ein Gegengewicht zur durch die Hypercholesterinämie beeinträchtigten NO-abhängigen Endothelfunktion darstellt [42].

Der Einfluss von Simvastatin auf den Ischämie-Reperfusionsschaden durch Modulation der NO-Synthase wurde von Di Napoli et al. untersucht. Simvastatin-Gabe 20 Minuten vor

Ischämiebeginn führt an den im Langendorff-Modus perfundierten Rattenherzen zu einer Kardioprotektion gegen mechanische Dysfunktion, zu einer Reduktion des CK-Anstiegs in der frühen Reperfusionphase, zu einer Verringerung des Reperfusionsschadens und schlussendlich zur Blockierung der eNOS mRNA-Downregulation durch Ischämie und Reperfusion. Aufgrund der Akutgabe des Simvastatins in diesem Experiment ist der geschilderte Effekt klar unabhängig von Plasma- und intrazellulären Cholesterinspiegeln [10].

In ihren Studien an Endothelzellen konnten Feron et al. zeigen, dass Atorvastatin die NO-Produktion durch Senkung der Caveolin-1-Expression, unabhängig von der extrazellulären LDL-Cholesterin-Konzentration fördert. Das Strukturprotein Caveolin hemmt die NO-Freisetzung aus Endothelzellen durch Bildung eines hemmenden Heterokomplexes zwischen Caveolin-1 und eNOS. Mit der Senkung der Caveolin-1-Expression durch Atorvastatin wird hier ein weiterer posttranskriptioneller Regulationsmechanismus der eNOS-Aktivität bekannt [13].

In unseren Experimenten untersuchten wir die eNOS-Expression am Rattenherzen nach Placebo- bzw. Simvastatin-Gabe und Langendorff-Perfusion nach dem Ischämie / Reperfusion - Protokoll und nach dem Normoxie-Protokoll. Die Untersuchungen mit dem Western Blot ergaben keine signifikante Steigerung der eNOS-Expression in der Normoxie + Statin - Gruppe gegenüber der Normoxie + Placebo - Gruppe, ebenso keinen signifikanten Unterschied zwischen der Normoxie + Statin - Gruppe und der Ischämie + Statin - Gruppe. Ein tendenzieller Anstieg der eNOS-Expression lässt sich in der Ischämie + Statin - Gruppe verglichen mit der Ischämie + Placebo - Gruppe erkennen. Es kann vermutet werden, dass sich bei einer größeren n-Zahl hier ein signifikanter Unterschied ergeben würde. Die geringe n-Zahl ist somit auch an dieser Stelle kritisch zu beurteilen. Eine Erklärung für den tendenziellen Anstieg kann sein, dass sich die Wirkungen von Ischämie und Statinen auf die eNOS-Expression ergänzen und somit in diesem Versuchsaufbau nur bei Zusammentreffen beider Bedingungen zu einer Steigerung der eNOS-Expression führen. Der Vergleich mit anderen Studien diesbezüglich ist schwierig, da die eNOS-Expression abhängig ist von der Ischämie- und Reperfusionsdauer und der Art des Versuches: In vitro Perfusion oder in situ Operation. Eine prolongierte Reperfusionsdauer führt zur Abnahme der eNOS-Aktivität und somit der eNOS-Konzentration, während die kardiale eNOS-Konzentration in der frühen Reperfusionphase erhöht ist. Die Ischämie / Reperfusion- induzierte Produktion freier Radikale

unterscheidet sich bei in vitro perfundierten Herzen und in situ Herzen und führt somit zu unterschiedlich starker NO-Freisetzung [56].

5.4 Klinische Bezüge

Aus klinischer Sicht liegt das Hauptaugenmerk der zukünftigen Forschung mit Statinen nicht mehr darauf, ob extrahepatische Effekte in Tier- und Zellkulturmodellen vorliegen, sondern auf der quantitativen Bedeutung des klinischen Benefits der pleiotropen Effekte der Statine zusätzlich zu ihren lipidsenkenden Eigenschaften.

Ebenso tritt die Frage der optimalen Dosierung der Statine in den Vordergrund, wenn man an den Beitrag der pleiotropen Effekte an der Wirkung der HMG-CoA-Reduktase-Hemmer denkt. Ist das Behandlungsziel ein bestimmter Lipidwert oder soll eine feste Dosis eingesetzt werden? Profitieren Patienten mit akuter Myokardischämie von einer Akut-Statingabe, das heißt, besteht Bedarf für i.v.-Präparationen von Statinen [32]?

