

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I - Grosshadern der

Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. G. Steinbeck

**Reduktion des Reperfusionsschadens am Schweineherz durch
retrograde koronar-venöse Transfektion mit VEGF**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Robert Vachenauer

aus

Ebersberg

2009

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	PD Dr. med. Christian Kupatt
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. med. Marc Dellian Prof. Dr. med. Bernd Engelmann
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. h.c. Maximilian Reiser, FACR, FRCR
Tag der mündlichen Prüfung:	05.03.2009

1	<u>EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG</u>	1
1.1	KLINISCHE RELEVANZ DES REPERFUSIONSSCHADENS	1
1.2	MECHANISMEN DES REPERFUSIONSSCHADENS	2
1.2.1	LEUKOZYTENINFILTRATION	2
1.2.2	ENDOTHELZELLAKTIVIERUNG	4
1.2.3	NF κ B-AKTIVIERUNG	6
1.2.4	VEGF INDUZIERT E NOS -PHOSPHORYLIERUNG	7
1.3	FRAGESTELLUNG	9
2	<u>MATERIAL UND METHODEN</u>	11
2.1	HÄMODYNAMIK	11
2.1.1	VERSUCHSTIER: DEUTSCHES LANDSCHWEIN	11
2.1.2	PRÄPARATION DER VERSUCHSTIERE	11
2.1.3	DRUCKREGULIERTE RETROINFUSION	12
2.1.4	MESSUNG HÄMODYNAMISCHER PARAMETER	14
2.1.4.1	Arterielle Druckmessung	14
2.1.4.2	Linksventrikuläre Druckmessung	15
2.1.4.3	LVEDP	15
2.1.4.4	dLVP/dt	15
2.1.4.5	Sonomikrometrie	16
2.2	MOLEKULARBIOLOGIE	17
2.2.1	LIPOSOMENAPPLIKATION VOR UND NACH REPERFUSION	17
2.2.2	INFARKTFÄRBUNG	18
2.2.3	INFARKTGRÖßENBESTIMMUNG	19
2.2.4	NACHWEIS DER e NOS / e NOS P-EXPRESSION UND VEGF	19
2.2.5	AKTIVITÄTSBESTIMMUNG VON NF κ B	23
2.2.6	GRANULOZYTENNACHWEIS	26
2.3	STATISTIK	28
3	<u>ERGEBNISSE</u>	28
3.1	eNOS-TRANSFEKTION DER REGION OF INTEREST	28

3.2 VEGF-TRANSFEKTION UND ENOS-PHOSPHORYLIERUNG	29
3.3 iNOS-EXPRESSION DER REGION OF INTEREST	30
3.4 VEGF-/ENOS D-ABHÄNGIGE NFκB-AKTIVIERUNG	32
3.5 MYELOPEROXIDASEAKTIVITÄT DER EINZELNEN HERZAREALE	33
3.6 INFARKTGRÖÖE	34
3.7 LOKALE MYOKARDFUNKTION	36
3.8 GLOBALE MYOKARDFUNKTION	38
<u>4 DISKUSSION</u>	<u>41</u>
<u>5 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK</u>	<u>51</u>
<u>6 ABKÜRZUNGEN</u>	<u>52</u>
<u>7 LITERATURNACHWEIS</u>	<u>56</u>
<u>8 LEBENS LAUF</u>	<u>64</u>
<u>9 DANKSAGUNG</u>	<u>67</u>

1 Einleitung und Fragestellung

1.1 *Klinische Relevanz des Reperfusionsschadens*

Haupttodesursache in den westlichen Industrieländern sind Erkrankungen des kardiovaskulären Systems. So lagen in der Bundesrepublik Deutschland im Jahr 2007 43.4 % aller Todesfälle Krankheiten des Herz-/Kreislaufsystems zugrunde. In diesem Jahr starben 61040 Deutsche an akutem Herzinfarkt (Statistisches Bundesamt Stand 2008). In den letzten vier Jahrzehnten ist jedoch die Sterblichkeit von 40 % auf 10 % deutlich zurück gegangen. Eine entscheidende Rolle spielt hierbei die zunehmend bessere intensivmedizinische Überwachung der Patienten, die verbesserte Beherrschung rhythmogener Komplikationen sowie neue pharmakologische Therapieprinzipien. Hierzu gehört beispielsweise die Nachlastsenkung zur Verringerung des kardialen Sauerstoffverbrauchs oder die medikamentöse Thromboseprophylaxe.

Der plötzliche thrombotische Verschluss der Koronararterien stellt den Hauptgrund für den akuten Myokardinfarkt (AMI) dar. Daraus leiteten sich bedeutende Neuerungen in der Behandlung des Herzinfarktes ab: die Thrombolyse, die Bypassoperation oder die PTCA/Stent, zur frühzeitigen Vermeidung des Übergangs von ischämischen zu nekrotisierendem Myokard (58). Heute ist die schnellst mögliche Revaskularisierung eines ischämischen Areals durch PTCA/Stent die Standardtherapie in der Behandlung des AMI. Die Revaskularisierung einer verschlossenen Koronararterie innerhalb der ersten sechs Stunden verringert die Mortalität des akuten Myokardinfarktes um 30 %, eine Eröffnung des Gefäßes innerhalb weiterer sechs Stunden nur mehr um 15 %. Daraus ergibt sich für thrombolytisch therapierte Patienten ein Mortalitätsrate von 2- 10 %, gegenüber 15- 30 % bei nicht lysierten Patienten.

Eine möglichst frühe Reperfusion dient dem Schutz des reversibel geschädigten und dem Infarkt angrenzenden Herzgewebes der *Area at risk*. Ziel dabei ist eine größtmögliche Reduktion der Infarktausdehnung. Das bedeutet die Ausbreitung des Infarktes über die *Area at risk* hinweg zu verhindern, um so die linksventrikuläre Funktion weitestgehend aufrecht zu erhalten (10;30;58). Blicke zum Beispiel die LAD verschlossen, zeigte sich im Tierversuch eine 49 %ige Asynergie des Herzmuskels sowie eine Einschränkung der Ejektionsfraktion auf nur mehr 40 % (40). Neben der Aufrechterhaltung der Ventrikelfunktion kann eine Reperfusionbehandlung in den

ersten Stunden nach Ischämie außerdem die Gefahr der Bildung eines Herzwandaneurysmas bedeutend verringern (11).

1.2 Mechanismen des Reperfusionsschadens

1.2.1 Leukozyteninfiltration

Seit Beginn des Therapieansatzes der Revaskularisierung bei koronaren Verschlüssen, wurde experimentell beobachtet, dass ein Teil des Gewebeschadens möglicherweise auf die Reperfusion selbst zurückzuführen ist (29;63;74;76;79). Neben Arrhythmien kann es so auch zu mikrovaskulären Blutflussstörungen kommen. Gründe hierfür sind im reperfundierten Areal entstehende Ionenimbancen (z.B. eine Calcium-Überladung) oder Leukozyten, die das umgebende Herzgewebe infiltrieren (53). Letztere setzen lysosomale, proteolytische Enzyme (v.a. Elastase, b-Glukosaminidase, b-Glucuronidase, Myeloperoxidase) und Sauerstoffradikale frei, die den ischämischen Gewebeschaden vergrößern (7;22;23;27;30;57;73). Sie entfalten ihre toxische Wirkung durch Schädigung der Proteine, Lipide und Nukleinsäuren von Endothelzellen und Myozyten, wodurch zelluläre Dysfunktion sowie Ödeme und letztendlich Zelltod induziert werden (10;121).

Pathophysiologisch aktivierte Leukozyten sind dabei eine potentiell bedeutende Quelle für Sauerstoffradikale, weshalb seit den siebziger Jahren die Bedeutung entzündlicher Vorgänge beim Gewebeschaden nach Myokardinfarkt intensiver untersucht wird (25;85;99).

Demzufolge beobachteten verschiedene Arbeitsgruppen den Einfluss der Monozyten und Lymphozyten, besonders aber der polymorphkernigen Granulozyten auf von Myokardinfarkt betroffenes Gewebe (23;76;97). Es zeigte sich eine Akkumulation der Granulozyten vermehrt in den ersten 12 bis 24 Stunden nach Infarkt; unter Reperfluationsbedingungen bereits früher (7;22;33). Die Rekrutierung und Migration ins umliegende Gewebe gliedern sich im Wesentlichen in drei Schritte (76):

Den Beginn dieses Vorgangs bildet das Rollen der neutrophilen Granulozyten entlang des Koronarendothels. Verantwortlich hierfür werden vor allem Adhäsionsmoleküle aus der Familie der Selektine gemacht (117). Auf Seite des Endothels sind hier insbesondere die P- und E-Selektine zu nennen, die durch Interleukin-1 β (IL-1 β) und Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α) aktiviert und vermehrt

exprimiert werden. Selektine, wie sie auf der Oberfläche von Leukozyten und Monozyten anzutreffen sind, lassen sich auf Exposition verschiedener chemotaktischer Stoffe hin in ihrer Bindungsaffinität modulieren (76). Es wird davon ausgegangen, dass die Selektine - vor allem L-Selektin - das Rollen der neutrophilen Granulozyten entlang des Endothels verlängern und so eine intensivere Interaktion zwischen Blut- und Endothelzellen ermöglichen. Diese Interaktion zwischen neutrophilen Granulozyten und Gefäßwand trägt zur Aktivierung der Granulozyten bei und ermöglicht den Beginn des zweiten Schrittes: es kommt zur festen Adhäsion der Leukozyten am Endothel („sticking“).

Dabei beteiligt sind insbesondere die $\beta 2$ -Integrine CD11_{a-c}/CD18 auf Leukozyten-Seite sowie das Immunglobulin ICAM-1 auf dem Endothel. Es bildet sich eine feste Bindung zwischen Leukozyten und Endothel aus. In Versuchen hierzu konnte unter Zugabe eines gegen CD11/CD18 gerichteten Antikörpers nicht das Rollen der Granulozyten, sehr wohl aber deren feste Adhäsion am Endothel verhindert werden (76). Ähnliches gilt für das ICAM-1 (intercellular adhesion molecule 1, exprimiert auf Endothelzellen und aktivierten Lymphozyten), durch dessen Blockieren mittels Antikörper die Anbindung der Granulozyten an das Endothel deutlich verringert werden konnte (75).

Dem Anhaften der Leukozyten folgt der dritte Schritt: die Transmigration der Zellen durch die Gefäßwand ins umliegende Myokard.

Bereits nach kurzer Zeit in der Reperfusionphase kommt es zu einer teilweise CD18-abhängigen, subendokardialen Akkumulation neutrophiler Granulozyten im ischämischen Areal (22;26), während Monozyten und Makrophagen erst zwei bis drei Tage nach Ischämie auftreten (7). Um nun den Reperfusionsschaden einzuschränken, wurden unterschiedliche Ansätze gewählt, wie z.B. die Applikation von Radikalfängern, um einen wichtigen Stimulus für inflammatorische Prozesse zu unterdrücken (25). Ebenso wie die Blockierung endothelialer Adhäsionsmoleküle (76;110) führte auch die Inhibierung der Komplementkaskade als chemotaktischer Reiz für Entzündungszellen und die Reduzierung zirkulierender neutrophiler Granulozyten (32;76;98;99;120) zur eingeschränkten Rekrutierung von Leukozyten aus dem Blut.

Mit der Unterdrückung nur einzelner Schritte in der ablaufenden Entzündungskaskade konnte somit eine Verbesserung der Ventrikelfunktion erzielt werden. Wurde die postischämische Entzündungsantwort hingegen vollständig

unterrückt, kam es zur Zunahme der Schädigung des Herzgewebes (25). Die entzündlichen Vorgänge nach Reperfusion mussten somit zumindest teilweise eine wichtige Rolle in der Heilung des Myokards spielen (32;58).

Als kardioprotektiv erwies sich, wie bereits angesprochen, die Gabe von Antikörpern gegen leukozytäres CD 18, gegen ICAM-1 oder gegen L-Selektin. Auf diese Weise konnte die Adhäsion eines Großteils der Entzündungszellen an das Koronarendothel unterbunden und die Aktivierung der PMNs verhindert werden, was kardioprotektiven Charakter zeigte (76).

Leukozyten, die postischämisch im Myokard rekrutiert werden, sind eine bedeutende Quelle für Sauerstoffradikale (reaktive Sauerstoffzwischenprodukte = ROI). Andere Zelltypen, die in der postischämischen Reperfusion ROI generieren, sind Endothelzellen und Kardiomyozyten. ROI sind in vielen ihrer toxischen Wirkungen an der intrazellulären Signalübertragung beteiligt (70;105), wie bei der Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF κ B und AP-1. Zu den ROIs gehören Stickstoffmonoxidradikale (NO \cdot), Superoxid-Anionen (O $_2^{\cdot-}$), Hydrogenradikale (OH $^{\cdot}$) und deren Nebenprodukte wie Wasserstoffperoxid (H $_2$ O $_2$). Das Auftreten von ROIs in höheren Konzentrationen wird, wie eingangs erwähnt, für oxidative Schäden an Makromolekülen verantwortlich gemacht. Das Superoxid O $_2^{\cdot-}$ beispielsweise reagiert weiter zu H $_2$ O $_2$ und OH $^{\cdot}$, von denen letztgenanntes eine hohe Toxizität für biologische Gewebe birgt. Es kann zu Oxidation von Aminosäuren, Lipiden und Strukturproteinen, oder zur Bildung von Protein-Protein Cross-Links, DNA-Schäden, sowie -Brüchen kommen (53;74;100;102;119). Diesem oxidativen Stress begegnet die Zelle mit der Anpassung ihrer Antioxidantien-Konzentration, der Expression bestimmter Proteine und deren Modifikation (70).

1.2.2 Endothelzellaktivierung

Das Endothel ist durch seine strategische Lage die erste Zell-Schicht, die mit dem wiedereinsetzenden Blutstrom in der Reperfusion in Kontakt kommt. Dabei wird das Endothel mit einer abrupten Änderung der Sauerstoffspannung, des pH sowie der Ionenkonzentrationen für Na $^+$, K $^+$, Ca $^{++}$ konfrontiert. Dabei wird eine für die Reperfusion charakteristische Endothelaktivierung initiiert.

Grundsätzlich kann das Endothel auf zweierlei Arten aktiviert werden: zum einen werden Endothelzellen innerhalb von Sekunden bis Minuten durch Stimuli wie ROI oder aktivierte Komplemente zu posttranslationalen Modifikationen gespeichert

Proteine veranlasst (akute endotheliale Aktivierung). Diese ermöglichen folgend die raschen Interaktionen zwischen Leukozyten und Gefäßzellen. Zum anderen reagieren Endothelzellen auf z.B. ROI, Tumor-Nekrose-Faktor α , Interleukin-1 und Interleukin-6 oder adhären Leukozyten (9;69) mit ihrer Fülle pro-inflammatorischer Mediatoren dadurch, daß sie die Transkription inflammatorischer Proteine aktivieren. Diese Zellantwort benötigt mehrere Stunden, um aktive Proteine bereitzustellen (subakute endotheliale Aktivierung).

Folge der subakuten endothelialen Aktivierung ist unter anderem die Freisetzung von Interleukin-8, welches einen wichtigen Aktivator für neutrophile Zellen darstellt (10). Es bewirkt zunächst eine stärkere Anhaftung der Neutrophilen (54), folgend die Regulation deren transendothelialen Migration (44) und schliesslich die Freisetzung ihrer toxischen Produkte.

Die feste Anhaftung der Neutrophilen am Endothel wird eingeleitet durch das Rollen der Blutzellen entlang der Gefäßwand. Dieser Vorgang wird ermöglicht durch die Expression von Selektinen. Auf der Oberfläche der Endothelzellen sind das E-Selektin und das P-Selektin exprimiert, auf den Neutrophilen deren Liganden ESL-1 und PSGL-1 sowie das L-Selektin (76). Die Oberflächen-Expression der P-Selektine findet innerhalb von Sekunden nach Aktivierung statt, da die Moleküle in den Weibel-Palade-Körpern der Endothelzellen gespeichert vorliegen (91). E-Selektin hingegen muss vor seiner Expression erst de novo synthetisiert werden (10). Daher wird angenommen, dass vor allem P-Selektine bei Hypoxie/Reoxygenierung innerhalb von 5 Minuten auf der endothelialen Oberfläche exprimiert werden und somit für den ersten Schritt der Rekrutierung der Neutrophilen verantwortlich sind. Triggernder Mechanismus für die Expression von P-Selektinen sind freie Radikale in der Umgebung der Zelle (71), abgegeben von anliegenden aktivierten Neutrophilen.

Die nachfolgende feste Anhaftung der Granulozyten am Endothel wird ermöglicht durch die Bindung von β 2-Integrinen auf Seite der Leukozyten und Immunoglobulinen - wie ICAM-1/2 (intracellular adhesion molecule 1/2) auf der Oberfläche aktivierter Endothelzellen (6;112). Eine Transmigration der Leukozyten ins Gewebe wird so überhaupt erst ermöglicht.

Eine wichtige Rolle bei der Expression aller genannten Rezeptoren und Oberflächenmoleküle spielt vor allem der Transkriptionsfaktor NF κ B, dessen Konsensussequenz einen Teil der Promoterregionen von L-, E-Selektin, ICAM,

Tissue-Factor, IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, TNF- α und Interferon γ bildet (59;62;116;118;127).

So liegt es nahe, durch Inhibierung der NF κ B-Aktivierung die Freisetzung von Zytokinen oder die Expression von Adhäsionsmolekülen zu unterdrücken. Die Leukozyten-Rekrutierung sowie -Aggregation und somit der hauptsächlich durch Neutrophile verursachte Reperfusionsschaden könnte auf diese Weise eingeschränkt werden.