Neue NO-freisetzende Statine, die ein überragendes antiinflammatorisches und anti-proliferatives Wirkprofil im Vergleich zum nativen Statin haben, befinden sich in der Entwicklung [59].

Untersuchungen von Myokardinfarkten des Menschen ergaben, dass der Anteil apoptotischer Zellen in ähnlichen Bereichen liegt, wie in unseren Versuchen. Diese vergleichsweise gering erscheinenden Zahlen apoptotischer Zellen haben jedoch aus den folgenden Gründen durchaus klinische Relevanz: Die Zeit, die eine einzelne Zelle benötigt, um die Apoptose zu durchlaufen, ist wahrscheinlich nur sehr kurz und erlaubt somit einen, über die gesamte Zeitspanne der postinfarziellen Erholungszeit gesehenen, erheblichen Zellverlust [51]. Der von uns und anderen gemessene Anteil apoptotischer Zellen stellt somit nur eine Momentaufnahme dar. Der über den gesamten Zeitraum betrachtete Zellverlust durch Apoptose liegt vermutlich wesentlich höher. Dies rechtfertigt somit durchaus die Überlegung, ob durch die Blockade der Apoptose ein Benefit nach Myokardinfarkt erzielt werden kann. Im Gegensatz zur Nekrose, die als gänzlich irreversibler Vorgang angesehen wird, lässt der schrittweise Ablauf des programmierten Zelltodes den Schluss zu, dass hier therapeutische Interventionen möglich sind [17].

Nicholson beschreibt in seinem Review in „Nature“ drei viel versprechende therapeutische Eingriffsmöglichkeiten zur Regulation der Apoptose. Erstens der Einsatz von Antisense-Oligonukleotiden, die die Balance zwischen pro- und antiapoptotischen Mitgliedern der

Bcl-2-Familie beeinflussen. Zweitens existiert die Möglichkeit, über Polypeptid-modulatoren in den „death-receptor-pathway“ einzugreifen und die Auslösung von Apoptose zu verhindern. Als dritte Möglichkeit verweist er auf die Caspasen, insbesondere die Effektor-Caspase-3, als therapeutisches Angriffsziel. Potente Caspase-Inhibitoren sind bereits von vielen Pharmafirmen entwickelt worden und befinden sich in der präklinischen oder klinischen Erprobung.

Dabei kommt die Frage auf, ob die Apoptose selektiv in einem einzelnen Organ beeinflusst werden kann, ohne Nebenwirkungen auf andere wichtige Systeme [46]. So wäre zum Beispiel die Hemmung der Apoptose bei der Therapie von Erkrankungen wie der Herzinsuffizienz oder neurodegenerativen Erkrankungen erwünscht, während hingegen die Aktivierung der Apoptose bei Krebserkrankungen, in denen der Zelltod nur unzureichend abläuft, das Ziel ist [58]. Die feinen Unterschiede in den Genfamilien scheinen gezielte Eingriffe an einem bestimmten Organsystem jedoch möglich zu machen, dies muss aber noch *in vivo* nachgewiesen werden.

Außerdem stellt sich die Frage, ob die Zellen, die vor der Apoptose gerettet werden, weiter funktionstüchtig sind. Aller Wahrscheinlichkeit nach wird dies vom Zelltyp, dem Kontext und dem Grad des Schadens abhängig sein [46]. Ebenso sind weitere Informationen über das korrekte Timing der antiapoptotischen Therapie notwendig [58].

Zhao et al. zeigten in einer Ischämie-Reperfusion-Studie an Herzen von Hunden, dass die Behandlung mit ATA (Aurintricarboxylsäure), einem Endonuklease-Inhibitor, während der Reperusionsphase die Infarktgröße reduziert und die regionale Kontraktilität verbessert. Es zeigte sich, dass sich zusammen mit der Ausdehnung der Infarktgröße, die Apoptose im Grenzgebiet des Infarkts zunehmend von der frühen zur späten Reperusionsphase entwickelt, was den Anschein erweckt, die Apoptose sei an der Exazerbation des Myokardschadens beteiligt. Es ist möglich, dass apoptotische Zellen im Grenzgebiet sekundär nekrotisch werden und das Ausmaß des Infarkts teilweise von der verzögerten Apoptose während der Reperfusion abhängt. Wenn folglich die Endphase des Reperfusionsschadens von der Apoptose dominiert wird, gibt es dann nicht ein therapeutisches Fenster, in dem das „Selbstmordprogramm“ gestoppt werden kann? Würde die Hemmung der Apoptose somit das Ausmaß des Infarkts nach myokardialer Ischämie verkleinern [65]?

Mocanu et al. beobachteten, dass die Verabreichung eines Caspase-Inhibitors während der Reperusionsphase in einem Ischämie-Reperusions-Modell am Rattenherzen, die Infarktgröße senkte, und zeigten somit eine verheißungsvolle therapeutische Option zur

Linderung des Reperfusionsschadens, deren genauer Wirkmechanismus jedoch noch zu klären ist [44].

Effektiver Schutz vor Reperfusionsschaden im Tierversuch kann auch durch Überexpression entscheidender antioxidativer Enzyme sowie von Hitzeschockproteinen und Überlebensgenen wie Bcl-2 und Akt erreicht werden [43].

Aufgrund der oben erläuterten Schwierigkeiten des TUNEL-Assays bleibt allerdings fraglich, ob es sich bei der TUNEL-positiven Zellpopulation überhaupt um eine der antiapoptotischen Therapie zugänglichen Zellpopulation handelt, da die Kardiomyozyten sich eventuell schon in einem irreversiblen Stadium der Apoptose befinden und durch eine antiapoptotische Therapie somit nur die Form des Zelltodes verändert wird [23].

Das Haupttherapieziel ist die Entdeckung von Pharmaka, die das Ausmaß des Gewebeeruntergangs während Ischämie und Reperfusion beeinflussen können. Insbesondere zusätzlich zur Thrombolyse verabreichbare Medikamente, die den Reperfusionsschaden vermindern und somit zu einem größeren Benefit als die Reperfusion allein führen würden, können das klinische „outcome“ signifikant beeinflussen [44].

Es sind somit in den letzten Jahren eine Vielzahl von Möglichkeiten entdeckt worden, die Apoptose zu beeinflussen. Ob diese Möglichkeiten um Beispiel bei der Modulation des Reperfusionsschadens und somit der Senkung der Infarktgröße von klinischem Nutzen sind, bleibt noch klinisch zu erforschen.

Erste Schritte auf dem Weg apoptotische Zellen im Myokardinfarkt beim Menschen sichtbar zu machen, wurden von Hofstra et al. gemacht. Sie konnten die erhöhte Aufnahme von Tc99m-markiertem Annexin-V, einem frühen Apoptosemarker, im Infarktgebiet nachweisen und bereiten so den Weg für die Erprobung klinischer Interventionen [12],[25].

6 ZUSAMMENFASSUNG

In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, daß HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren, so genannte Statine, neben ihren cholesterinsenkenden Eigenschaften auch so genannte pleiotrope Effekte besitzen. Diese Effekte betreffen auch das kardiovaskuläre System. Frühere Versuche unserer Arbeitsgruppe ergaben, daß Statine die Infarktgröße über eine Steigerung der eNOS-Aktivität in einem Ischämie-Reperfusion-Modell in vivo an der Ratte um bis zu 49 % senken.

Die hier geschilderten Versuche dienen der Klärung der Frage, ob diese Infarktgrößenreduktion auf eine Reduktion der Apoptose zurückzuführen ist.

Männlichen Wistar-Ratten wurde 7 Tage lang Simvastatin oder ein Placebo verabreicht. Im Anschluss daran wurden die Herzen entnommen und nach dem Modell des isoliert perfundierten Rattenherzens an der Langendorff-Apparatur perfundiert. Hierbei wurde je die Hälfte der Tiere aus der Placebo- bzw. Simvastatin-Gruppe nach dem normoxischen Protokoll, die andere Hälfte nach dem ischämischen Protokoll perfundiert. In Vorversuchen wurden für das ischämische Protokoll eine 30-minütige Stop-Flow-Ischämie und eine darauf folgende 120 Minuten lange Reperfusion als geeignet ermittelt. Die Herzen wurden dann mithilfe des TUNEL-Assays und der Bcl-2 / Bax - PCR auf Apoptose untersucht.