1.2.3 NF κ B-Aktivierung

NF κ B ist ein aus mehreren Untereinheiten bestehender Transkriptionsfaktor. Die DNA-bindenden Untereinheiten umfassen das p50, p52, p65 sowie c-Rel und Rel-B. Meist setzt sich NF κ B aus p50 und p65 zusammen (Rel-A). Reguliert wird die Aktivität des NF κ B durch die Interaktion mit einem speziellen inhibitorischen Protein, dem I κ B. Von diesem Inhibitor-Komplex sind 6 Arten bekannt, I κ B- α , I κ B- β , I κ B- γ , Bcl-3, p100 und p105. I κ B hindert NF κ B an der Migration vom Zytosol in den Zellkern und somit an der DNA-Bindung. Es hat sich gezeigt, dass es nach Phosphorylierung des I κ B- α am Serin-Rest der Positionen 32 und 36 zu einem induzierten Abbau des I κ B- α kommt und so durch Lösung des Inhibitor-Komplex von der p65-Untereinheit NF κ B freigegeben wird. Verantwortlich für diese Phosphorylierung ist die I κ B Kinase (IKK), bestehend aus den katalytischen Untereinheiten IKK- α , IKK- β - beide phosphorylieren I κ B α an Serin 32/34 - und der regulatorischen Untereinheit IKK- γ (61;70). Es ist anzunehmen, jedoch noch nicht definitiv geklärt, dass die IKK von der NF κ B interacting Kinase (NIK) oder in anderem Falle von der MEKK (MAP3-Kinase) durch Phosphorylierung kontrolliert wird. Kommt es also durch Lösung des I κ B vom NF κ B zu einer Aktivierung des NF κ B können die Untereinheiten p50 und p65 in den Zellkern translozieren. Dort erfolgt die DNA-Bindung an die Konsensussequenz 5'-AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG C-3' (65), entsprechend den Promotorregionen für E-Selektin, VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule 1) und ICAM-1 (15;16;118) und so die Transkription der mRNA der inflammatorisch oder immunologisch aktiven Proteine. Die membranständigen Proteine, E-Selektin und ICAM-1, sind insbesondere für die postischämische Leukozytenadhäsion, sowie die transendotheliale Migration verantwortlich und am inflammatorischen

Reperfusionsschaden beteiligt (25;32;46). Stimuli für die Aktivierung können inflammatorische Zytokine, wie $\text{TNF}\alpha$ - das als Antwort auf einen durch C5-Komplement-Aktivierung ausgelösten Reiz aus gewebständigen Mastzellen freigesetzt wird - oder IL-1 sein, aber auch Lipopolysaccharide, Virusarten, UV- oder γ -Strahlung. Die Untersuchungen von Roederer et al. 1990 sowie von Staal et al. legten die Vermutung nahe, dass $\text{NF}\kappa\text{B}$ auch durch oxidativen Stress aktiviert werden kann. Sie zeigten, dass ein von $\text{NF}\kappa\text{B}$ abhängiger Schritt in der Aktivierung des HIV-1 durch N-Acetyl-L-Cystein (NAC) - einem Antioxidanz - verhindert werden kann. Spätere Studien mit Erhöhung der intrazellulären Konzentration von ROIs, bestätigten die Vermutung der Aktivierbarkeit des $\text{NF}\kappa\text{B}$ durch oxidativen Stress (81;83;105), wie er nach Reperfusion ischämischen Gewebes auftritt (23;89). Während ein anderer Transkriptionsfaktor, AP-1 (Aktivator Protein-1), hauptsächlich in der hypoxischen Phase für die Hochregulation der ICAM-1-Expression verantwortlich ist, kommt $\text{NF}\kappa\text{B}$ gleiche Bedeutung für die Reperusionsphase zu (64;101).

1.2.4 VEGF induzierte eNOS-Phosphorylierung

Der Wachstumsfaktor VEGF (vascular endothelial growth factor) wird von einem aus 7 Exons bestehenden und auf Chromosom 6 lokalisierten Gen kodiert. Es gibt vier Splicingformen des VEGF-Gens: die wichtigsten davon sind VEGF_{121} und VEGF_{165} (bestehend aus 121 und 165 Aminosäuren), neben VEGF_{187} und VEGF_{207} (43;126). VEGF entfaltet seine Wirkung an Tyrosin-Kinase-Rezeptoren (95;104). Einsatz bei der Therapie koronararterieller Erkrankungen fand es, wie auch FGF-2 oder FGF-4, bereits in klinischen Studien entweder als rekombinantes Protein (37;42;103;109) oder als durch Vektor übertragene cDNA (41). Um eine möglichst lokale Applikation des VEGF-Genoms zu erreichen, wurde neben der intravaskulären auch die direkte intramyokardiale Injektion klinisch erprobt. Hierbei diente ein replikationsdefizientes und rekombinantes Adenovirus als Vektor zur Transfektion des Peri-Infarkt-Gewebes. Die Injektion erfolgte in reversibel geschädigtes Myokard. Auf diese Weise erreichte man eine höchst lokalisierte Expression des VEGF-Proteins für ein bis zwei Wochen. Allerdings ist in präklinischen und klinischen Studien nicht erwiesen, dass die intramyokardiale Injektion von VEGF zur anhaltenden Verbesserung der Myokardperfusion bei kritischer Minderdurchblutung beitragen kann (124).

Wie sich in verschiedenen anderen Versuchen herausstellte, ist VEGF bei der Therapie koronarer Herzkrankheiten nicht nur wegen seiner angiogenetischen Eigenschaften einsetzbar. Da dieser Wachstumsfaktor die Bildung von NO fördern kann (104;126) vermindert er die Interaktion zwischen Leukozyten und Endothelzellen im infarzierten Areal (104).

VEGF setzt seine Wirkung durch Stimulation der beiden Tyrosin-Kinase-Rezeptoren Flt-1 und besonders Flk-1/KDR frei; beide Rezeptoren werden auf der Oberfläche der Endothelzellen exprimiert (20;84;115). Dabei findet eine unmittelbare, vom intrazellulären Kalziumspiegel abhängige, sowie eine verzögerte NO-Freisetzung statt. VEGF führt über Aktivierung der PLC- γ (Phospholipase C- γ) zur DAG (Diacylglycerol)-Synthese und IP₃ (Inositoltriphosphat)-Produktion, welche die Freisetzung des Kalziums aus dem endoplasmatischen Retikulum fördert und so den intrazellulären Spiegel des Kalziums ansteigen lässt (35;115). Die eNOS ist in Ruhe an Caveolin gebunden, das eine Aktivierung der Synthese verhindert. Steigt nun der intrazelluläre Kalziumspiegel, löst der entstehende Ca²⁺/Calmodulin (CaM)-Komplex die inhibierende Bindung zwischen eNOS und Caveolin: es kommt zu einer eNOS/CaM-Komplex-Bildung, welche die Enzymaktivierung erlaubt (12;82;104). Die Kalzium abhängige Aktivierung der NO-Synthase dauert mit etwa 5 Minuten nur kurz an.

Bei der verzögerten eNOS-Aktivierung kommen zwei unterschiedliche Signalketten zum Tragen: einerseits folgt der DAG-Bildung durch PLC eine PKC (Protein-Kinase-C)-Aktivierung, die als Kalzium abhängiges Enzym die eNOS aktiviert (35). Dies geschieht durch eine PKC-abhängige Phosphorylierung der eNOS an Ser¹¹⁷⁷. Die zweite Signalkette der verzögerten eNOS-Aktivierung wird von der membranständigen Kinase PI3K (Phosphatidylinositol-3-Kinase) vermittelt (12). Diese führt über eine Aktivierung zu einer Akt (= Proteinkinase B)-Phosphorylierung an Thr³⁰⁸ und Ser⁴⁷³ (36) und diese schlussendlich unter Hsp 90 (Hitze-Schock-Protein 90)-Vermittlung zur eNOS-Phosphorylierung an Ser¹¹⁷⁷ (20;21;34) (Abb.1). Neben der verbesserten Endothelfunktion und einem Schutz der Kardiomyozyten durch Stickstoffmonoxid (24;68) ist die Konsequenz der eNOS-Aktivierung das Abschwächen des hauptsächlich durch Leukozyten verursachten Reperfusionsschadens. Ursächlich hierfür ist die Hemmung der Expression von inflammatorischen Adhäsionsmolekülen auf der Oberfläche der Gefäßendothelzellen (18;111), die eine Anhaftung und somit Aktivierung von

Leukozyten vermitteln. Der Mechanismus dieser Inhibition scheint auf einem inhibitorischen Effekt des NO auf die NF κ B-Aktivierung zu beruhen (31;64). Einige Studien haben gezeigt, dass freie Sauerstoffradikale die Proteinkinase C stimulieren und NF κ B aktivieren (28;49). NO-Donoren können diesen Signalweg unterbrechen (64), indem das NO als Antioxidanz die freien Sauerstoffradikale abfängt (73;90;113). Auf diese Weise kommt es zur Induktion, Stabilisation oder zumindest vermindertem Abbau des NF κ B-Inhibitors I κ B α (31;90;111).

Die Bedeutung von VEGF an der Aktivierung der NOS zeigt sich nach systemischer Gabe von L-NAME (= N-Nitro-L-Arginin-Methyl-Ester), einem Inhibitor der NOS: die Synthese von NO wird trotz Applikation von VEGF um 80% vermindert, womit der Wachstumsfaktor seine antiinflammatorische Wirkung fast gänzlich verliert (103).

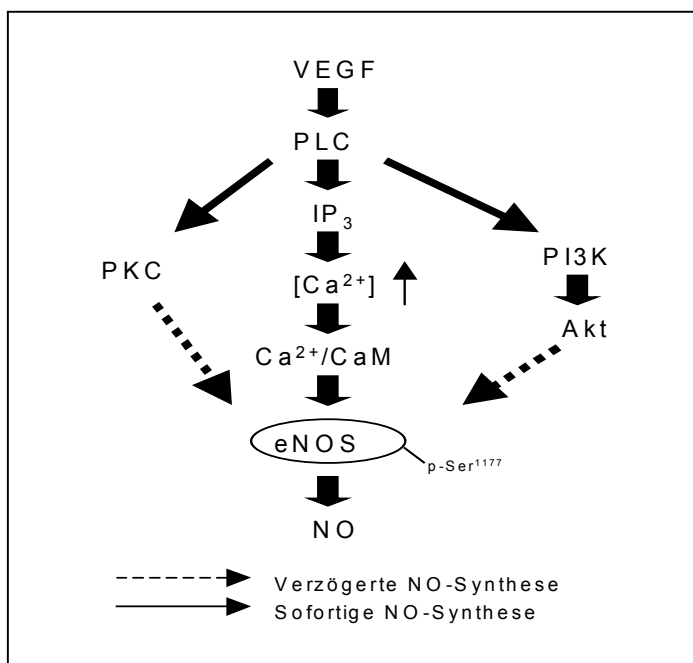


Abbildung 1

Schematische Darstellung der eNOS-Phosphorylierung

1.3 Fragestellung

Aufgrund der in unserem Labor bereits in früheren Studien untersuchten Rolle der postischämischen Inflammation für den Ischämie-Reperfusionsschaden sowie der oben skizzierten antagonistischen Wirkung von VEGF und eNOS auf diese inflammatorische Reaktion untersuchten wir in der vorliegenden Studie die Hypothese, dass VEGF vermittelt über eNOS Aktivierung den Ischämie-Reperfusionsschaden in vivo reduziert. Als Modell wurde ein präklinisches

Großtiermodell (Schwein) gewählt, das die regionale Transfektion des Ischämiegebiets mit cDNA für VEGF oder eNOS erlaubte. Das Ausmaß des Ischämie-Reperfusionsschadens wurde hämodynamisch (durch Messung von LV-Drücken), sonomikrometrisch (durch Ermittlung der regionalen Myokardfunktion), histochemisch (durch Analyse der Infarktgröße, der postischämischen Inflammation) und molekularbiologisch (durch Untersuchung der NF κ B Aktivität) bestimmt (s.u. Material und Methoden).

2 Material und Methoden

2.1 Hämodynamik

2.1.1 Versuchstier: deutsches Landschwein

Die Haltung der Versuchstiere, Gattung Deutsches Landschwein, erfolgte nach den Richtlinien des Deutschen Tierschutzgesetzes. Die Studie wurde von der Regierung Oberbayern (AZ 211-2531-/01) nach § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes von 1998 genehmigt und mit Zustimmung der Ethikkommission der Ludwig-Maximilians-Universität durchgeführt. Die Studie umfasst fünf Gruppen mit je $n = 8$; das Gewicht der Tiere betrug 27.6 ± 3.6 kg. Die Versuchsdurchführung sowie Haltung der Versuchstiere erfolgte in den Räumlichkeiten und mit Unterstützung des Institutes für Chirurgische Forschung (ICF), Grosshadern.

2.1.2 Präparation der Versuchstiere

Die Einleitung der Narkose erfolgte durch eine Bolusgabe von 280 mg Azaperon (Stressnil, Janssen-Cilag, Neuss, Deutschland), 500 mg Ketamin (Ketamin Inresa, Inresa Arzneimittel, Freiburg, Deutschland) und 1 mg Atropin (Atropinsulfat-Lösung 0.5 mg/ml, Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland). Anschließend wurde ein Zugang über die Ohrvene gelegt und hierüber 5 mg Midazolam (Midazolam ratiopharm 15 mg / 3 ml, Ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland) sowie 7.5 mg Piritramid (Dipidolor, Janssen-Cilag GmbH, Neuss, Deutschland) verabreicht.

Nach endotrachealer Intubation (Lo-Contour Magill, Mallinckrodt Medical, Athlone, Irland) wurde das Versuchstier mit Raumluft bei einem Lachgasanteil von etwa 20 % beatmet (Dräger Servo Ventilator 900B, Drägerwerk AG, Lübeck, Deutschland). Die Anpassung des Beatmungsvolumens erfolgte entsprechend den, im Verlauf gemessenen arteriellen Blutgaswerten. Die Narkose wurde mit intravenöser Applikation von 10 mg/kgKG/h Propofol (Recofol 20 mg/ml, CuraMED Pharma GmbH, Karlsruhe, Deutschland) und Fentanyl (Fentanyl-Janssen 0.5 mg Injektionslösung, Janssen-Cilag GmbH, Neuss, Deutschland) aufrechterhalten. Die Ableitung des EKG (Theracard 361 D, Siemens, Deutschland) erfolgte nach Einthoven über 3 Klebeelektroden. Die Tiere waren während Intervention auf einem Temperatur regulierten Operationstisch fixiert.

Die Präparation der Tiere aller Versuchsgruppen wurde mit der Kanülierung der rechtsseitigen Arteria carotis sowie der Vena jugularis externa mit 7F Katheterschleusen (Avanti+ Introducer, Cordis Europa, AA Roden, Niederlande) begonnen. Die Schleuse des arteriellen Zugangs wurde zur Aortendruckmessung in Punkt 2.1.4 geschilderter Weise mit dem Druckabnehmer konnektiert.

Die linksventrikuläre Druckkurve wurde zu Beginn eines jeden Versuchs am Tag 0 sowie zu Ende am letzten Versuchstag vor Explantation mit Hilfe eines Kathetertipmanometers aufgezeichnet. Die Messungen erfolgten unter Ruhebedingungen (*Baseline*) und einem Pacing von 100, 120 und 140 Schlägen pro Minute. Dabei wurde die Signal gebende Pacerelektrode nahe dem Sinusknoten unter Durchleuchtung im rechten Herzohr plaziert und die Frequenzübertragung am abgeleiteten EKG kontrolliert.

Nach abgeschlossener Druckmessung erfolgte die Plazierung eines 3 mm x 10 mm grossen PTCA-Ballons (Arthos 3.0mmx10mm, amg, Raesfeld-Erle, Deutschland) in der LAD kurz distal des Abgang des ersten Diagonalastes. Der SSR-Katheter wurde mit seinem Spitzenbereich über die Katheterschleuse der Vena jugularis externa in die AIV eingebracht. Tiere mit einer akzessorischen Vena azygos im Bereich der AIV sind aus Gründen des beschleunigten Abflusses des Infusats und somit der Ergebnisverfälschung nicht in die vorliegende Studie aufgenommen worden.

Die Manipulation im Koronargefässnetz erfolgte nach Antikoagulation mit Heparin (Heparin-Natrium 25000 I.E. / 5 ml, B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) initial mit 10000 I.E. und kontinuierlich fortgesetzt mit 5000 I.E. / h.

Unter Kontrollokklusion der LAD wurde nach Dilatation des Ballons an der SSR-Katheterspitze der maximale systolische AIV-Verschlussdruck gemessen und für den Maximaldruck während Retroinfusion ein um 20 mmHg höherer Wert vorgegeben.

2.1.3 Druckregulierte Retroinfusion

Die SSR (synchronized suction and retroinfusion) stellt eine Weiterentwicklung der 1976 erstmals von Meerbaum et al. vorgestellten synchronisierten Retroperfusion (SRP) dar (80). Dabei handelte es sich um einen nichtoperativen Ansatz, ischämisches Herzareal retrograd von venöser Seite her mit arteriellem Blut zu versorgen. Die Applikation erfolgte während der Diastole, um Druckspitzen im venösen Koronargefässbett zu vermeiden. Hierfür diente ein, in den Koronarsinus

eingelagerter Katheter, der später um einen synchronisiert zur Diastole und somit zum Zeitpunkt der Infusion inflatierten Ballon an seiner Spitze erweitert wurde.

Im Gegensatz zum System der SRP erfolgt die Infusion von Blut oder Therapeutika bei der SSR jedoch selektiver: die Katheterspitze wird hier nämlich in der, das ischämische Myokard drainierenden Koronarvene platziert. Auf diese Weise kann das Totraumvolumen im venösen Gefäßnetz, sowie der ansonsten bei SRP vorhandene Pendelblutfluss deutlich vermindert werden. Darüberhinaus reduziert sich das Volumen des ungenützt in nicht ischämischen Areal abfließenden Infusats (8).

Muss bei der SRP der venöse Abstrom aus den Koronarvenen während der Systole am Katheter vorbei erfolgen, ermöglicht das SSR-System einen ungehinderten Abfluss des desaturierten Blutes durch Absaugen über den Katheter selbst. Nach Injektion von 5-10 ml Kontrastmittel in den SSR-Katheter lässt sich angiographisch eine vollständige Kontrastierung der Venen bis zur Herzspitze darstellen. Um eine optimale Füllung zu erreichen, kann das SSR-Gerät in verschiedener Weise angesteuert werden.

Die SSR umfasst eine EKG getriggerte, druckregulierte Infusionseinheit. Das Infusat (Trägersubstanz: NaCl 0.9 %) befindet sich in einem unter Druck (1250 mbar) stehenden Reservoir, dem wiederum ein Schliessmechanismus nachgeschaltet ist. Die Öffnungszeiten dieses Mechanismus lassen sich bezüglich Beginn (150–200 ms vor Ende der Systole), Dauer (95 % der Diastole) und Anzahl (1 : 4 = Pumpaktion : Herzschlag) pro Herzaktion voreinstellen.

Die Steuerung erfolgte in vorliegenden Experimenten in Abhängigkeit vom individuellen Verschlussdruck der anterioren interventrikulären Vene (AIV): eine Drucksteuerung regelte den Retroinfusions-Fluss ab, sobald sich ein Druck in der AIV messen ließ, der den AIV-Verschlussdruck um mehr als 20 mmHg überstieg. Vorteil der synchronisierten Retroinfusion gegenüber systemischer Gabe der Therapeutika ist eine - auch gegenüber der intrakoronar antegraden Applikationsform - deutliche Erhöhung der Kontaktzeit des retroinfundierten Agens.