Die Auswertung des TUNEL-Assays ergab keinen Unterschied im Anteil TUNEL-positiver, d. h. apoptotischer Zellen zwischen den Placebo- und Simvastatin-behandelten Tieren. Ebenso konnte in der PCR der beiden Apoptosemodulatoren Bcl-2 (antiapoptotisch) und Bax (proapoptotisch) keine Änderung des Verhältnisses der beiden Proteine festgestellt werden.

Bringt man die geschilderten Ergebnisse mit den Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe in Zusammenhang, so ergibt sich die Folgerung, dass der infarktgrößenreduzierende pleiotrope Effekt der Statine somit nicht auf eine Senkung der Apoptose, sondern auf eine Verminderung der Nekrose zurückzuführen ist.

Es bleibt insbesondere klinisch zu erforschen inwieweit der Einsatz von Statinen zur Kardioprotektion nach einem Myokardinfarkt wirkungsvoll ist und ob antiapoptotisch wirksame Pharmaka im Bereich der Kardiologie eine Rolle spielen können.

7 LITERATURVERZEICHNIS

1. **Myocardial infarction redefined--a consensus document of The Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee for the redefinition of myocardial infarction**
Eur.Heart J. 2000; 21: 1502-1513
2. Antman, E. M., Lau, J., Kupelnick, B., Mosteller, F., and Chalmers, T. C.
A comparison of results of meta-analyses of randomized control trials and recommendations of clinical experts. Treatments for myocardial infarction
JAMA 1992; 268: 240-248
3. Boersma, E., Mercado, N., Poldermans, D., Gardien, M., Vos, J., and Simoons, M. L.
Acute myocardial infarction
Lancet 2003; 361: 847-858
4. Bromme, H. J. and Holtz, J.
Apoptosis in the heart: when and why?
Mol.Cell Biochem. 1996; 163-164: 261-275
5. Buja, L. M. and Entman, M. L.
Modes of myocardial cell injury and cell death in ischemic heart disease
Circulation 1998; 98: 1355-1357
6. Cardone, M. H., Roy, N., Stennicke, H. R., Salvesen, G. S., Franke, T. F., Stanbridge, E., Frisch, S., and Reed, J. C.
Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation
Science 1998; 282: 1318-1321
7. Chen, Z., Fukutomi, T., Zago, A. C., Ehlers, R., Detmers, P. A., Wright, S. D., Rogers, C., and Simon, D. I.
Simvastatin reduces neointimal thickening in low-density lipoprotein receptor-deficient mice after experimental angioplasty without changing plasma lipids
Circulation 2002; 106: 20-23
8. Crisby, M.
Modulation of the inflammatory process by statins
Drugs Today (Barc.) 2003; 39: 137-143
9. Datta, S. R., Brunet, A., and Greenberg, M. E.
Cellular survival: a play in three Akts
Genes Dev. 1999; 13: 2905-2927