Die Applikation des Infusats erfolgt über einen 4-lumigen 7 F Retroinfusionskatheter (Pro-Med, Mödling, Österreich). Die Lumina dienen der Infusion, der AIV-Druckmessung und der Inflation des sich am Ende des SSR-Katheters befindlichen Ballons. Die Katheterspitze wurde zur Applikation in der AIV platziert.

2.1.4 Messung hämodynamischer Parameter

24 Stunden nach Beginn der Reperfusion, am Tag 3, fand die Messung der hämodynamischen Parameter statt. Die Narkoseeinleitung und die Präparation erfolgten wie geschildert.

Zunächst erfolgte die Messung des linksventrikulären Füllungsdruckes. Dieser wurde in Ruhe und unter rechtsatrialem Pacing von 100, 120 und 140 Schlägen pro Minute gemessen.

Zur Messung der regionalen Myokardfunktion mittels Sonomikrometrie folgte die Eröffnung des Thorax mittels Sternotomie. Nach anschließender Perikardinzision und –aufspannung wurden die piezoelektrischen Kristalle (2 Paar im makroskopisch sichtbaren Bereich des Infarkts, 1 Paar im RCX-Konreollareal) platziert. Die korrekte Positionierung der Piezokristalle wurde nach Infarktfärbung und somit makroskopischer Visualisierung des Infarkts und des AAR-Areals überprüft. Die Messung der Segmentverkürzung erfolgte in den einzelnen Herzarealen jeweils in Ruhe (*Baseline*) sowie unter rechtsatrialem Pacing von 100, 120 und 140 Schlägen pro Minute.

Die korrekte Lage der Pacerelektroden wurde unter Durchleuchtung und anhand des abgeleiteten EKGs verifiziert. Zeitlich korrelierend aufgezeichnet wurden die Segmentverkürzung, das EKG, sowie die linksventrikuläre und die über die arterielle Katheterschleuse abgegriffene Aortendruckkurve (CardioSOFT 3.1.5, SonoMetrics, Ontario, Kanada). Hinzu kommt als berechneter Kanal der nach der Zeit abgeleitete linksventrikuläre Druck (LVP), $dLVP/dt$. Am dazugehörig aufgezeichneten Kurvenverlauf orientiert sich nach den Ergebnissen von Heimisch et al. die Auswertung: der Zeitpunkt für die enddiastolische Messung (\rightarrow LVEDP-, EDL) wurde zu Beginn des Anstiegs des $dLVP/dt$ definiert, der Zeitpunkt für die endsystolische Messung (ESL) wurde in den maximalen Abfall des LVPs ($dLVP/dt_{min}$) gelegt. Die einzelnen Zustände wurden jeweils über eine Minute im Verlauf aufgezeichnet und anschließend - gemittelt über fünf repräsentative Herzschläge - ausgewertet

2.1.4.1 Arterielle Druckmessung

Die Messung des Aortendrucks erfolgte über eine in die Arteria carotis communis eingebrachte 9 F Schleuse, die mit ihrem proximalen Ende knapp bis ins Lumen des

Aortenbogens reichte. Über einen Drei-Wege-Hahn war sie distal mit einem Druckabnehmer verbunden. Dieses System wurde mit Kochsalzlösung (NaCl 0,9 %) gespült und luftleer gehalten. Die Druckabnahme wurde zu umgebendem Luftdruck im Versuchsraum auf 0 mmHg abgeglichen, der Druckabnehmer auf Herzhöhe des Versuchstieres angebracht.

2.1.4.2 Linksventrikuläre Druckmessung

Die Druckmessung im linken Ventrikel erfolgte mit Hilfe eines im Spitzenbereich mit einem Druckabnehmer versehenem Pigtailkatheter (Millar pressure tip catheter SPC 560, Millar Transducer Control Unit MIL-TC-510, Millar Instruments, Texas; USA) Das Druckmesssystem wurde zu Beginn eines jeden Versuchs mit einer 2-Punkt-Kalibrierung auf 0 und 100 mmHg geeicht. Während der Versuche wurde die korrekte Lage der Katheterspitze in der linken Herzkammer unter Durchleuchtung (Exposcop 8000, Ziehm GmbH, Nürnberg, Deutschland) und anhand der aufgezeichneten Ventrikeldruckkurve (CardioSoft, 3.1.5, SonoMetrics) verifiziert.

2.1.4.3 LVEDP

Nach stattgehabtem Myokardinfarkt, kommt es aufgrund inaktiven Herzgewebes zu einem vom Ausmaß des Infarktes abhängigen Vorwärtsversagen des Herzens. Der dabei verringerten Auswurfleistung folgend, verbleibt postsystolisch mehr Blutvolumen im Ventrikel als unter physiologischen Bedingungen; daraus resultierend steigt der enddiastolische linksventrikuläre Druck (LVEDP) an. Der enddiastolische linksventrikuläre Füllungsdruck gibt also, zum Zeitpunkt der Diastole, Aufschluss über die Funktion der linken Herzkammer. Er ist ein in der Literatur anerkannter Referenzwert für die globale Myokardfunktion und hat seine Bedeutung in der Abschätzung der Entwicklung einer Herzinsuffizienz. Die Messzeitpunkte für das Ende der Diastole wurden jeweils bei $dLVP/dt_{\min}$ gewählt, dem stärksten Abfall der Ventrikeldruckkurve während einer Herzaktion.

2.1.4.4 $dLVP/dt$

Bei der Kontraktilität herrscht ein direkter Zusammenhang zwischen Kontraktionskraft und Kontraktionsgeschwindigkeit. Da die Kraft und ihre zeitliche Veränderung jedoch

nicht direkt messbar sind, greift man auf den dazu korrelierenden, im Ventrikel herrschenden Druck zurück. So dient als Kontraktilitätsindex die erste Ableitung des linksventrikulären Drucks nach der Zeit: $dLVP/dt$. Dieser Parameter entspricht der Druckerhöhung-, beziehungsweise -abfallsgeschwindigkeit im linken Ventrikel und gibt als solcher Auskunft über die Kontraktilität und Relaxation des Herzmuskels während einer Herzaktion. Er wird seit Mason et al. 1965 als wichtiger Hinweis auf den inotropen Funktionszustand des Myokards verstanden.

2.1.4.5 Sonomikrometrie

Mit der Messmethode der Sonomikrometrie lässt sich die regionale Myokardfunktion in Form messbarer Segmentverkürzungen des Herzmuskels darstellen. Je nach Ausmaß der Infarzierung des jeweiligen Myokardabschnittes, kommt es zu einer unterschiedlich stark ausgeprägten Einschränkung der Segmentverkürzung. Angegeben wird die Segmentverkürzung als prozentuale Veränderung der Segmentlänge (% SS). Dabei stehen die enddiastolische (EDL) und die endsystolische Segmentlänge (ESL) in Relation zueinander wie folgt:

$$\% \text{ SS} = (\text{EDL} - \text{ESL}) / \text{EDL} \times 100$$

Die Segmentverkürzung wird über zwei ins Myokard eingebrachte Piezokristalle und die Veränderung der Ultraschalllaufzeit zwischen beiden Kristallen ermittelt. Zur Datenerhebung werden jeweils zwei Piezokristalle nach Stichinzision (Disposable Scalpel No. 11, Feather Safety Razor Co., Japan) des Myokards subendokardial platziert (Abb.2). Dabei liegen die Kristallpaare des Infarktareals und der umgebenden *Area at risk* im Vorderwandgebiet jeweils parallel zur kurzen Achse des Herzens. Der zur LAD-Verschlussstelle gewählte Abstand beträgt für die *Area at risk* 1 cm beziehungsweise 3 cm für das Infarktareal. Zur Kontrolle liegt ein Kristallpaar im, durch die RCX perfundierten Hinterwandgebiet, längs der Kontraktionsbewegung des Myokards. Der Abstand der korrespondierenden Kristalle zueinander beträgt jeweils etwa 1-1.5 cm. Bei der Messung fungieren die Kristalle abwechselnd als Sender und Empfänger (\Rightarrow Transceiver). Die daher bei der Ansteuerung der Kristalle entstehende Messverzögerung während Kontraktion des Myokards und die daraus resultierende örtliche Unschärfe bei der Abstandsmessung ist jedoch für biologische

Bewegungen wie die des Herzens zu vernachlässigend klein. So lässt sich bei einem Zählwerk für die Ultraschalllaufzeit mit einer Taktfrequenz von 64 MHz eine Auflösung von 24 µm erreichen.

2.2 Molekularbiologie

2.2.1 Liposomenapplikation vor und nach Reperfusion

Die Liposomenapplikation erfolgte am Tag 0 über zwei mal 10 Minuten während Okklusion der LAD kurz distal des Abgangs des ersten Diagonalastes. Die LAD-

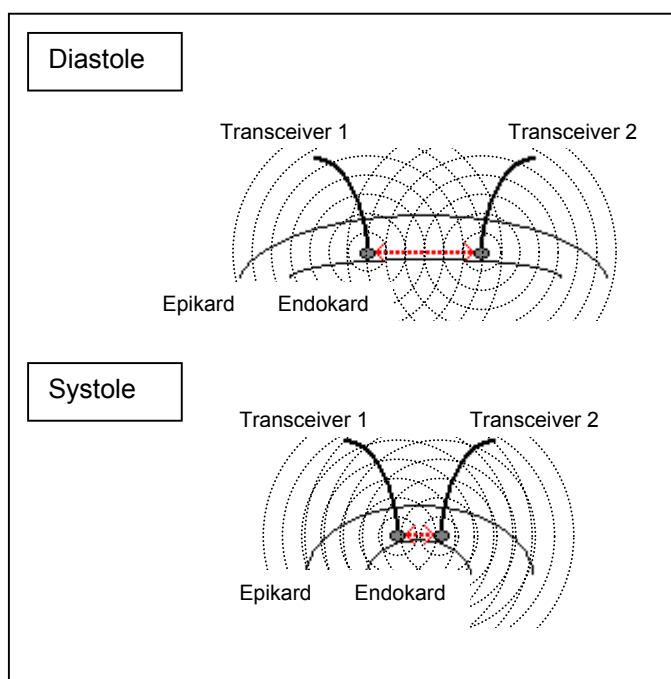


Abbildung 2

Schematische Darstellung der piezoelektrischen Kristalle im Myokard

Okklusion wurde durch Dilatation des erwähnten PTCA-Ballons mit etwa 6 atm Druck (Dilatator: Basix 25, Merit Medica) bewerkstelligt. Bei der Retroinfusion bestand das Liposomen-gemisch aus 1 mg cDNA (GFP, VEGF₁₆₅, eNOS S1177A, eNOS S1177D), 16 ml Puffer, 200 µl Enhancer und 250 µl Liposomen (Effectene Transfection Reagent, Quiagen, Hilden, Deutschland). Als Trägersubstanz diente 0.9 %iges NaCl. Die retrograde Injektion in die AIV erfolgt unter einem Reservoirdruck von 1250 mbar, mit einer Pumpzeit von 95 % der Diastole, einer Verzögerung von 10 ms zum Beginn einer jeden Diastole und einer Pumpaktion auf jeden vierten Herzschlag.

48 h später (Tag 2) folgte eine 60 minütige Ischämie, wiederum durch Verschluss der LAD mit einem 3 mm x 10 mm großen PTCA-Ballon distal des Abgangs des ersten Diagonalastes. Lediglich bei den Versuchsgruppen mit NF κ B-decoy- und L-NAME-Applikation erfolgte am Tag 2 eine synchronisierte selektive Retroinfusion von 75 nmol NF κ B-decoy über die letzten fünf Minuten während Ischämie beziehungsweise 250 μ mol L-NAME über 15 Minuten nach Beginn der Reperfusion. Die mit L-NAME behandelten Tiere erhielten außerdem mit 500 μ mol/l L-NAME versetztes Trinkwasser zwischen Tag 2 und 3.

Die Katheterschleusen wurden nach Intervention entfernt, die Muskel- und Hautschichten genäht (Supolene 3.5/0, Resorba, Nürnberg, Deutschland). Nach Narkoseausleitung wurden die Tiere in die Ställe verbracht und ausreichend ernährt.

2.2.2 Infarktfärbung

Nach Messung der hämodynamischen Parameter wurde das Herz durch die Injektion von 15 ml KCl zum Stillstand gebracht. Nach Umstechen und Ligieren (Vicryl 1 CTX Plus, Ethicon, Brüssel, Belgien) der LAD am Ort der ursprünglichen Okklusion, wurden 20 ml Methylenblau in den linken Ventrikel injiziert und zur Negativfärbung der AAR durch 10-malige Herzkompensation im Gewebe verteilt. Das Herz wurde explantiert und die LAD, zur Applikation von 15 ml 10 %em Tetrazoliumrot, kanüliert. Die Injektion dieses Vitalfarbstoffes erfolgte druckreguliert (80 – 100 mmHg) distal der LAD-Verschlussstelle. Auf diese Weise konnte der Infarkt makroskopisch sichtbar gemacht werden.

Das Herz wurde anschließend, senkrecht zur langen Herzachse in 5 mm dicke Schichten (= *Slices*) geschnitten. Die *Slices* wurden für die spätere Vermessung des Infarktolumens, der AAR und des linken Ventrikels digital fotografiert (Digital Mavica MVC-FD81, Sony Corp.).

Für die Histologie wurden aus den zu beurteilenden Regionen (Infarkt / AAR / Kontrolle) der einzelnen Schichten transmurale Gewebeproben entnommen und bis zur Aufarbeitung in 5 %em Formalin-PBS-Gemisch aufbewahrt. Zur Bestimmung der NF κ B-Aktivierung und der Myeloperoxidaseaktivität wurden ebenfalls transmurale Gewebeproben aus den einzelnen Arealen entnommen, jedoch in Azeton (Aceton, Roth, Karlsruhe, Deutschland) vorgefroren und bis zur Vermessung bei – 80 °C gelagert.

2.2.3 Infarktgrößenbestimmung

Die Infarktgrößenbestimmung erfolgte anhand der digitalen Aufnahmen der einzelnen Herzschnitten. Nach Herzstillstand wurde bei LAD-Ligation auf Höhe der Okklusion Methylenblau in den LV injiziert und manuell durch die Koronarien gepumpt. Dadurch färbte sich das Kontroll-Areal blau an, während die Area at Risk ungefärbt blieb. Mittels vitaler Gegenfärbung mit Tetrazoliumrot, das sich in Gegenwart von Reduktionsäquivalenten intensiv rot anfärbt, wurde die vitale Area at Risk vom avitalen Infarktgewebe unterschieden. Um die transmurale Ausdehnung der so makroskopisch sichtbar gemachten Grenzen beurteilen zu können, wurde das explantierte Herz in Schichten (*Slices*) geschnitten und diese senkrecht zur kurzen Herzachse mit anliegendem Maßstab digital standardisiert fotografiert. Anhand der Bilder erfolgte nach digitaler Flächenmessung (Sigma Scan Pro 4, Statcon, Witzenhausen, Deutschland) die Berechnung der Infarktgröße (Infarkt / AAR) und Größe der AAR (AAR / gesamtes LV-Gebiet) der einzelnen Areale.

2.2.4 Nachweis der eNOS / eNOS P-Expression und VEGF

Der Nachweis der eNOS-Expression erfolgte mit Hilfe eines Immunoblottings (Westernblotting).

Gewebepräparation

Das Gewebe der einzelnen Herzareale wurde mit einem Präparationspuffer im Verhältnis 1 : 4 (1 Teil Gewicht : 3 Teile Puffervolumen in μ l) versetzt und zerkleinert (Ultra-Turrax, IKA-Werk GmbH & CoKG, Staufen, Deutschland).

Präparationspuffer: 100 ml

Tris HCl	5 ml	0.05 % oder 68 %
CHAPS	0.984 g	16 mM
DTT	15.425 mg	1 mM

2. Material und Methoden

EGTA	38.04 mg (= 1 ml)	1 mM
EDTA	29.22 mg (= 1 ml)	1 mM
Biopterin	100 µl	10 µM
FAD	40 µl	4 µM
FMV	40 µl	4 µM
L-Arginin	10 µl	1 µM
Leupeptin	101.86 µg (= 22 µl)	2.2 µM
Pepstatin A	100.14 µg (= 146 µl)	1.46 µM

Anschließend wurde das Gemisch in flüssigem Stickstoff gefroren und über 3 Minuten bei 37 °C schockgetaut. Nach einem 1-minütigen Ultraschallbad erfolgte die Zentrifugation bei 3200 U/min - entsprechend 1000 g - und 4 °C über 10 Minuten; Überstand und Pellet wurden bis zum weiteren Gebrauch bei - 80 °C eingefroren.

Gelansatz

Gelzusammensetzung						
für 12 ml (4,5 ml pro Gel)	6 %	8 %	10 %	12 %	15 %	Stack
H ₂ O	6.4 ml	5.6 ml	4.8 ml	4.0 ml	2.8 ml	3.4 ml
Protogel 30 % (Biozym: 900205)	2.4 ml	3.2 ml	4.0 ml	4.8 ml	6.0 ml	830 µl
1.5 M Tris (pH 8.8)	3.0 ml	3.0 ml	3.0 ml	3.0 ml	3.0 ml	630 µl*
10 % SDS	120 µl	120 µl	120 µl	120 µl	120 µl	50 µl
10 % APS (Roth: 9592,3)	120 µl	120 µl	120 µl	120 µl	120 µl	50 µl
TEMED	10 µl	7.2 µl	4.8 µl	4.8 µl	4.8 µl	2.5 µl

*für Stack: 1 M Tris pH 6.8

Die Acrylamidkonzentration orientierte sich dabei an der Länge der nachzuweisenden Proteine:

Proteinlänge	Acrylamidkonzentration
12 - 43 kD	15 %
16 - 68 kD	10 %
36 - 94 kD	7.5 %
57 - 212kD	5 %

Nach Einsetzen eines Kammes wurde der durch Spacer offengehaltene Raum zwischen zwei fettfreien und trockenen Glasplatten luftblasenfrei mit Gel aufgefüllt. Das so aufgegossene Gel wurde von der Mitte aus mit Wasser überschichtet, um nach Ablauf von 30 Minuten die erfolgte Polymerisation anhand der Grenze zwischen Gel und Wasser verifizieren zu können; die Polymerisation beginnt mit Zusatz von TEMED.

Nach abgeschlossener Polymerisation, Abgießen des Wassers und Aufsaugen noch vorhandener Flüssigkeit mit einem Papiertuch, erfolgte die Überschichtung des Gels mit Stack-Gel und das Einsetzen eines weiteren Kammes. Die als Platzhalter für die S-Slots der Proben verwendeten Kämmen wurden nach Polymerisation entfernt.

Aufbringen der Proben

Bevor die Proben in die Slots des Gels pipettiert werden konnten, mussten sie über 5 Minuten mit 1 x SDS-Loadingbuffer versetzt und bei 96 °C denaturiert werden. Das Mischungsverhältnis betrug in etwa 40 µg Probe auf bis zu 20 µl Puffer.

SDS-Loadingbuffer		
Tris HCl (0.5 M, pH 6.8)	78.8 mg (= 1 ml)	50 mM
Dithiothreitol	154.25 mg (= 1 ml)	100 mM
SDS (10 %)	2 ml	2 %
Bromphenolblau (1 %)	1 ml	0.1 %
Glycerol	1 ml	10 %
H ₂ O	4 ml	

Die so behandelten Gewebeproben wurden mit einer ausgezogenen Spitze aufgetragen, die Spitze zwischen den einzelnen Proben mit Laufpuffer gespült. Das obere Pufferreservoir wurde mit 115 ml Laufpuffer gefüllt, die Kammer mit 385 ml (400 ml Laufpuffer: 40 ml 10x + 360 ml H₂O).

Laufpuffer 10 x		
Tris Base	30.3 g	25 mM
Glycin	144.2 g	192 mM
SDS (10%)	10 ml	1.0 %

2. Material und Methoden

→ auf pH 8.3 eingestellt und mit H₂O auf 1000 ml aufgefüllt

An das Gel wurden anschließend über 10 Minuten 70 V und folgend über 60 Minuten 120 V angelegt.

Blotting

Nach Ablauf der Gel-Elektrophorese erfolgte der Transfer der gelaufenen Proteinbanden auf eine Nitrocellulosemembran (Protran BA 83, 0.2 µm, Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland). Für dieses Blotting wurde die Nitrocellulosemembran auf das Elektrophorese-Gel aufgebracht, zwischen zwei Schichten von jeweils 3 Lagen 3MM Whatmann und einem befeuchteten Schwamm fixiert und im Transferpufferbad bei 70 V und - 20 °C über 120 Minuten inkubiert.

Transferpuffer		
Tris Base	2.7 g	22.3 mM
Glycin	14.5 g	193.2 mM
Methanol	200 ml	20 %
H ₂ O	ad 1000 ml	

Der angefertigte Blot wurde anschliessend für 30 Minuten unter Schütteln mit primären Antikörpern (1 : 1000 in Blockingreagenz verdünnt) inkubiert und folgend zweimal mit Blockingreagenz gewaschen. Danach erfolgte eine 30 - 45 minütige Inkubation, ebenfalls unter Schütteln, mit 1 : 2500 in Blockingreagenz verdünnten und mit HRP (horseradish peroxidase) markierten sekundären Antikörpern gegen anti-Maus Immunglobulin (goat anti Mausg IgG_{2a}^{HRP}, sc-2061, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, USA).

Blockingreagenz	
TBS 10 x	50 ml
Trockenmilch	25 g
H ₂ O	ad 500 ml

TBS 10 x

NaCl	90 g/l	9 %
Tris Base	12.1 g/l	0.1 M

Nach erneutem dreimaligem Waschen mit Blockingreagenz über jeweils 10 Minuten wurde der Blot zur „enhanced chemiluminescence“ (ECL)-Detektion für 3 Minuten mit ECL-Lösung inkubiert. Das Luminol dieser Chemolumineszenz-Lösung wird unter Abgabe von blauem Licht in einer HRP-katalysierten Reaktion oxidiert. Auf diese Weise kann in einer Photokassette eingelegter, blaulicht-sensitiver Film an entsprechenden Stellen belichtet und die mit Antikörpern markierte Bandenstruktur sichtbar gemacht werden. Nach digitaler Auswertung des belichteten Filmmaterials, erfolgte so der semiquantitative Nachweis der eNOS-Aktivität in untersuchtem Herzareal.

ECL-Lösung

Tris (1.5 M, pH 8.5)	660 µl
p-Coumarinsäure 90 mM	25 µl
Luminol 250 mM	25 µl
H ₂ O ₂ 3 %	3 µl
H ₂ O	ad 10 ml

2.2.5 Aktivitätsbestimmung von NF κ B

Da mit der Aktivierung von NF κ B die Expression der wichtigsten Adhäsionsmoleküle für die Leukozytenrekrutierung eingeleitet wird (siehe oben) lässt sich mit der Messung der Aktivität des NF κ eine verlässliche, semiquantitative Aussage über die exprimierten Adhäsionsmoleküle treffen und so Rückschlüsse auf die Entzündungsreaktion im betroffenen Areal ziehen. Das Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) ist die schnellste und praktischste Methode, um aktivierte NF κ Bs semiquantitativ nachzuweisen. Es handelt sich dabei um eine besonders sensitive Art des Nachweises, wobei nur wenige Zellen benötigt werden.

Die Spezifität dieser Nachweismethode für NF κ B wurde durch in vitro Zugabe von NF κ B decoy Oligonukleotide demonstriert. Sie enthalten die dem Transkriptionsfaktor entsprechende Konsensussequenz (5'-AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG C-3' und 5'-GCC TGG GAA AGT CCC CTC AAC T-3') und verhindern mit ihrer Bindung an das aktivierte NF κ B in vivo dessen Bindung an die DNA. Der Präparationsmethodik folgend ist dann auch die radioaktive Markierung des aktivierten Nuklidfaktors bei der Aufbereitung der Gewebeproben für das EMSA nicht mehr möglich und das für NF κ B typische Bandenmuster bleibt im EMSA aus. Zur Messung wurden zunächst Proteinlysate von Kern und Zytosol angefertigt. Dazu wurden 200 mg des gefrorenen Herzgewebes aus den einzelnen Arealen zerkleinert (Ultra-Turrax, IKA-Werk GmbH & CoKG, Staufen, Deutschland) und zur Zytolyse je mit 1 ml Puffer A versetzt.

Puffer A (Zytolysat)		
Hepes	119 mg	10 mM
KCl	37.3 mg	10 mM
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	15.3 mg	1.5 mM
Dithioerythrit	15.43 mg	2 mM
Aprotinin	4 μ g	>0.026 TIU/50ml
Triton x 100	250 μ l	0.5%
H ₂ O	ad 50 ml	

→ mit KOH auf pH 7 eingestellt

1.5 ml des Gemisches wurden über Polyamid (Neolab, Heidelberg, Deutschland) mit einer Porengröße von 100 μ m filtriert und für 5 Sekunden bei 14000 rpm zentrifugiert (Eppendorf-Zentrifuge). Der Überstand wurde weitere 20 Minuten bei 14000 rpm und 4 °C zentrifugiert und neu entstehender Überstand als Zytosollysate zur Proteinbestimmung verwendet.

Hieraus wurde des Weiteren zur Erstellung des Kernlysates ein Pellet von 100 μ l mit 100 μ l des Puffers B und 1 μ l PMSF (Merck, Darmstadt, Deutschland) über 20 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde das Gemisch über 20 Minuten bei 14000 rpm und 4 °C zentrifugiert, um den Überstand als Kernlysate zu aliquotieren und für die Proteinbestimmung zu verwenden.

Puffer B (Kernlysatz)

Hepes	238.3 mg	20 mM
KCl	1.49 g	400 mM
EDTA	1.5 mg	0.1 mM
Glycerin	12.5 ml	25 %
H ₂ O	ad 50 ml	

→ mit KOH auf pH 7.9 eingestellt

Zur Vorbereitung des Gelshifts wurden für die Annelierung 3 µl NFκB Einzelstrang-DNA, 84 µl Aqua dest und 10 µl Bindungspuffer über 5 Minuten bei 95 °C gekocht und langsam abgekühlt.

Es folgte die radioaktive Markierung der DNA-Consensussequenz für NFκB. Dazu wurden 11 µl Aqua dest, 2 µl Phosphorylierungspuffer (10 x), 5 µl ³²P-gamma-ATP (Perkin Elmer, Boston, USA), 1 µl Oligo-DNA und 1 µl PNK als Starter über eine Stunde bei 37 °C mit 60 µl TBE (1 x) inkubiert. Freies ³²P-gamma-ATP wurde über NUC TRAP-Säulen (Stratagene, Cedar Creek, Texas, USA) mit 100 µl TBE (1 x) abgewaschen.

Zur Herstellung zweier 6 %iger PAG-Gel-Platten, kamen 45 ml Aqua dest, 3 ml TBE-Puffer (10 x), 12 ml 30 %iges PAA, 480 µl 10 %iges APS und 60 µl TEMED über 10 Minuten zur Polymerisation.

Zur Anfertigung des Laufpuffers wurden 75 ml TBE (10 x) auf 1.5 l Aqua dest verdünnt und anschließend 1 l des Puffers in die Laufkammer gefüllt. Das Gel lief über 15 Minuten bei 150 V vor.

Bevor die Proben zu je 20 µl aufgetragen werden konnten, wurden 10 µg Protein mit 5.6 µl Bindungspuffer und 0.4 µl dIdC (Amersham Pharmacia, Piscataway, NJ, USA) versetzt und mit Aqua dest auf 20 µl aufgefüllt. Nach 15 Minuten wurden 1 - 2 µl der mit ³²P markierten Oligo-DNA zugegeben und für 30 Minuten auf Eis inkubiert.

Bindungspuffer

Tris Base od HCL?	400µl	0.04%
NaCl 1,5%	2ml	0.2%
EDTA	80µl	0.08%
Glycerin	920 µl	0.092%
Ficoll 400	0.8 g	2 mM

2. Material und Methoden

PMSF	20 µl	0.02%
Dithioerythrit (DTT)	6.17 mg	4 mM
Aqua dest	ad 10 ml	

Nach Zugabe von 2 µl Probenpuffer wurden die Proben auf das Gel aufgetragen und initial über 15 Minuten bei 150 V, anschließend für 2 Stunden bei 250 V laufen gelassen.

Probenpuffer		
Glycerin	450 µl	0.6%
Aqua dest	100 µl	0.13%
Bromphenolblau	100 µl	0.13%
Xylencyanol	100 µl	0.13%

Die Gele wurden getrocknet, die Filme (Hyperfilm MP, Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, England) belichtet und die Banden, zur semiquantitativen Bestimmung der NFκB-Aktivierung, digital vermessen (Quantity-One 4.1.1/Gel Doc 2000, Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA).

2.2.6 Granulozytennachweis

Aufgrund der Akkumulation der Granulozyten im ischämischen Areal und deren dort entfalteten Wirkung, lassen sich diese gut als Indikator für den infolge der Reperfusion entstandenen Gewebeschaden verwenden. Die quantitative Bestimmung ihres Auftretens kann durch den Nachweis der Myeloperoxidaseaktivität in beobachtetem Gewebsarealen bewerkstelligt werden. Myeloperoxidase ist ein ausschliesslich in Granula neutrophiler Granulozyten enthaltenes Enzym.

Zur Erstellung einer Standardkurve wurden zunächst Leukozyten aus dem Blut der Versuchstiere zu Beginn der Versuchsreihe isoliert. Hierfür wurden 10 ml Blut in ein EDTA-Röhrchen abgenommen und 15 Minuten bei 250 g zentrifugiert (Labofuge, Eppendorf 1200rpm). Die oberste Erythrozytenphase wurde mit 800 µl 1 M EDTA und 25 ml PBS ohne Kalzium gemischt, auf 9 ml Percoll-Lösung (aus 5 ml 1.5 M NaCl, 25 ml Percoll (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden), 20ml H₂O) aufgetragen und über 20 Minuten bei 400 g zentrifugiert. Die oberste

Erythrozytenphase wird zur Lyse mit 18 ml ice-cold water für 30 Sekunden gemischt und unter Zugabe von 2 ml Pipes-Puffer über 20 Minuten bei 4 °C und 1000 g erneut zentrifugiert. Anschliessend wird die Lyse wiederholt.

Pipes-Puffer		
Pipes	5.96 g	25 mM
NaCl	6.43 g	110 mM
KCl	0.37 g	5 mM
Aqua dest	ad 1000 ml	

→ mit NaOH auf pH 7.4 eingestellt

Es folgte ein zweimaliges Waschen eines jeden Zellpellets mit 10 ml PAG-Puffer (aus 100 ml Pipes-Puffer, 3% Albumin (3 g) und 0.1 % Glukose (0.1 g)) über 20 Minuten bei 4 °C und 1000 g. Das Pellet wurde anschließend in 1 ml Pipes-Puffer aufgenommen und davon 200 µl zur Leukozytenzählung (COULTER® A^C T diff™, Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland) verwendet. Die restlichen 800 µl wurden nochmals mit PAG-Puffer gewaschen.

Die Pellets wurden des Weiteren jeweils mit 3 ml 50 mM Phosphatpuffer von pH 6.0 und 0.5 % HTAB (Hexadecyltrimethylammonium Bromide, Sigma Ultra, Steinheim, Deutschland) versetzt und vor sowie nach dreimaligem Einfrieren (- 80° C) und Auftauen für 10 Sekunden ins Ultraschallbad gegeben. Abschließend wurden sie über 30 Minuten bei 15 °C und 40000 g zentrifugiert. 100 µl des dabei entstehenden Überstands wurden, zur Anfertigung der Standardkurve einer unverdünnten, einer 1:2, 1:4 und 1:8 verdünnten Lösung in die MPO-Messung eingesetzt.

Zur Präparation von Gewebe für die MPO-Messung wurden 150 mg Gewebe abgewogen und in 3 ml 50 mM Phosphatpuffer (pH = 6.0) und 0.5 %igem HTAB zerkleinert (Ultra-Turrax, IKA-Werk GmbH & CoKG, Staufen, Deutschland). Es folgte vor und nach dreimaligem Einfrieren (- 80 °C) ein Ultraschallbad (Sonorex, Bandelin, Berlin, Deutschland) über jeweils 10 Sekunden. Nach 30 minütigem Zentrifugieren bei 15 °C und 40000 g wurden ebenfalls 100 µl des Überstands der MPO-Messung zugeführt.

Diese 100 µl der Überstände wurden für die Leerwerte mit 2.9 ml 50 mM Phosphatpuffer (pH 6.0) und 0.53 mM O-Dianisidin (Sigma, Steinheim, Deutschland), im Falle der Messung der Standardwerte und der Proben zusätzlich mit 0.15mM

H₂O₂ (30%, Aldrich, Steinheim, Deutschland) versetzt. Die Messung erfolgte am Photometer (Ultrospec Plus, Pharmacia, Freiburg, Deutschland) bei einer Wellenlänge von 460 nm.

Die Ergebnisse wurden als Ratio MPO U/g Protein angegeben.

2.3 Statistik

Alle Ergebnisse wurden als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. Die Resultate der einzelnen Versuchsgruppen wurden zunächst im einseitigen ANOVA-Test auf signifikante Abweichungen überprüft. Dabei schloss sich bei positivem Ergebnis, das heisst bei Verwerfen der H₀-Hypothese (keine signifikanten Unterschiede der Resultate in den einzelnen Untersuchungsgruppen), ein multiple comparison Test (Student-Newman-Keul-Test) an, um signifikante Unterschiede der einzelnen Gruppen untereinander zu eruieren.

Der Vergleich der prä- und postischämischen LVEDP-Werte wurde mit Hilfe des Student-t-Test durchgeführt. Als signifikantes Ergebnis wurde $p < 0.05$ angesehen. Die Berechnungen erfolgten mit dem Statistikprogramm SPSS 11.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA)

3 Ergebnisse

3.1 eNOS-Transfektion der Region of Interest

Die Transfektion nach Methode der Retroinfusion über die AIV wurde anhand der Applikation GFP(= green fluorescence protein)-DNA tragender Liposomen überprüft. In der Histologie zeigte sich dabei 48 Stunden nach Gabe eine deutliche Anfärbung und somit Expression von GFP in kleinen (15 μ m Durchmesser) und großen (50 –

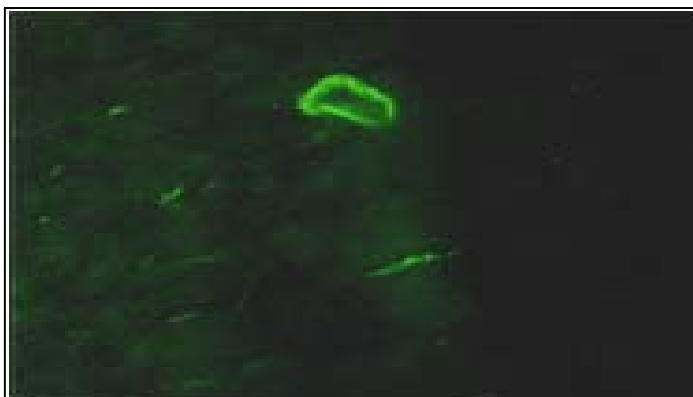


Abbildung 3

pCMV-eGFP transfizierte GefäÙe der AAR

200 µm Durchmesser) Gefäßen der AAR (Abb.3).

Die eNOS-Transfektion erfolgte auf identische Weise am Tag 0, 48 Stunden vor Ischämie. Immunoblotting nach Transfektion eNOS S1177D kodierender DNA

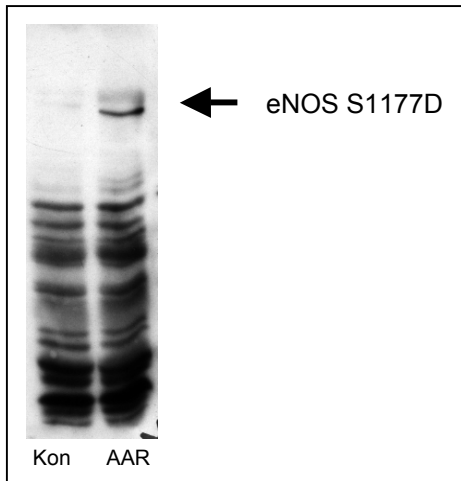


Abbildung 4

Bandenmuster des mit c-myc Ak markierten eNOS S1177D im Immunoblot

bestätigte die erfolgte Transfektion: das aus der AAR aufbereitete Gewebe wies - im Gegensatz zu Gewebe aus dem Kontrollareal - im elektrophoretischen Nachweis eine deutliche eNOS D-spezifische Bandenstruktur auf. Das Immunoblotting mit eNOS-Antikörpern nach Selektionierung der eNOS-Banden mit Hilfe der c-myc Immunoprecipitation (Abb. 4) zeigte eine 2- bis 2.5-fach höhere Expression des eNOS-Proteins in der AAR und dem Infarktareal als im Kontrollareal des gleichen Herzens (Abb. 5).