-
10. Di, Napoli P., Antonio, Taccardi A., Grilli, A., Spina, R., Felaco, M., Barsotti, A., and De, Caterina R.
Simvastatin reduces reperfusion injury by modulating nitric oxide synthase expression: an ex vivo study in isolated working rat hearts
Cardiovasc.Res. 2001; 51: 283-293
 11. Dumont, E. A., Hofstra, L., van Heerde, W. L., van den, Eijnde S., Doevendans, P. A., DeMuinck, E., Daemen, M. A., Smits, J. F., Frederik, P., Wellens, H. J., Daemen, M. J., and Reutelingsperger, C. P.
Cardiomyocyte death induced by myocardial ischemia and reperfusion: measurement with recombinant human annexin-V in a mouse model
Circulation 2000; 102: 1564-1568
 12. Eefting, F., Rensing, B., Wigman, J., Pannekoek, W. J., Liu, W. M., Cramer, M. J., Lips, D. J., and Doevendans, P. A.
Role of apoptosis in reperfusion injury
Cardiovasc.Res. 2004; 61: 414-426
 13. Feron, O., Dessy, C., Desager, J. P., and Balligand, J. L.
Hydroxy-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibition promotes endothelial nitric oxide synthase activation through a decrease in caveolin abundance
Circulation 2001; 103: 113-118
 14. Fliss, H.
Accelerated apoptosis in reperfused myocardium: friend of foe?
Basic Res.Cardiol. 1998; 93: 90-93
 15. Fliss, H. and Gattinger, D.
Apoptosis in ischemic and reperfused rat myocardium
Circ.Res. 1996; 79: 949-956
 16. Gersh, B. J. and Anderson, J. L.
Thrombolysis and myocardial salvage. Results of clinical trials and the animal paradigm--paradoxical or predictable?
Circulation 1993; 88: 296-306
 17. Gill, C., Mestral, R., and Samali, A.
Losing heart: the role of apoptosis in heart disease--a novel therapeutic target?
FASEB J. 2002; 16: 135-146
 18. Gottlieb, R. A., Burleson, K. O., Kloner, R. A., Babior, B. M., and Engler, R. L.
Reperfusion injury induces apoptosis in rabbit cardiomyocytes
J.Clin.Invest 1994; 94: 1621-1628
 19. Gray, D. F., Bundgaard, H., Hansen, P. S., Buhagiar, K. A., Mihailidou, A. S., Jessup, W., Kjeldsen, K., and Rasmussen, H. H.
HMG CoA reductase inhibition reduces sarcolemmal Na(+)-K(+) pump density
Cardiovasc.Res. 2000; 47: 329-335

-
20. Guijarro, C., Blanco-Colio, L. M., Massy, Z. A., O'Donnell, M. P., Kasiske, B. L., Keane, W. F., and Egido, J.
Lipophilic statins induce apoptosis of human vascular smooth muscle cells
Kidney Int.Suppl 1999; 71: S88-S91
 21. Halcox, J. P. and Deanfield, J. E.
Beyond the laboratory: clinical implications for statin pleiotropy
Circulation 2004; 109: II42-II48
 22. Haunstetter, A. and Izumo, S.
Apoptosis: basic mechanisms and implications for cardiovascular disease
Circ.Res. 1998; 82: 1111-1129
 23. Haunstetter, A. and Izumo, S.
Future perspectives and potential implications of cardiac myocyte apoptosis
Cardiovasc.Res. 2000; 45: 795-801
 24. Hengartner, M. O.
The biochemistry of apoptosis
Nature 2000; 407: 770-776
 25. Hofstra, L., Liem, I. H., Dumont, E. A., Boersma, H. H., van Heerde, W. L., Doevendans, P. A., De, Muinck E., Wellens, H. J., Kemerink, G. J., Reutelingsperger, C. P., and Heidendal, G. A.
Visualisation of cell death in vivo in patients with acute myocardial infarction
Lancet 2000; 356: 209-212
 26. Iliceto, S., Scrutinio, D., Bruzzi, P., D'Ambrosio, G., Boni, L., Di, Biase M., Biasco, G., Hugenholtz, P. G., and Rizzon, P.
Effects of L-carnitine administration on left ventricular remodeling after acute anterior myocardial infarction: the L-Carnitine Ecocardiografia Digitalizzata Infarto Miocardico (CEDIM) Trial
J.Am.Coll.Cardiol. 1995; 26: 380-387
 27. Kajstura, J., Cheng, W., Reiss, K., Clark, W. A., Sonnenblick, E. H., Krajewski, S., Reed, J. C., Olivetti, G., and Anversa, P.
Apoptotic and necrotic myocyte cell deaths are independent contributing variables of infarct size in rats
Lab Invest 1996; 74: 86-107
 28. Kang, P. M. and Izumo, S.
Apoptosis and heart failure: A critical review of the literature
Circ.Res. 2000; 86: 1107-1113
 29. Kelm, M. and Strauer, B. E.
[Acute coronary syndrome: unstable angina and myocardial infarction]
Internist (Berl) 2005; 46: 265-274

-
30. Klainguti, M., Aigner, S., Kilo, J., Eppenberger, H. M., Mandinova, A., Aebi, U., Schaub, M. C., Shaw, S. G., Luscher, T. F., and Atar, D.
Lack of nuclear apoptosis in cardiomyocytes and increased endothelin-1 levels in a rat heart model of myocardial stunning
Basic Res.Cardiol. 2000; 95: 308-315
31. Kockx, M. M. and Herman, A. G.
Apoptosis in atherosclerosis: beneficial or detrimental?
Cardiovasc.Res. 2000; 45: 736-746
32. Laufs, U. and Bohm, M.
Cardiac effects of statins-advancements and open questions
Cardiovasc.Res. 2005; 66: 427-429
33. Laufs, U., La, Fata, V., Plutzky, J., and Liao, J. K.
Upregulation of endothelial nitric oxide synthase by HMG CoA reductase inhibitors
Circulation 1998; 97: 1129-1135
34. Laufs, U. and Liao, J. K.
Post-transcriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase mRNA stability by Rho GTPase
J.Biol.Chem. 1998; 273: 24266-24271
35. Lee, K. T., Lai, W. T., Chu, C. S., Tsai, L. Y., Yen, H. W., Voon, W. C., and Sheu, S. H.
Effect of withdrawal of statin on C-reactive protein
Cardiology 2004; 102: 166-170
36. Lefer, A. M., Scalia, R., and Lefer, D. J.
Vascular effects of HMG CoA-reductase inhibitors (statins) unrelated to cholesterol lowering: new concepts for cardiovascular disease
Cardiovasc.Res. 2001; 49: 281-287
37. Löwel, H., Engel, S., Hörmann, A., Gostomzyk, J., Bolte, H. D., and Keil U.
Akuter Herzinfarkt und plötzlicher Herztod aus epidemiologischer Sicht
Intensivmed. 1999; 36: 652-661
38. Lowel, H., Meisinger, C., Heier, M., Hormann, A., Kuch, B., Gostomzyk, J., and Koenig, W.
[Sex specific trends of sudden cardiac death and acute myocardial infarction: results of the population-based KORA/MONICA-Augsburg register 1985 to 1998]
Dtsch.Med.Wochenschr. 2002; 127: 2311-2316
39. Majno, G. and Joris, I.
Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death
Am.J.Pathol. 1995; 146: 3-15
-

-
40. Maroko, P. R. and Braunwald, E.
Modification of myocardial infarction size after coronary occlusion
Ann.Intern.Med. 1973; 79: 720-733
41. Marques-Vidal, P., Ferrieres, J., Metzger, M. H., Cambou, J. P., Filipiak, B., Lowel, H., and Keil, U.
Trends in coronary heart disease morbidity and mortality and acute coronary care and case fatality from 1985-1989 in southern Germany and south-western France
Eur.Heart J. 1997; 18: 816-821
42. Martinez-Gonzalez, J., Raposo, B., Rodriguez, C., and Badimon, L.
3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibition prevents endothelial NO synthase downregulation by atherogenic levels of native LDLs: balance between transcriptional and posttranscriptional regulation
Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol. 2001; 21: 804-809
43. Melo, L. G., Pachori, A. S., Kong, D., Gnecci, M., Wang, K., Pratt, R. E., and Dzau, V. J.
Molecular and cell-based therapies for protection, rescue, and repair of ischemic myocardium: reasons for cautious optimism
Circulation 2004; 109: 2386-2393
44. Mocanu, M. M., Baxter, G. F., and Yellon, D. M.
Caspase inhibition and limitation of myocardial infarct size: protection against lethal reperfusion injury
Br.J.Pharmacol. 2000; 130: 197-200
45. Narula, J., Kharbanda, S., and Khaw, B. A.
Apoptosis and the heart
Chest 1997; 112: 1358-1362
46. Nicholson, D. W.
From bench to clinic with apoptosis-based therapeutic agents
Nature 2000; 407: 810-816
47. Opie, L. H.
Glucose and the metabolism of ischaemic myocardium
Lancet 1995; 345: 1520-1521
48. Pollard, T. D. and Earnshaw, W. C.
Cell Cycle
In: Pollard,T.D., Earnshaw,W.C: Cell Biology, 1.Aufl., Elsevier, Philadelphia 2004: 767-782
49. Roche Applied Science
Apoptosis, Cell Death and Cell Proliferation
Apoptosis, Cell Death, and Cell Proliferation Manual 2005; 3. Aufl.: 1-174
-