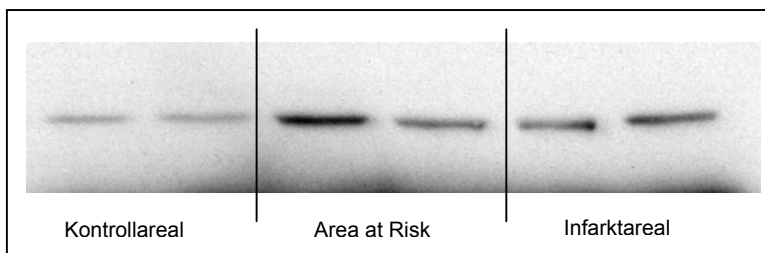


Abbildung 5

eNOS Immunoblot nach Immunoprecipitation

3.2 VEGF-Transfektion und eNOS-Phosphorylierung

Auch die Kontrolle der VEGF-Transfektion in den einzelnen Arealen der *Region of Interest* mit Hilfe des Immunoblots bestätigte eine deutlich höhere VEGF-Expression bei behandelten Tieren als bei unbehandelten Tieren (Abb. 6).

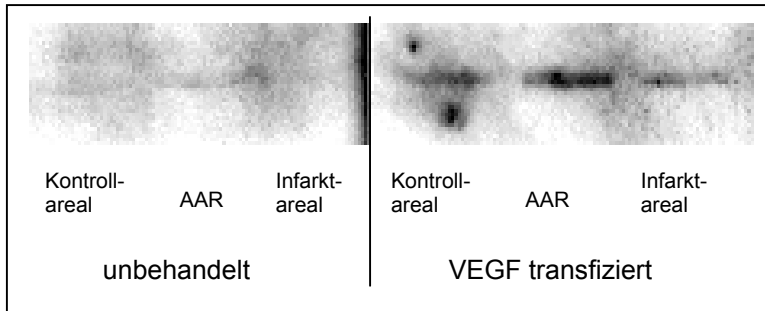


Abbildung 6

VEGF Ak Immunoblot

Der Nachweis von eNOS mit Antikörpern zeigte im Blot der einzelnen Myokardareale jedoch keinen Unterschied zwischen unbehandelten und mit VEGF transfizierten Tieren. Das Immunoblotting für das an S1177 phosphorylierte eNOS D bewies

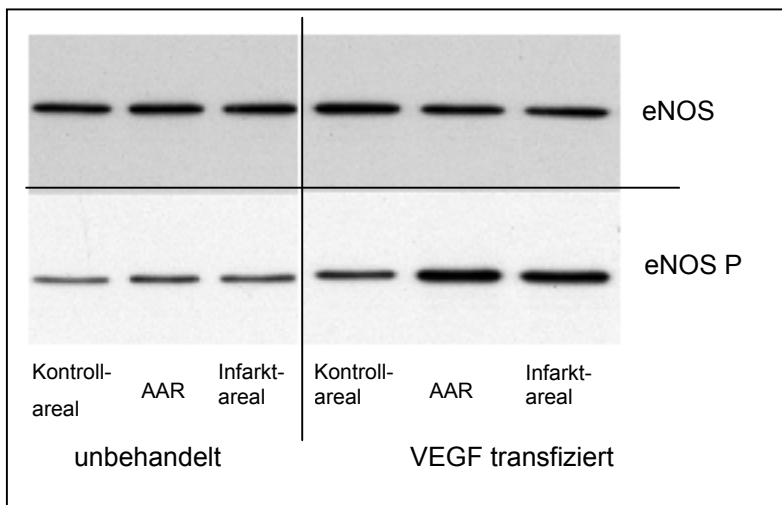


Abbildung 7

eNOS/eNOS P-Immunoblot behandelter und unbehandelter Tiere

hingegen einen deutlichen Anstieg in mit VEGF behandelten Tieren gegenüber scheinoperierten Kontrolltieren (Abb. 7).

3.3 iNOS-Expression der Region of Interest

Der Nachweis der iNOS-Expression erfolgte nach immunohistochemischer Anfärbung (Abb.8) und Auszählung betroffener Gefäßwänden in den einzelnen Herzarealen. Die Anzahl der Gefäßanschnitte mit Expression von iNOS wurde prozentual als Teil der Gesamtzahl aller Gefäßanschnitte eines Areals angegeben. Die iNOS-Expression ist teilweise NFκB-abhängig und somit ebenfalls ein Indikator für die NFκB-Aktivierung. Nach Applikation von VEGF-DNA enthaltenden Liposomen konnte in der AAR (20.0 % ± 5.8), sowie im Infarktareal (17.5 % ± 8.2) keine signifikante Erhöhung iNOS exprimierender Gefäßquerschnitte gegenüber dem Kontrollareal (12.9 % ± 5.6) festgestellt werden. Im Vergleich dazu ergab sich in der

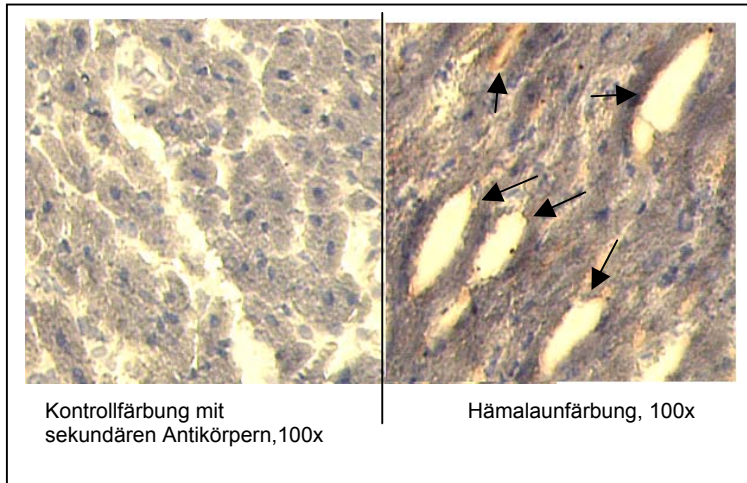


Abbildung 8

Immunohistochemische iNOS-Färbung im Infarktareal

Gruppe scheinoperierter Tiere sowohl in der AAR ($42.9 \% \pm 3.3$), als auch im Infarktareal ($43.0 \% \pm 4.4$) eine signifikante Zunahme der induzierten NOS gegenüber dem Kontrollareal ($10.0 \% \pm 0.8$). Ähnlich bei VEGF-transfizierten und anschließend mit L-NAME behandelten Tieren: im Vergleich zum Kontrollareal ($18.4 \% \pm 5.8$) kam es in der AAR ($35.8 \% \pm 4.9$) und im Infarktareal ($34.0 \% \pm 7.0$) zu einer deutlichen Erhöhung des iNOS-Anteils, wobei sich jedoch nur für die *Area at Risk* signifikante Werte ergaben ($n = 3$, $*p < 0.05$) (Abb. 9).

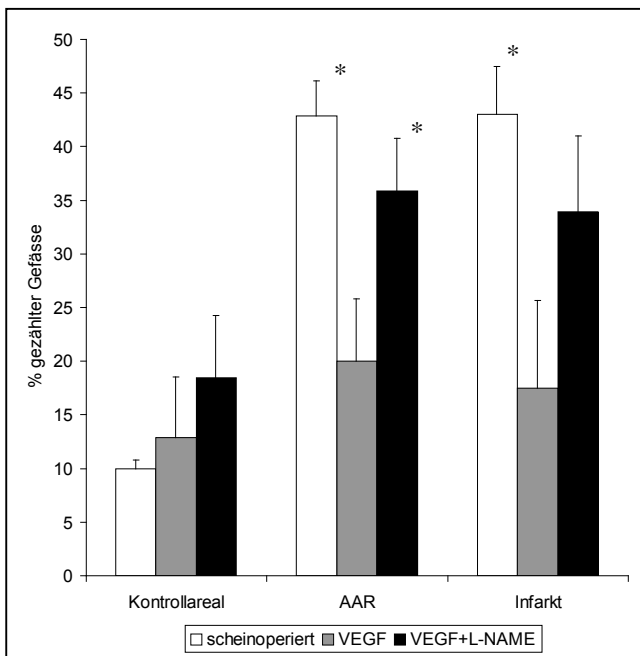


Abbildung 9

iNOS-Expression an Gefäßwänden der einzelnen Herzareale in behandelten und unbehandelten Tieren

3.4 VEGF-/eNOS D-abhängige NF κ B-Aktivierung

Die NF κ B-Aktivierung wurde mit Hilfe des *Electro Mobility Shift Assays* (EMSA, siehe oben) nachgewiesen. 24 Stunden nach Reperfusion zeigte die EMSA-Untersuchung für Gewebe aus der AAR unbehandelter Tiere ein NF κ B spezifisches Bandenmuster. Die Bildung dieses Bandenmusters war nach Zusatz von NF κ B-decoy Oligonukleotiden (ODN) ex vivo gehemmt. Beim Versetzen der Gewebeproben aus der AAR, ebenfalls 24 Stunden nach Reperfusion, mit für NF κ B unspezifischen ODNs ex vivo, waren im EMSA die für aktiviertes NF κ B typischen Banden wieder deutlich erkennbar (Abb. 10).

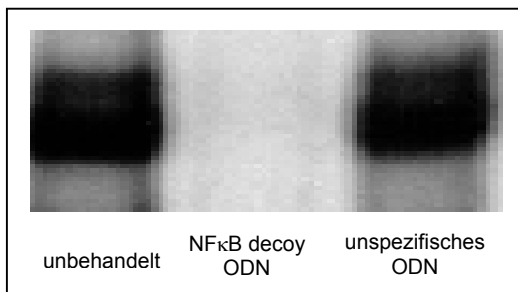


Abbildung 10

EMSA mit NF κ B spezifischen Banden – AAR 24 Stunden nach Reperfusion

Die retrograde Transfektion der durch die LAD versorgten Vorderwand mit für eNOS 1177D kodierender DNA erfolgte 48 Stunden vor Ischämie. Im EMSA zeigte sich dabei 24 Stunden nach Reperfusionsbeginn ein deutlicher Rückgang der NF κ B-Aktivierung in den einzelnen Herzarealen (Abb. 11).

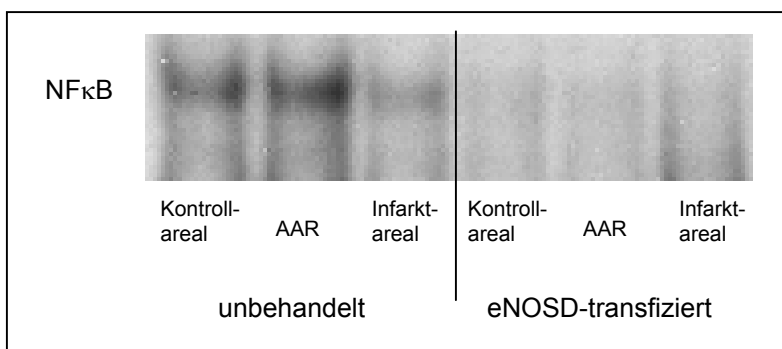


Abbildung 11

EMSA - NF κ B-Nachweis unbehandelter und eNOS-D-transfizierter Tiere

Die physiologische Aktivierung erfährt die eNOS S1177 unter anderem durch Akt-abhängige Phosphorylierung des Proteins am Serinrestes der Position 1177. Die eNOS S1177D stellt eine Mutante der humanen eNOS S1177 dar, bei der eben genanntes Serin durch Aspartat ersetzt wurde. Damit erreicht man eine dauerhafte und von Phosphorylierung unabhängige Aktivierung der endothelialen NO-Synthase.

Im Vergleich zu unbehandelten Tieren, zeigte sich nach Applikation von VEGF-DNA enthaltenden Liposomen im EMSA ebenfalls eine verringerte NFκB-Aktivierung; ein Effekt, der bei Retroinfusion von VEGF mit folgender Verabreichung von L-NAME, vor allem in der AAR, weitestgehend wieder aufgehoben werden konnte (Abb. 12).

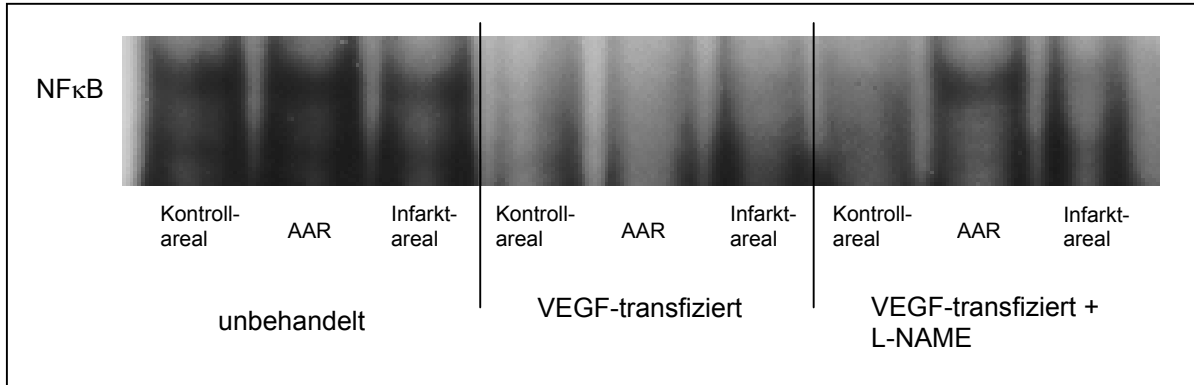


Abbildung 12

EMSA - NFκB-Aktivierung unbehandelter und VEGF-transfizierter Tiere mit/ohne L-NAME-Applikation

3.5 Myeloperoxidaseaktivität der einzelnen Herzareale

Gegenüber eGFP-transfizierten Tieren (1142 U/g ± 220) ergab die MPO-Messung von Gewebeproben aus der AAR VEGF- (289 U/g ± 129) und eNOS S1177D-therapierter (254 U/g ± 112) Tiere signifikant geringere Werte (*p < 0.05) (Abb. 13).

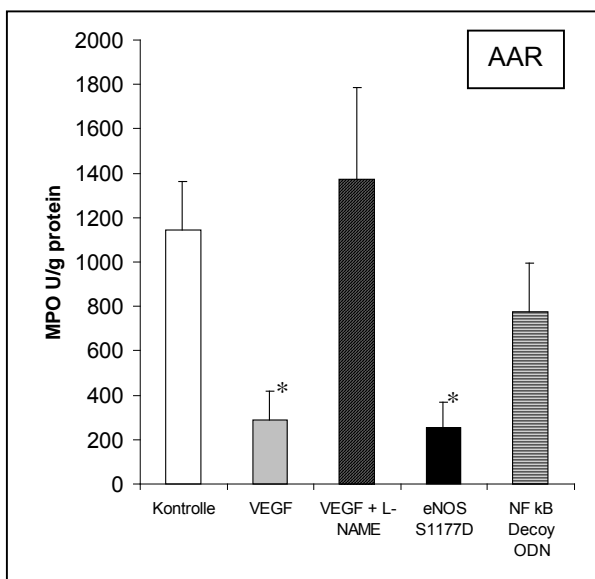


Abbildung 13

MPO-Messung der AAR behandelter/unbehandelter Tiere

Gleiches gilt für Gewebe aus dem Infarktareal (Abb. 14), wobei sich hier in den einzelnen Versuchsgruppen (n = 8) eine deutlich höhere MPO-Aktivität zeigte, als in der AAR. Die Applikation von NFκB decoy ODN machte sich in beiden Herzarealen (AAR / Infarkt) mit deutlich verringerter MPO-Anreicherung (776 U/g ± 220 / 1050 U/g

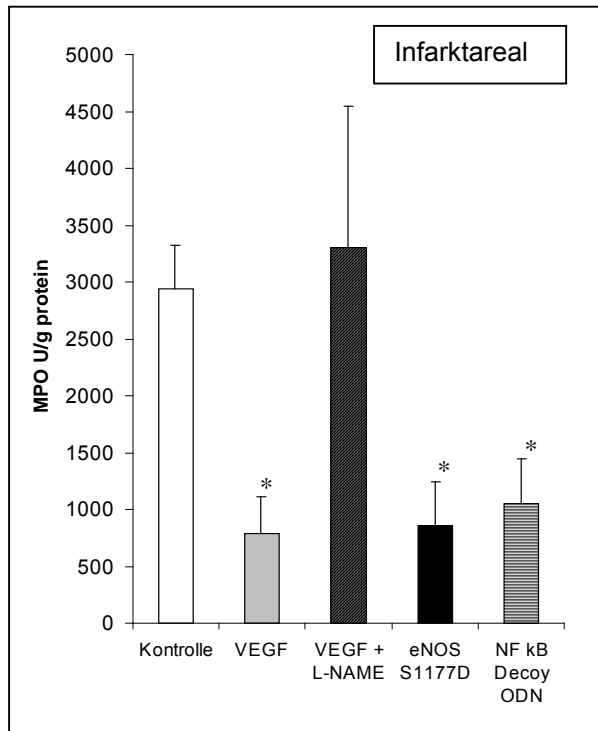


Abbildung 14

MPO-Messung des Infarktareals behandelte/unbehandelte Tiere

± 396) gegenüber der Kontrollgruppe (1142 U/g ± 220 / 2940 U/g ± 388) bemerkbar, erreichte jedoch nur für die AAR signifikante Werte (*p < 0.05). Die Retroinfusion von VEGF mit zusätzlicher Applikation von L-NAME äußerte sich gegenüber der scheintransfuzierten Kontrollgruppe in einer leichten Zunahme der MPO-Aktivität in der AAR (1375 U/g ± 411) sowie im Infarktareal (3299 U/g ± 1250), jedoch ohne signifikantes Niveau zu erreichen.