-
50. Saraste, A. and Pulkki, K.
Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis
Cardiovasc.Res. 2000; 45: 528-537
51. Saraste, A., Pulkki, K., Kallajoki, M., Henriksen, K., Parvinen, M., and Voipio-Pulkki, L. M.
Apoptosis in human acute myocardial infarction
Circulation 1997; 95: 320-323
52. Scarabelli, T., Stephanou, A., Rayment, N., Pasini, E., Comini, L., Curello, S., Ferrari, R., Knight, R., and Latchman, D.
Apoptosis of endothelial cells precedes myocyte cell apoptosis in ischemia/reperfusion injury
Circulation 2001; 104: 253-256
53. Scarabelli, T. M., Knight, R. A., Rayment, N. B., Cooper, T. J., Stephanou, A., Brar, B. K., Lawrence, K. M., Santilli, G., Latchman, D. S., Baxter, G. F., and Yellon, D. M.
Quantitative assessment of cardiac myocyte apoptosis in tissue sections using the fluorescence-based tunel technique enhanced with counterstains
J.Immunol.Methods 1999; 228: 23-28
54. Schaefer, E. J., McNamara, J. R., Tayler, T., Daly, J. A., Gleason, J. A., Seman, L. J., Ferrari, A., and Rubenstein, J. J.
Effects of atorvastatin on fasting and postprandial lipoprotein subclasses in coronary heart disease patients versus control subjects
Am.J.Cardiol. 2002; 90: 689-696
55. Schmailzl, K. G.
Ischämische Herzkrankheit
In: Dietel, M., Suttrop, N., Zeitz, M. (Hrsg.): Harrisons Innere Medizin, 16. Aufl., McGraw-Hill, ABW Wissenschaftsverlag, Berlin 2005: 1537-1547
56. Schulz, R., Kelm, M., and Heusch, G.
Nitric oxide in myocardial ischemia/reperfusion injury
Cardiovasc.Res. 2004; 61: 402-413
57. van den Hoff, M. J., van den Eijnde, S. M., Viragh, S., and Moorman, A. F.
Programmed cell death in the developing heart
Cardiovasc.Res. 2000; 45: 603-620
58. van, Empel, V, Bertrand, A. T., Hofstra, L., Crijns, H. J., Doevendans, P. A., and De Windt, L. J.
Myocyte apoptosis in heart failure
Cardiovasc.Res. 2005; 67: 21-29
59. Wainwright, C. L.
Statins--is there no end to their usefulness?
Cardiovasc.Res. 2005; 65: 296-298
-

-
60. Wolfrum, S., Dendorfer, A., Schutt, M., Weidtmann, B., Heep, A., Tempel, K., Klein, H. H., Dominiak, P., and Richardt, G.
Simvastatin acutely reduces myocardial reperfusion injury in vivo by activating the phosphatidylinositide 3-kinase/Akt pathway
J.Cardiovasc.Pharmacol. 2004; 44: 348-355
61. Wolfrum, S., Grimm, M., Heidbreder, M., Dendorfer, A., Katus, H. A., Liao, J. K., and Richardt, G.
Acute reduction of myocardial infarct size by a hydroxymethyl glutaryl coenzyme A reductase inhibitor is mediated by endothelial nitric oxide synthase
J.Cardiovasc.Pharmacol. 2003; 41: 474-480
62. Yaoita, H., Ogawa, K., Maehara, K., and Maruyama, Y.
Apoptosis in relevant clinical situations: contribution of apoptosis in myocardial infarction
Cardiovasc.Res. 2000; 45: 630-641
63. Yin, X. M., Oltvai, Z. N., and Korsmeyer, S. J.
BH1 and BH2 domains of Bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with Bax
Nature 1994; 369: 321-323
64. Yusuf, S., Wittes, J., and Friedman, L.
Overview of results of randomized clinical trials in heart disease. I. Treatments following myocardial infarction
JAMA 1988; 260: 2088-2093
65. Zhao, Z. Q., Morris, C. D., Budde, J. M., Wang, N. P., Muraki, S., Sun, H. Y., and Guyton, R. A.
Inhibition of myocardial apoptosis reduces infarct size and improves regional contractile dysfunction during reperfusion
Cardiovasc.Res. 2003; 59: 132-142
66. Zhao, Z. Q., Nakamura, M., Wang, N. P., Wilcox, J. N., Shearer, S., Ronson, R. S., Guyton, R. A., and Vinten-Johansen, J.
Reperfusion induces myocardial apoptotic cell death
Cardiovasc.Res. 2000; 45: 651-660