3.6 Infarktgröße

Zur Infarktgrößenbestimmung erfolgte - in oben geschilderter Weise - 24 Stunden nach Ischämie die Negativfärbung des Gewebes der *Region of Interest* mit Methylenblau und eine Lebendgegenfärbung mit Tetrazoliumrot. Die Ausdehnung des Infarktes wurde als Anteil der AAR angegeben. Dabei zeigte sich in der Gruppe VEGF-behandelte Tiere (41.2 % ± 5.0, n = 8) gegenüber der Kontrollgruppe (67.4 % ± 6.0, n = 8) ein signifikant kleineres Infarkt / AAR-Verhältnis (*p < 0.05). Ein Effekt,

der in der Gruppe VEGF und L-NAME koapplizierter Tiere weitestgehend aufgehoben war: bei diesen Versuchstieren ergab sich eine der Kontrollgruppe ähnliche Infarktausdehnung über die AAR ($63.2 \% \pm 4.0$, $n = 8$). Mit der Referenzgruppe verglichen deutlich geringere Werte ergaben sich für das Kollektiv eNOS S1177D- ($38.7 \% \pm 4.4$, $n = 8$) und NF κ B decoy ODN-behandelter Tiere ($37.0 \% \pm 5.0$, $n = 8$). Die unterschiedliche Infarktausdehnung beider Gruppen gegenüber den Kontrolltieren erreichte signifikantes Niveau ($*p < 0.005$) (Abb.15).

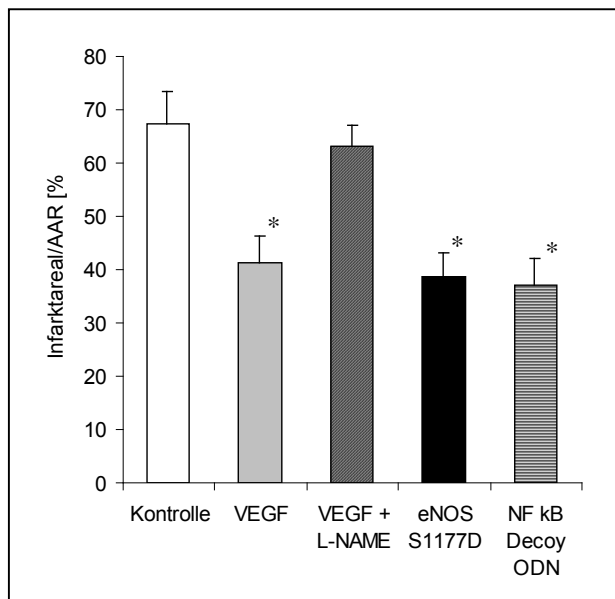


Abbildung 15

Infarktgrößenverhältnis zur AAR der einzelnen Gruppen

Die Ausdehnung der AAR wurde ins Verhältnis zum linken Ventrikel (LV) gesetzt. Gegenüber der Kontrollgruppe ($48.7 \% \pm 2.3$, $n = 8$) ergaben sich für die Größe der

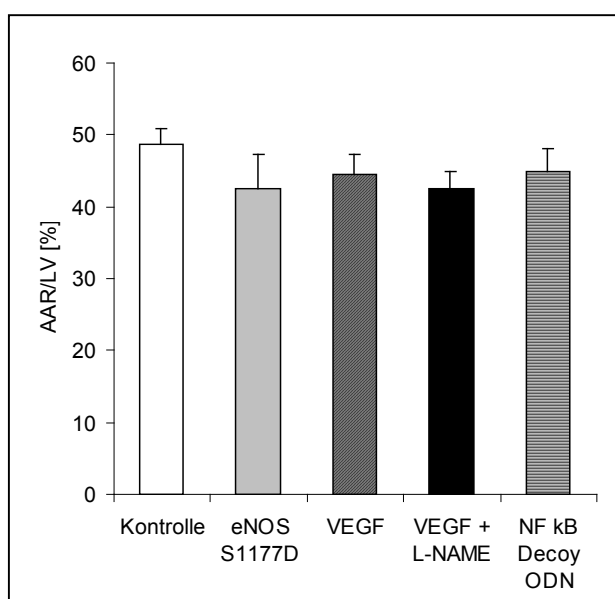


Abbildung 16

AAR-Größenverhältnis zum linken Ventrikel (LV)

AAR der einzelnen Gruppen (n = 8) unwesentlich verschiedene Werte ohne signifikanten Unterschied (Abb. 16).

3.7 Lokale Myokardfunktion

Die Werte für die subendokardiale Segmentverkürzung (SES) wurden - in oben geschilderter Weise - im Infarktareal, in der AAR sowie im, durch die RCX perfundierten Kontrollareal gemessen und berechnet. Die jeweiligen Ergebnisse wurden zur Segmentverkürzung des Kontrollareals ins Verhältnis gesetzt und anteilig angegeben.

Die Messungen erfolgten in Ruhefrequenz der Herzen sowie Schrittmacher induziert bei 100, 120, 140 und 150 Schlägen pro Minute.

Dabei ergaben sich im Infarktareal für die Gruppen (n = 8) der eNOS S1177D- sowie VEGF-transfizierten Tiere gegenüber dem Kontrollkollektiv deutlich höhere Segmentverkürzungswerte (Abb. 17). Während Ruhe, bei 120, 140 und 150 Schlägen pro Minute erreichte der Unterschied in beiden Gruppen gegenüber der Referenz scheinbehandelter Tiere signifikantes Niveau (*p < 0.05).

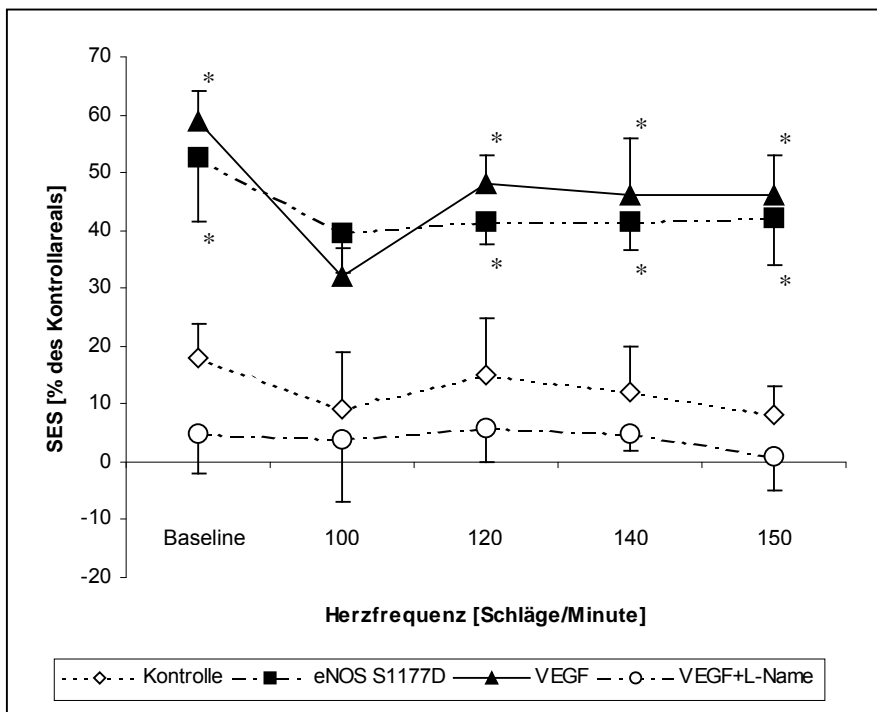


Abbildung 17

Segmentverkürzung der einzelnen Gruppen im Infarktareal

Im Kollektiv VEGF- und L-NAME-kotransfizierter Versuchstiere zeigte sich eine nicht signifikant verringerte lokale Myokardfunktion gegenüber der Kontrollgruppe. Unter Pacing weiter abnehmend, waren im Infarktareal scheinbehandelter Tiere unter

Ruhebedingungen nur mehr $18 \% \pm 6$ der Myokardfunktion des RCX perfundierten Referenzareals festzustellen. Eine etwas stärkere Einschränkung der Myokardfunktion im Infarktareal zeigte sich in der Gruppe VEGF- und L-NAME-kotransfizierter Tiere: hier betragen die Werte für die Segmentverkürzung im Verhältnis zum Kontrollareal maximal $6 \% \pm 6$. Im Gegensatz dazu erreichte die Segmentverkürzung in den Gruppen VEGF- und eNOS S1177D-behandelter Tiere $32 \% \pm 5$ und $59 \% \pm 5$ der Werte des Kontrollareals.

Die lokale Kontraktilität der eNOS S1177D- und VEGF-Gruppen zeigte in der AAR hingegen keinen signifikanten Unterschied zum Kontrollkollektiv (Abb. 18). Die

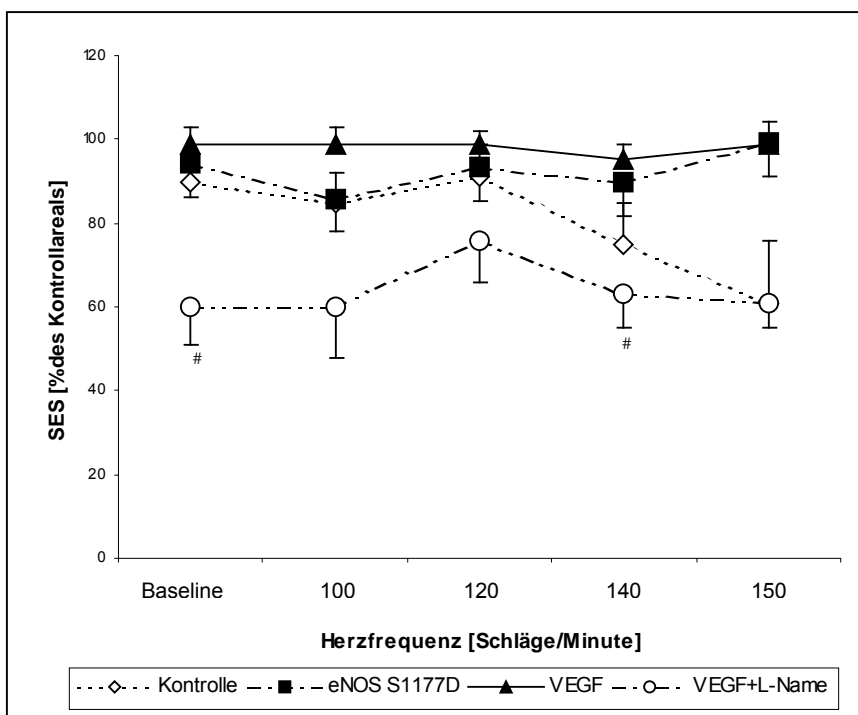


Abbildung 18

Segmentverkürzung der einzelnen Gruppen in der AAR

Myokardfunktion in der AAR VEGF behandelte Tiere erreichte die Myokardfunktion des RCX perfundierten Referenzareals sowohl in Ruhe ($99 \% \pm 4$), als auch unter Pacing ($95 \% \pm 8$ bis $99 \% \pm 12$) zu fast 100%. Ähnliches gilt für die Gruppe eNOS S1177D-transfizierter Tiere: hier schwankten die Werte für die Segmentverkürzung im Verhältnis zu denen des Kontrollareals zwischen $86 \% \pm 8$ und $99 \% \pm 8$. Lediglich die mit VEGF und L-NAME kotransfizierten Versuchstiere wiesen gegenüber den übrigen Gruppen in der AAR eine deutlich verringerte Myokardfunktion auf. Die Segmentverkürzung betrug hier im Verhältnis zum Referenzareal $60 \% \pm 12$ bis $76 \% \pm 10$ und erreichte im Vergleich mit der Gruppe VEGF behandelte Tiere in Ruhe und unter Pacing mit 140 Schlägen pro Minute signifikantes Niveau ($\#p < 0.05$).

3.8 Globale Myokardfunktion

Zur Beurteilung der globalen Myokardfunktion im Verlauf wurde der LVEDP vor Ischämie sowie 24 Stunden nach Reperfusion gemessen (Abb. 19). Für die Tiere der Kontrollgruppe (n = 8) ergab sich dabei eine signifikante Steigerung des LVEDP von anfänglich $12.3 \text{ mmHg} \pm 0.6$ auf $15.4 \text{ mmHg} \pm 1.0$ postischämisch. Ähnlich im

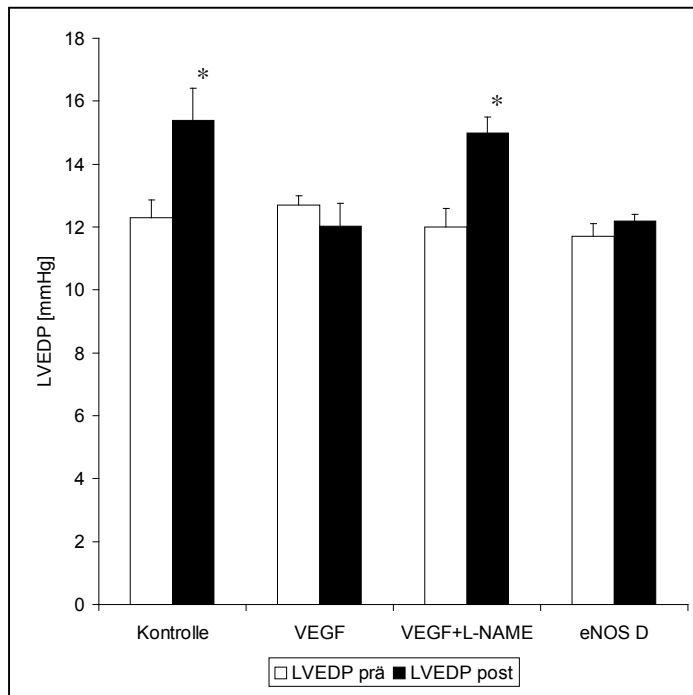


Abbildung 19

LVEDP vor (prä) Ischämie und 24 Stunden nach Reperfusion (post)

Kollektiv VEGF und L-NAME-kotransfizierter Tiere (n = 8): hier stieg der enddiastolische Druck des linken Ventrikels von $12.0 \text{ mmHg} \pm 0.6$ vor Ischämie auf $15.0 \text{ mmHg} \pm 0.5$ am Versuchsende. Auch in dieser Gruppe erreichte der Unterschied zwischen prä- und postischämischen Druckverhältnissen im linken Ventrikel signifikantes Niveau (*p < 0,05). Der LVEDP bei VEGF beziehungsweise eNOS S1177D behandelten Tieren (n = 8) änderte sich 24 Stunden nach Reperfusion ($12.0 \text{ mmHg} \pm 0.7$ bzw. $12.2 \text{ mmHg} \pm 0.2$) gegenüber den Ausgangswerten ($12.7 \text{ mmHg} \pm 0.3$ bzw. $11.7 \text{ mmHg} \pm 0.4$) hingegen nur geringfügig und nicht signifikant.

Als weiterer Indikator für die globale Myokardfunktion wurde die erste Ableitung des linksventrikulären Drucks berechnet. Der dabei während der Systole auftretende maximale Wert ($dLVP/dt_{\max}$) gibt - wie eingangs beschrieben - Aufschluss über die

Kontraktilität des Herzmuskels. Die Messung erfolgte 24 Stunden nach Reperfusion in Ruhe sowie Schrittmacher induziert bei 100, 120, 140 und 150 Herzschlägen pro Minute (Abb. 20). In der Gruppe VEGF beziehungsweise eNOS S1177D behandelte Tiere zeigte sich gegenüber dem Kontrollkollektiv eine durchschnittlich auf das 1.6-beziehungsweise 1.4-fache erhöhte systolische Kontraktilität des linken Ventrikels. Dabei erreichte der Unterschied der dLVP/dt-Werte weder der VEGF-Gruppe ($n = 8$, $p = 0.058$), noch des eNOS-Kollektivs ($n = 8$, $p = 0.069$) gegenüber den

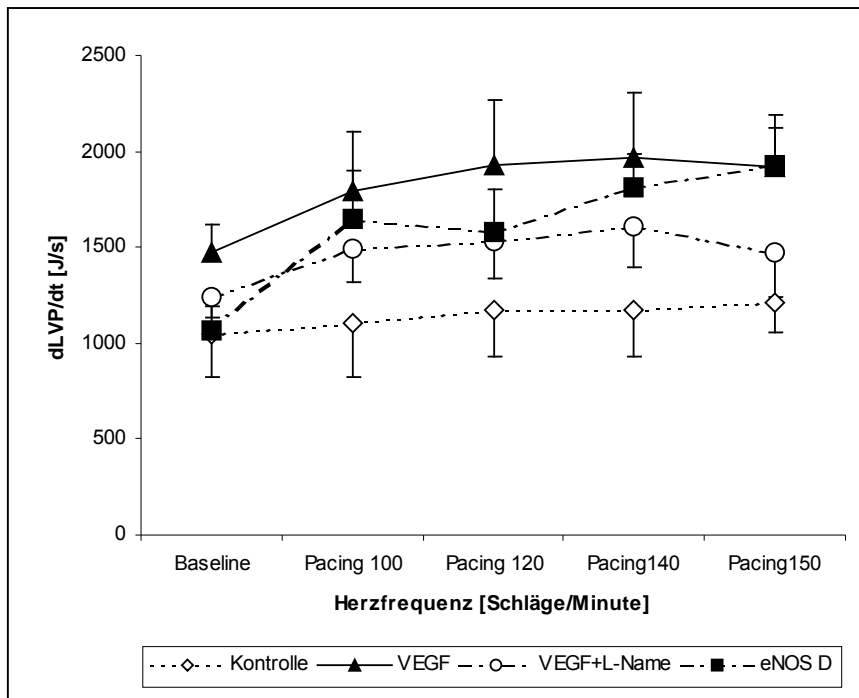


Abbildung 20

Kontraktilitätsbestimmung in Ruhe und unter Pacing

Referenztieren ($n = 8$) signifikantes Niveau. Der Effekt der Kontraktilitätssteigerung nach VEGF-Transfektion wurde durch gleichzeitige Behandlung mit L-NAME deutlich verringert.

Ein drittes Maß für die linksventrikuläre Funktion stellt die diastolische Relaxation dar. Diese kann mit Hilfe des Minimalwertes des dLVP/dt während der Diastole beschrieben werden ($dLVP/dt_{min}$). Die Messung erfolgte ebenfalls 24 Stunden nach Reperfusion in Ruhe und unter Pacing von 100, 120 und 140 Herzschlägen pro Minute. Verglichen mit der Kontrollgruppe ($n = 8$) ergaben die Messungen für die eNOS S1177D-transfizierten Tiere ($n = 8$) deutlich höhere Werte, die bei einer Herzfrequenz von 120 und 140 Schlägen pro Minute signifikantes Niveau erreichten ($*p < 0.05$). Eine deutliche Zunahme des dLVP/dt gegenüber den Tieren aus der Referenzgruppe zeichnete sich im Kollektiv der VEGF behandelten Versuchstiere ($n = 8$) erst bei einer Herzfrequenz von 100 Schlägen pro Minute und mehr ab. Durch

Kotransfektion L-NAME kodierender DNA wurde die unter alleiniger Applikation von VEGF gegenüber der Kontrolltiere beobachtete Steigerung der Relaxation deutlich eingeschränkt (Abb. 21)

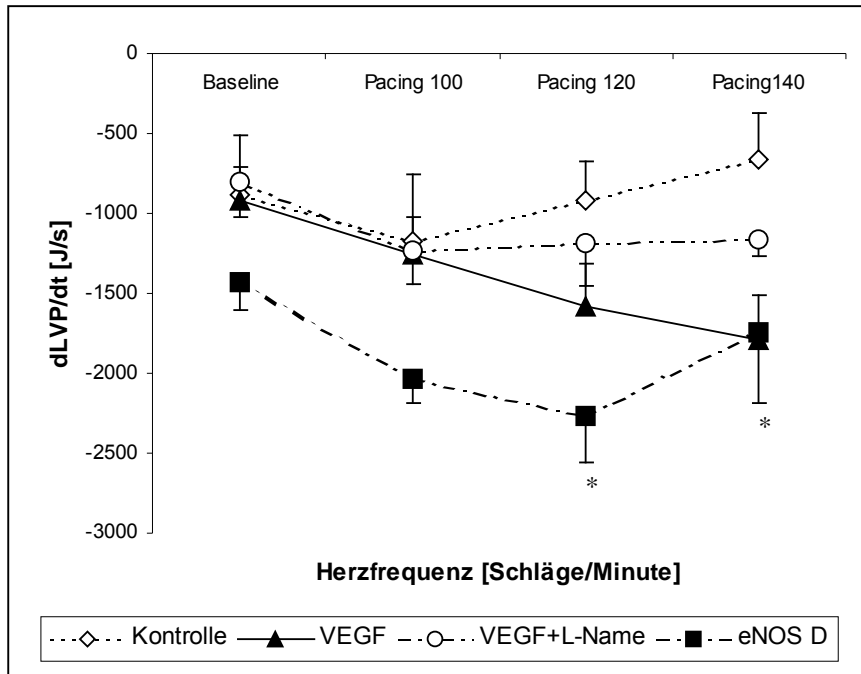


Abbildung 21

Relaxationbestimmung
in Ruhe und unter
Pacing

4 Diskussion

Nach länger dauerndem kompletten Verschluss der LAD kommt es zur Infarktbildung im Verschlussbereich. Im Rahmen eines akuten Ischämie-Reperfusionsschadens zeigt sich in unserer Studie unmittelbar nach einstündiger LAD-Okklusion eine AAR, die etwa 40 % des linksventrikulären Myokards einnimmt. Der Infarktanteil innerhalb der AAR nimmt zu und beträgt 24 Stunden nach Occlusion etw 55% der AAR. Dabei wird die regionale Pumpfunktion bis auf 5-10% der Funktion des RCX-Kontrollareals deutlich eingeschränkt (→Abb. 18/19). Außerdem kommt es zu einer postischämischen Inflammationsreaktion, messbar im MPO-Anstieg (→Abb. 14/15) sowie der NF κ B-Aktivierung (→Abb. 11).

Die Applikation von cDNA mit erfolgreicher Transfektion des Koronargefäßendothels bestätigte sich nach retrograder Infusion von pCMV-eGFP-Konstrukt tragenden Liposomen sowie im Expressionsnachweis durch Immunoblotting (→Abb. 7). Nach Applikation von VEGF war gegenüber der Kontrollgruppe eine deutlich verringerte Akkumulation der Leukozyten sowohl im Infarktareal als auch der Area at Risk zu erkennen. Gleiches zeigte sich nach eNOS S1177D-Transfektion. Durch gleichzeitige Gabe von VEGF und L-NAME - einem unspezifischem NOS-Inhibitor - konnte der Effekt verminderter Leukozytenanreicherung unter alleiniger VEGF-Gabe wieder aufgehoben werden, was die Beteiligung der NO-Synthase am Leukozyteninflux aus dem Gefäßbett ins infarzierte Gewebe vermuten lässt. Dies bestätigte sich durch eNOS S1177D Transfektion.

Wesentliche Bedeutung kommt dabei dem inflammatorischen Transkriptionsfaktor NF κ B zu, wie sich nach Injektion NF κ B decoy Oligonukleotid tragender Liposomen zeigt. Durch mittels decoy ODN gezielte NF κ B Blockierung konnte eine der VEGF- und eNOS S1177D-Gruppe nahezu identisch herabgesetzte subakute Leukozytenakkumulation im Infarktareal, sowie tendenziell in der AAR erreicht werden (→Abb. 15).

Unter Applikation von VEGF oder eNOS S1177D war der Infarkt relativ zur AAR fast 30% kleiner als in der Kontrollgruppe. Hieraus wird ersichtlich, dass ein enger Zusammenhang zwischen einer Transfektion mit VEGF und der Einschränkung der Infarktgröße besteht, der nach unseren Befunden durch Beteiligung von eNOS vermittelt wird: konstitutiv aktive eNOS reduzierte die Infarktgröße gegenüber der Kontrollgruppe deutlich, solange nicht der eNOS-Blocker L-NAME ko-appliziert

wurde. Die Rolle der Inflammation für die Infarktausbreitung wurde unabhängig davon mittels einer NF κ B spezifischen Inhibition (durch Decoy-Oligonucleotide) gezeigt.

Parallele Ergebnisse fanden sich für die regionale und globale Myokardfunktion: Sowohl unter Ruhebedingungen, als auch unter Pacing ergab sich für das Infarktareal unter der Wirkung von VEGF oder eNOS S1177D eine größere Segmentverkürzung als im Kollektiv der Kontrolltiere. Lediglich unter Zugabe von L-NAME konnte nach VEGF-Applikation eine im Vergleich zu den unbehandelten Tieren verminderte Segmentverkürzung im Infarktgebiet festgestellt werden. (→Abb. 18). Die Messung des linksventrikulären enddiastolischen Drucks als Parameter für die globale Myokardfunktion ergab einen postischämischen Anstieg in der Kontrollgruppe, der nach Transfektion mit VEGF oder eNOS D ausblieb, es sei denn, L-NAME wurde ko-appliziert (→Abb. 20). Daraus ist ersichtlich, dass die Applikation von VEGF nicht nur die regionale, sondern auch die daraus resultierende globale Pumpfunktionsverschlechterung nach Ischämie und Reperfusion antagonisieren kann.

Nach Applikation von VEGF oder eNOS cDNA konnten die Infarktgröße sowie die postischämische Inflammation verringert und die regionale Pumpfunktion verbessert werden. Gemeinsamer Nenner beider Therapeutika ist die Förderung der Stickoxidbildung.

Nachdem nun der Reperfusionsschaden zu einem Teil auf inflammatorische Prozesse zurückzuführen ist, hierbei die Leukozytenadhäsion an die Gefäßwand postkapillärer Venolen im Mittelpunkt steht und dieser Vorgang durch Applikation von VEGF eingeschränkt werden kann, liegt die Transfektion der postkapillären Gefäßwandzellen mit für VEGF-kodierender DNA als weitergehende Therapie nach Revaskularisation akut verschlossener Koronarien nahe. Aus diesem Grunde wurde bei vorliegendem Versuchsaufbau die Methode der selektiven druckregulierten Retroinfusion gewählt. Diese Methode erlaubt ein auf das postkapilliäre Gefäßsystem des infarzierten Myokardareals beschränkte Applikation des Therapeutikums. Im Gegensatz zur systemischen Verabreichung zeigte sich der Vorteil der lokalen Anwendung bereits bei gezielter koronarer Injektion des Wachstumsfaktors. Hierbei kam es zu einem signifikant verbesserten Blutfluss im zuvor ischämischen Myokard (103).

Ein weiterer Vorteil der selektiven Retroinfusion liegt in der Möglichkeit der druckregulierten Applikation des Infusats. Auf diese Weise können Veränderungen der Gefäßwand wie Verletzungen oder sich daraus ergebende Ödeme im betreffenden Myokardareal während Infusion vermieden werden.

Zur Reduktion des Reperfusionsschadens wurde VEGF bisher aufgrund seiner Nebenwirkungen kaum eingesetzt. Bei Angiogeneseversuchen in ischämischen Arealen kam es unter Applikation des VEGF-Proteins zu ausgeprägten systemischen Kreislaufwirkungen wie vor allem der Hypotension (42;103). Während der Applikation von VEGF freigesetztes NO bewirkt über Vasodilatation und somit über den sinkenden systemischen Widerstand eine Blutdrucksenkung. Allerdings zeigte sich die gezielte intrakoronare Applikation des VEGF-Proteins im Vergleich zur intravenösen, systemischen Gabe weniger druckdepressiv (103). Eine geringgradige Blutdrucksenkung, etwa 5 mmHg nach Interventionsbeginn, war auch in unseren Versuchen bei VEGF-cDNA-Transfektion vorfindlich. Konzeptionell erscheint die Antagonisierung der VEGF-bedingten Hypotension durch L-NAME (103) allerdings hinsichtlich der beabsichtigten Wirkung auf Inflammation und Endothelprotektion obsolet.

Eine weitere Nebenwirkung der VEGF-Applikation ist in der Gefäßpermeabilität steigernden Wirkung (4) des Wachstumsfaktors (syn.: vascular permeability factor) begründet, welche zur lokalen Gewebeödembildung am Applikationsort führt (96). Studien hierzu wiesen einen kausalen Zusammenhang zwischen Ödembildung und vorausgegangener VEGF-Applikation nach (47). Demgegenüber blieb jedoch bei, mit einer VEGF enthaltenden Kardioplegielösung perfundierten Rattenherzen eine Wasseransammlung in der koronaren Zirkumferenz aus (73). Eine Erklärung hierfür wurde in der niedrigen VEGF-Dosis gesucht, bei der offensichtlich die Permeabilität der Gefäßwände unverändert bleibt (96). Ab welcher Konzentration von VEGF es zu einer eventuellen Ödembildung kommt und in wie weit diese die Mikrozirkulation des Myokards beeinträchtigt, muss sich noch zeigen.

VEGF wird schon seit längerem, auch in klinischen Studien, als Therapeutikum bei ischämischen Erkrankungen eingesetzt (47). Bisher zielte dieser Ansatz jedoch überwiegend auf den angiogenetischen Effekt des Wachstumsfaktors ab. So suchte man auch am Herzen mit der Applikation von VEGF als Protein oder des dafür

kodierenden Genoms die Angiogenese in ischämischen Arealen zu verstärken (103;106).

Besondere Bedeutung hinsichtlich der Angiogenese kommt der Proliferation und Migration von Endothelzellen zu. Beide Vorgänge stehen unter dem Einfluss von VEGF. In vitro war eine vermehrte Proliferation und Migration von HUVE-Zellen unter VEGF-Stimulation nachweisbar (20;94). Die letztendliche Bildung von Kapillar ähnlichen Strukturen (tube formation) dient als Surrogatparameter für die Angiogenese. Bildung von primitiven Gefäßen aus Endothelzellen nach deren Migration wird ebenso durch VEGF-Freisetzung gesteuert (88). Die dabei zu Verfügung stehenden Endothelzellen werden aber nicht nur von bereits bestehenden Gefäßen zur Verfügung gestellt. Auch bei der Vaskulogenese kommt VEGF entscheidende Bedeutung zu. Es konnte zunächst im Tierversuch gezeigt werden, dass die Zugabe von rekombinantem humanen VEGF₁₆₅ zu signifikanter Erhöhung der aus dem Knochenmark freigesetzter EPCs und letztendlich der zirkulierenden Endothelzellen führt (1). Präklinische Studien bei an pAVK oder Angina Pectoris leidenden Patienten zeigten dann gleiches Ergebnis. Bei der Direktinjektion von VEGF₁₆₅ Plasmid DNA in ischämisches Myokard therapieresistenter Angina (III/IV)-Patienten (51) zeigte sich eine Erhöhung des VEGF-Blutplasmaspiegels auf das 2.9-fache des Ausgangswertes innerhalb der ersten Woche nach Applikation. Auch im Verlauf der folgenden 3 Wochen blieb dieser erhöht. Entsprechend zeigte sich nach direkter intramyokardialer bzw. intramuskulärer Injektion von VEGF kodierender DNA eine Erhöhung der zirkulierenden aus dem Knochenmark freigesetzten EPCs mit Differenzierung zu ECs (50;51). Bei intramyokardialem VEGF-Gen-Transfer (250µg VEGF₁₆₅ Plasmid DNA) stieg die Anzahl der zirkulierenden EPCs zwischen der ersten und dritten Woche nach Applikation auf 3-3.5-fache Werte und blieb bis 3 Monate post injectionem über den Baseline-Werten (51). Unter physiologischen Bedingungen kommt es nach akutem Myokardinfarkt zu einem maximalen Anstieg des peripher messbaren VEGF-Spiegels auf lediglich etwa 1.5-fache Werte der Norm und subsequenten Anstieg der peripher zirkulierenden EPCs am siebten Tag mit folgender Abnahme (108).

Die bei der Angio- und Vaskulogenese nach VEGF-Applikation der NO-Synthase und dessen Produkt NO zukommende Rolle zeigte sich nach Beimpfung von Kaninchenkorneazellen in vivo mit VEGF und vorheriger Applikation von L-NAME. Dabei war im Vergleich zur Kontrollgruppe nach drei bis vier Tagen nur ein stark

eingeschränkter angiogenetischer Effekt feststellbar (126). Dies lässt den Schluss zu, dass bei der durch VEGF induzierten Neovaskularisation wiederum NO eine zentrale Position einnimmt.

Eine direkte Wirkung von VEGF wurde lange Zeit ausschließlich für Endothelzellen angenommen. Allerdings konnten VEGF-Rezeptoren auch auf Kardiomyozyten von Ratten (114) und folgend eine vermehrte Mitose unter Kardiomyozyten nach intrakardialer Injektion von VEGF-DNA-Plasmid bei Schweinen nachgewiesen werden (67). Auch bei der Migration von glatten Muskelzellen, wie sie in Gefäßwänden gefunden werden, kommt VEGF chemotaktische Wirkung zu (38).

So erweist sich VEGF auf vielfache Weise kardioprotektiv. Aufgrund seiner angiogenetischen und vaskulogenetischen Wirkung wird das Nährstoffangebot im ischämischen Areal wiederhergestellt; seine mitotische Wirkung auf Kardiomyozyten trägt zum Remodelling des Myokards bei.

Um die Versuchsanordnung von diesem proangiogenetischen und mitotischen Effekt des VEGFs unbeeinflusst zu lassen, wurde in vorliegender Studie der postinterventionelle Zeitraum zwischen Reperfusion und Parameter-Messung auf 24 Stunden begrenzt. Auf diese Weise konnte die Wirkung des VEGF auf die eNOS-Aktivierung beziehungsweise die NF κ B-Hemmung isoliert beobachtet werden.

Gut belegt ist die eNOS-Aktivierung durch VEGF. Wie eingangs erwähnt sind hier im Eigentlichen drei Signalwege zu nennen. Die eNOS-Phosphorylierung über Erhöhung des intrazellulären IP₃- sowie Ca²⁺-Spiegels ist vorübergehend und dauert mit etwa 5 Minuten nach VEGF-Rezeptor-Kontakt nur kurz an. Dabei löst der entstehende Ca²⁺/Calmodulin (CaM)-Komplex die inhibierende Bindung zwischen eNOS und Caveolin, was die Enzymaktivierung des eNOS erlaubt (12;104). Anhaltendere Wirkung hat die eNOS-Aktivierung über die verzögerten Signalwege der AKT-Phosphorylierung von eNOS am Serinrest 1177 (20;21;34;88). Eine deutlich gesteigerte langandauernde eNOS-Phosphorylierung und damit -Aktivierung war auch in vorliegenden Ergebnissen (→Abb. 8) nach VEGF-Gabe nachweislich. Nebeneffekt und bei klinischer Anwendung durchaus von Vorteil erweist sich die AKT-abhängige Angiogenese. Wie bereits in vitro gezeigt werden konnte kommt es in ischämischen Arealen nach AKT-Aktivierung zu vermehrter Gefäßneubildung (66). Reperfusionsversuche an eNOS-Knockout-Mäusen zeigten eine vermehrte PMN-Adhäsion im Infarktgebiet und Zunahme des Infarktareals (48;107). Dieses Ergebnis

war jedoch bei zwei unterschiedlichen Linien von eNOS-Knockout Mäusen nicht einheitlich. Reperusionsversuche an UNC eNOS^{-/-} Mäusen zeigten keine wesentliche Veränderung gegenüber Wildtyp-Mäusen. Es konnte bei dieser Art von eNOS^{-/-} Mäusen jedoch eine kompensatorische iNOS-Induktion nachgewiesen werden, welche ersatzweise zu Erhöhung der NO-Produktion führte (107).

Die endothelprotektive Wirkung von NO ist mit der Hemmung inflammatorischer Prozesse eng verknüpft. Versuche an HSVEC-Kulturen nach Zytokin-Stimulation (IL-1a/b, IL-4, TNF α und bakterielle Lipopolysaccharide) zeigten eine verringerte Expression von VCAM-1 unter NO-Einfluss. Dies geschah cGMP-unabhängig und wurde gefolgt von einer verringerten Monozytenadhäsion. In gleicher Weise kam es zu einer Inhibition von E-Selectin, ICAM-1 und IL-6 und -8 (18). An HUVEC-Kulturen zeigte sich außerdem, dass es durch NO-Applikation zu einer verminderten Expression von MCP-1 mRNA kommt. Eine Erhöhung des endothelialen cGMP blieb dabei wirkungslos (125). Die genannten Beispiele implizieren jeweils eine Hemmung des zentralen inflammatorischen Transkriptionsfaktors NF κ B, der in unserer Studie in vivo nach Transfektion aktiver eNOS (eNOS 11177D) gehemmt war (\rightarrow Abb. 12/13). Dadurch wurde, wie anhand der in vitro Befunde vermutet, tatsächlich eine Verringerung der postinflammatorischen Reaktion bewirkt.

Die PMN-Adhäsion und -Diapedese durch das Endothel mit nachfolgender Ausschüttung von Radikalen und Zerstörung der Endothelintegrität, stellt einen wesentlichen Bestandteil des endothelialen Reperfusionsschadens dar. Die dabei erfolgte Ausschüttung von ROIs wirkt wiederum chemotaktisch für erneute PMN-Adhäsion.