8 ANHANG

8.1 Genehmigung zur Durchführung von Versuchen an Wirbeltieren

Der Antrag zur Durchführung von Versuchen an Wirbeltieren wurde vom Leiter des Versuchsvorhabens Herrn Prof. Dr. med. Gert Richardt und stellvertretend Herrn Dr. med. Sebastian Wolfrum unter dem Titel „CSE-Hemmer im akuten Myokardinfarkt II: Simvastatin in der Reperfusion“ gestellt. Das Ministerium für Umwelt, Natur und Forsten des Landes Schleswig-Holstein genehmigte diesen Antrag am 20. Februar 2002 (Aktenzeichen 1/q/02).

9 DANKSAGUNG

Mein Dank gilt Herrn Professor Dr. Richardt für die Überlassung des Themas und die geduldige Betreuung.

Ebenso möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Katecholaminlabors der Medizinischen Klinik II der Universität Lübeck für ihre Hilfe und Unterstützung bedanken. Mein besonderer Dank gilt Frau Cindy Krause und Frau Ines Stölting, die mir während meiner Zeit im Labor immer mit Rat und Tat zur Seite standen, jederzeit meine unzähligen Fragen beantworteten, und die nicht unwesentlich dazu beigetragen haben, dass ich sehr gerne dort gearbeitet habe.

Ich danke Frau Isabel Weber, die mich in die Methodik eingearbeitet hat und mir außerdem erfolgreich vermittelt hat, wie man den Problemen scheinbar unergründlicher Versuchsergebnisse auf den Grund geht.

Bedanken möchte ich mich auch beim Institut für Pharmakologie und Toxikologie und dem Institut für Pathologie für die unkomplizierte Genehmigung zur Benutzung der UV-Kamera bzw. für die Paraffineinbettung meiner Proben und die Verwendung des Mikrotoms.

Mein Dank gilt auch Frau Dr. Bettina Schwarz und Herrn Dr. Sebastian Wolfrum für Ihre Betreuung bei der Durchführung der Versuche und der Erstellung des Manuskripts.

10 LEBENS LAUF

ANGELIKA IRMGARD HEEP



Persönliche Daten

Geburtsdatum	16. Juli 1979
Geburtsort	Frankfurt am Main
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch

Schule

1985-1989	Burg-Schule, Eppstein
1989-1995	St. Angela-Schule, Königstein
1995-1996	Nettleton High School, Mississippi, USA
1996-1998	Bischof-Neumann-Schule, Königstein, Abitur

Hochschulbildung

1998-2000	Vorklinischer Studienabschnitt, Medizinische Universität zu Lübeck
2000	Physikum
2000-2004	1. u. 2. klinischer Studienabschnitt, Medizinische Universität zu Lübeck
2001	1. Staatsexamen
2002	1. Teil amerikanisches Staatsexamen, USMLE Step 1
2004	2. Staatsexamen
2004-2005	Praktisches Jahr
2005	3. Staatsexamen

Praktisches Jahr

04/2004-08/2004	Chirurgie Regionalspital Langnau, Lehrkrankenhaus der Universität Bern, Schweiz
08/2004-11/2004	Pädiatrie Sana Klinik Ostholstein, Eutin
11/2004-03/2005	Innere Medizin Universitätsklinikum Lübeck, Hämatologie Memorial University of Newfoundland, St. John's, Canada, general internal medicine

Promotion

2001-2004	Überlassung des Themas „Einfluss von Simvastatin auf die Apoptose nach myokardialer Ischämie“ durch Prof. Dr. Gert Richardt und Durchführung der Versuche
2004-2005	Anfertigung der Promotionsschrift

Berufliche Weiterbildung

seit November 2005	Assistenzärztin an der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin, Städtisches Klinikum Karlsruhe, Direktor: Prof. Dr. J. Kühr
--------------------	---

Sonstiges

Sprachen	Englisch, fließend in Wort und Schrift Spanisch, Grundkenntnisse Französisch, Grundkenntnisse
Persönliche Interessen	Laufen, Radfahren, Segeln, Fotografie