Eine Wirkweise des NO ist dabei seine Funktion als Radikal-Scavenger. NO vermag mit hoher Affinität Radikale wie Superoxid zu Peroxynitrit zu neutralisieren (45;87). Es konnte die ROI detoxifizierende Eigenschaft von NO in vitro nachgewiesen werden. Die Konzentrationen von Superoxid (O_2^-), gebildet von aktivierten PMNs, und NO waren dabei in durch Chemokine stimulierten Zellkulturen indirekt proportional. So kann durch die Anwesenheit von NO die Konzentrationen von O_2^- gesenkt und deren auf das Endothel toxische sowie für PMN chemotaktische Wirkung nach Reperfusion eingeschränkt werden (55). Eine NO-Inhibition durch Blockade der NOS schlug sich in vermehrter PMN-Adhäsion (77) und Apoptose von Kardiomyozyten nach Reperfusion (17) nieder. Substrat für die NO-Synthasen ist L-Arginin. Wurde die NO-Bildung selektiv eingeschränkt durch Verabreichung des

Enantiomers D-Arginin trat bei Reperusionsversuchen an Katzenherzen eine Zunahme des Myokardschadens bei endothelialer Dysfunktion mit Myokardnekrosen auf, sowie eine vermehrte Konzentration von MPO, als Marker für PMN-Anreicherung und eine fehlende koronare Relaxation (122).

Zentrale Rolle in der NO abhängigen PMN-Adhäsion kommt dabei, wie auch in vorliegender Studie gezeigt werden konnte, NF κ B zu. Nach NF κ B-abhängiger Expression der entsprechenden Oberflächenmoleküle und folgender Anhaftung der Leukozyten kommt es zu einer Freisetzung von Zytokinen und Radikalen, die wiederum zu einer gesteigerten NF κ B-Aktivierung führen. Es muss jedoch angemerkt werden, dass eine PMN-Adhäsion nicht ausschließlich durch NF κ B-Aktivierung induziert wird. Bei in vitro Reperusionsversuchen auf HUVEC-Zellkulturen kam es zu einem biphasischen Anstieg der Neutrophilenadhäsion an Endothelzellen: eine frühe NF κ B-unabhängige Phase-I-Reaktion innerhalb der ersten 30 Minuten nach Reperfusion ist von einer späten Phase-II-Reaktion nach 240 Minuten Reperfusion zu unterscheiden. Zu letztgenanntem Zeitpunkt konnte eine vermehrt NF κ B-abhängige Expression von Oberflächenmolekülen nachgewiesen werden (46).

Gleichzeitig ist auch die NF κ B-Aktivierung nicht ausschließlich auf eine PMN-Adhäsion mit nachfolgender Zytokinausschüttung zurückzuführen. Der aktivierte Transkriptionsfaktor konnte nämlich auch in ausschliesslich mit Pufferlösung perfundierten Herzen beobachtet werden (62).

Da die Aktivierung von NF κ B durch Zytokine unter Zugabe von Radikalfängern, wie beispielsweise NO, stark reduziert werden kann, ist von einer redoxsensiblen Aktivierung auf oxidativen Stress hin auszugehen (105). NO scheint dabei als Antioxidanz die NF κ B-Aktivierung durch Stabilisierung des Inhibitor Komplexes I κ B (90) zu modulieren. Obwohl dieser Zusammenhang bereits Gegenstand früherer Studien war (64), ist es bislang allerdings noch nicht gelungen, den dabei zugrunde liegenden Mechanismus endgültig zu erklären. Es konnte lediglich eine dosis abhängige Wirkung des NO auf die Aktivierung des NF κ B nachgewiesen werden: bei geringer bis mässiger Konzentration des NO im Gewebe ist eine hemmende und bei hohen NO-Konzentrationen eine fördernde Wirkung auf die NF κ B-Aktivierung zu erkennen (52). In in vitro- Modellen konnte dies auf die Peroxynitritbildung bei hohen NO-Konzentrationen und dessen aktivierende Wirkung auf das NF κ B zurückgeführt werden (78). Hohe NO-Dosen führen zur Reaktion mit Superoxid (5) und es entsteht Peroxynitrit (= ONOO $^-$). Neben der NF κ B aktivierenden Wirkung ist dessen

schädigender Einfluss auf biologische Strukturen, wie beispielsweise die Inaktivierung der Na-K-ATPase, bereits bekannt (39). Speziell bei der Reperfusion ischämischer Rattenherzen, zeigte sich die, durch Peroxynitrit aktivierte Metalloprotease-2 als Mediator des postischämischen Reperfusionsschadens (119). Dabei kam es nach Applikation von ONOO^- zu einer Vasokonstriktion der Koronararterien und einer folglich verringerten Herzarbeit. Perfundiert wurde das isolierte Herz mit einer Krebs-Henseleit-Pufferlösung. Diesem Ergebnis widersprach jedoch, bei ähnlichem Versuchsprotokoll der Vergleich zu mit Blut perfundierten Herzen. Peroxynitrit in Kombination mit Blut als Perfusat erwies sich dabei im Gegensatz zur Verwendung der Pufferlösung bei identischen Konzentrationen ($1\text{-}30\mu\text{M ONOO}^-$) durchaus als kardioprotektiv nach Reperfusion. Es konnte eine signifikante Abnahme des nekrotischen Zelluntergangs, sowie eine Verringerung der PMN-Adhäsion beobachtet werden (74). Ausserdem bewies ONOO^- unter in vivo Bedingungen ebenfalls durchaus kardioprotektive, wenn auch dosisabhängige Wirkung bei Ischämie-Reperfusion-Versuchen. Dies ist auf die Bildung von NO-Gruppen bei der Interaktion des Peroxynitrits vor allem mit Albumin zurückzuführen (86). In vivo ist somit also eine höhere Dosis an ONOO^- tolerierbar als in isolierten Herzen, und es kommt somit erst bei hohen Konzentrationen von ONOO^- beziehungsweise NO zu toxischen Nebenwirkungen auf umliegendes biologisches Gewebe, wie Myozyten. Den vorliegenden Messergebnissen nach VEGF- oder eNOS D-Applikation zufolge, wurden diese Schwellwerte offensichtlich nicht überschritten und es überwog bei weitem der kardioprotektive Einfluss der NO-Freisetzung. Ein Grund hierfür sind unter Umständen im Vergleich zur unreguliert ablaufenden iNOS, die geringeren Bildungsraten von NO durch eNOS. In vorliegendem Versuchsaufbau führte die Transfektionseffizienz mit eNOS kodierender DNA lediglich zu einer Konzentrationserhöhung der eNOS-Expression auf das 2-2.5-fache der Norm.

Eine weitere Wirkung kommt NO bei der Regulation des Blutflusses im Gefäßbett zu. NO zeigt vasodilatatorische Wirkung und wird auf Stimuli wie ansteigende Blutflussgeschwindigkeit oder Hypoxie hin aus der Gefäßwand selbst freigesetzt (14). So kann autoregulatorisch auf den auf das Gefäßsystem einwirkenden Druck oder durch Vermehrung des zur Verfügung stehenden Blutes bei Hypoxie endothelprotektiv Einfluss genommen werden. Durch seine vasodilatatorische Wirkung nimmt NO regulatorischen Einfluss auf Mikro- und Makrozirkulation.

Inhibition der NO-Synthasen führte zu Hypertension bei erhöhtem Gefäßwiderstand und Hypoxie bei erhöhtem Sauerstoffbedarf des Gewebes (93). Unter physiologischen Bedingungen halten sich die Einflüsse des vegetativen Nervensystems auf die Gefäße und die lokale Regulation durch NO die Waage. Auf Hypoxie oder Veränderungen des Blutflusses hin, werden lokal endothelial gespeicherte Substanzen freigesetzt, welche durch NO-Bildung auf die veränderten Bedingungen lokal modulierend auf das Endothelium und somit die Gefäßweite wirken (13). Dabei entfallen 40-55 % des gesamten Gefäßwiderstandes auf große Arteriolen und kleine Arterien, deren Myozyten hauptsächlich auf NO-Stimulation reagieren (92).

Neben seiner parakrinen Wirkung ist NO aber auch an der intrazellulären Signalübertragung beteiligt. In Kardiomyozyten konnte gezeigt werden, dass NO bei der Vermittlung negativ chronotroper und negativ inotroper Wirkung von Therapeutika eine tragende Rolle zukommt (2;3). Zur Verfügung gestellt wird das NO dabei von intrazellulären NOS. Dabei ist aber nicht nur die induzierbare Variante sondern auch die endotheliale NOS zu nennen. Es konnte nachgewiesen werden, dass zum einen die eNOS nicht nur in Endothelzellen sondern auch in Kardiomyozyten exprimiert wird; zum anderen konnte gezeigt werden, dass bei fehlender iNOS zunehmend die eNOS die NO-Produktion zur intrazellulären Signaltransduktion übernimmt (3).

Entsprechend kann bei Suppression der eNOS-Aktivierung zunehmend iNOS exprimiert werden, worauf bereits angesprochene Versuche an UNC eNOS -/- Mäusen Hinweise geben. Eine Begründung hierfür könnte die Abhängigkeit der Expression der iNOS von einer vorherigen NF κ B-Aktivierung (60;72;123) sein. Dies bestätigte sich auch in der vorliegenden Versuchsanordnung beim Immunohistochemischen Nachweis des iNOS-Proteins entlang der Gefäßwände (\rightarrow Abb.9), sowie bei der anschließenden Auszählung der betroffenen Gefäße (\rightarrow Abb.10) in den einzelnen Herzarealen. Vor dem Hintergrund der VEGF induzierten NO-Freisetzung war nämlich im Gegensatz zu scheintransfizierten und VEGF + L-NAME-applizierten Tieren, ein deutlich vermindertes Auftreten von iNOS bei nur mit VEGF behandelten Tieren auffällig. Durch gezielte Aktivierung der eNOS durch Phosphorylierung mit Hilfe von Simvastatin, konnte ebenfalls bereits in anderen Versuchen eine folglich verminderte iNOS-Expression nachgewiesen werden (19). Dieser Effekt wurde bei gleichzeitiger Applikation von Simvastatin und

L-NAME nicht mehr beobachtet und läßt wiederum den Schluss auf eine NO-abhängige Inhibierung der NF κ B-Aktivierung mit folglich verringerter iNOS-Expression zu.

Vor dem Hintergrund einer verringerten NF κ B-Aktivierung nach Ischämie unter NO-Applikation ist auch die Gabe von Nitroglycerin zu diskutieren. Der Einsatz bisher beschränkt sich weitgehend auf das Koronarsyndrom und die Hypertonie. Hier steht der vaskulodilatative Effekt mit Erweiterung der Koronarien sowie die Vorlastsenkung durch Erweiterung des venösen Gefäßnetzes im Vordergrund. Grundsätzlich ist es aber auch denkbar, Nitroglycerin als NO-Donor gegen den inflammatorischen Reperfusionsschaden einzusetzen. Hinsichtlich der Dosierung ist jedoch darauf zu achten für das Gewebe toxische NO-Konzentration, wie bereits erwähnt, zu vermeiden. Ebenso muss bei sowieso gegebener Gefahr der kardialen Insuffizienz auf eine Hypotension mit reflektorischer Tachykardie und folgend myokardial erhöhtem Sauerstoffbedarf geachtet werden.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Mit Hilfe der selektiven Retroinfusion ist es möglich, nach Koronarverschluss das infarzierte Gebiet vor Reperfusion von venöser Seite her gezielt mit VEGF-DNA zu transfizieren. Mit der gezielten Transfektion mit VEGF-DNA gelang es, durch eNOS-Aktivierung die postischämische Inflammationsreaktion einzuschränken. Dadurch kam es zur Verbesserung der Mikro- und Makrozirkulation und damit zur Einschränkung des Reperfusionsschadens und somit letztendlich der Infarktausdehnung.

Die Applikation des Wachstumsfaktors VEGF ist theoretisch ein attraktives Konzept zur Reduktion des Reperfusionsschadens. Auf diese Weise können physiologische Effekte ausgenutzt werden wie die Verbesserung der Perfusion in betroffenem Areal, das Einschränken der Inflammationsreaktion, das Abfangen der im Infarktgebiet entstandenen Radikale und das Antreiben der Angiogenese im reperfundierten Areal. Vor dem klinischen Einsatz ist dabei allerdings das relativ enge therapeutische Fenster zu berücksichtigen; bei zu hoher Dosierung kann es zu Nebenwirkungen wie Hypotension, Peroxynitrit- und Gewebsödembildung kommen.

Ein lang andauernder, stetiger und dosisangepasster Release des VEGF Proteins wäre dabei eine therapeutische Zielsetzung. Um einen solchen, über die Akutphase hinaus andauernden Effekt erzielen zu können, wäre der Gentransfer eine geeignete Methode. Hierbei zu berücksichtigen ist der von Transfektion bis zur Expression des Proteins verstreichende Zeitraum, während dem und somit auch während der Akutphase von keiner Wirkung des VEGF auszugehen wäre. Insofern ist derzeit eine direkte Übersetzung der Ergebnisse in klinische Studien nicht zu erwarten, auch wenn eine Stärkung der VEGF-eNOS-Signalkaskade im Endothel sich günstig in der Situation des akuten Herzinfarkts auswirken würde. Möglicherweise gelingt diese Stärkung der VEGF-eNOS-Signalkaskade jedoch in naher Zukunft eher pharmakologisch, z.B. durch Statin-Einnahme, oder leistungsphysiologisch, z.B. durch kontrollierten Einsatz von Ausdauersportarten.

6 Abkürzungen

AMI	akuter Myokardinfarkt
%SS	prozentuale Veränderung der Segmentlänge
[Ca ²⁺]	intrazelluläre Calciumkonzentration
AAR	Area at risk
Abb	Abbildung
AIV	anterioren interventrikulären Vene
Ak	Antikörper
Akt	Protein-Kinase-B
ANOVA-Test	Analysis of Variance
AP-1	Aktivator Protein - 1
APS	Ammoniumperoxodisulfat
CaM	Calmodulin
cDNA	complementary DNA
CHAPS	3-[(3Cholamidopropyl)-dimethyl-amino]-Propansulfat
c-myc	celular myelocytomatosis gene
CO ₂	Kohlendioxid
DAG	Diacylglycerol
dIdC	Deoxyinosin-Deoxycytidinsäure
dLVP/dt	Ableitung des linksventrikulären Drucks nach der Zeit
dLVP/dt _{max}	maximalen Anstieg des links ventrikulären Druckes
dLVP/dt _{min}	maximalen Abfall des links ventrikulären Druckes
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
ECL	enhanced chemiluminescence“
EDL	enddiastolische Länge
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol-bis-(2-aminoethyl)-tetraessigsäure
EMSA	Electrophoretic Mobility Shift Assay
ENOS D (S1177)	endotheliale NO-Synthase D (an Serin 1177 phosphoryliert)
ENOS	endotheliale Stickstoffmonoxidsynthase
EPCs	Endothelial Progenitor Cells
E-Selektin	endotheliales Selektin

ESL	endsystolische Länge
FAD	Flavin-adenin-dinucleotid
FGF	fibroblast growth factor
Flk-1/KDR	fetal liver kinase-1 (kinase insert domain receptor)
Flt-1	fms-like tyrosine kinase
GFP	green fluorescence protein
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HEPES	N-Hydroxyethylpiperazin-N-2-ethansulfonsäure
HRP	horseradish peroxidase
Hsp 90	Hitze-Schock-Protein 90
HTAB	Hexadecyltrimethylammonium Bromid
HUVEC	human umbilical vein endothelial cells
ICAM-1	intercellular adhesion molecule 1
IKK	I κ B Kinase
IL	Interleukin
INOS	induzierbare Stickstoffmonoxidsynthase
IP3	Inositoltriphosphat
I κ B	Inhibitor kappa B
K	Kalium
KCl	Kalium-Chlorid
KOH	Kaliumhydrochlorid
Kon	Kontrolle
LAD	left anterior descending
L-NAME	N-Nitro-L-Arginin-Methyl-Ester
LV	linker Ventrikel
LVEDP	enddiastolische linksventrikuläre Druck
LVP	linksventrikulären Druck
MAC	Membrane Attack Complex
MCP-1	monocyte chemoattractant protein-1(56)
MEKK	MAP3-Kinase
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MPO	Myeloperoxydase
Na	Natrium
NAC	N-Acetyl-L-Cystein

NaCl	Natrium-ChloridKochsalzlösung
Na-K-ATPase	Natrium-Kalium- Adenosintriphosphatase
NF κ B	Nuclear factor kappa B
NIK	NF κ B interacting Kinase
NO \cdot	Stickstoffmonoxidradikal
O ₂ ⁻	Superoxid-Anion
ODN	Oligonukleotid
OH ⁻	Hydrogenradikal
ONOO ⁻	Peroxinitrit
PAA	Polyacrylamid
PAF	platelet-activating factor
PAG-Gel-Platten	Pipes–Puffer-Albumin-Glukose-Gel-Platten
PAG-Puffer	Puffer aus Pipes–Puffer, Albumin, Glukose
pCMV	porcine Cytomegalovirus
PECAM-1	platelet-endothelial cell adhesion molecule-1
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PKB	Protein-Kinase-B
PKC	Protein-Kinase-C
PLC- γ	Phospholipase C- γ
PMN	polymorphkernigen neutrophile Granulozyten
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PTCA	perkutane transluminale koronare Angioplastie
RCX	Ramus circumflexus (der linken Koronararterie)
ROI	reactive oxygen intermediates Sauerstoffzwischenprodukte
SDS	Natrium-Dodecylsulfat (<i>Sodium-Dodecylsulfat</i>)
SES	Segmentverkürzung
SRP	synchronisierten Retroperfusion
SSR	synchronized suction and retroinfusion
TBE	Tris/Borat Puffer
TBS	tris buffered saline (trisgepufferte Salzlösung)
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TGF- β	transforming growth factor- β
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor- α

6. Abkürzungen

HCl	Hydrochlorid
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule 1

7 Literaturnachweis

1. Asahara T, Takahashi T, Masuda H, Kalka C, Chen D, Iwaguro H et al. VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *EMBO J* 1999;18(14):3964-72.
2. Balligand JL, Kelly RA, Marsden PA, Smith TW, Michel T. Control of cardiac muscle cell function by an endogenous nitric oxide signaling system. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1993;90(1):347-51.
3. Balligand JL, Kobzik L, Han X, Kaye DM, Belhassen L, O'Hara DS et al. Nitric oxide-dependent parasympathetic signaling is due to activation of constitutive endothelial (type III) nitric oxide synthase in cardiac myocytes. *J Biol Chem.* 1995;270(24):14582-6.
4. Bates DO, Harper SJ. Regulation of vascular permeability by vascular endothelial growth factors. *Vascul.Pharmacol.* 2002;39(4-5):225-37.
5. Beckman J.S., Beckman T.W., Chen J., Marshall P.A., Freeman B.A. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: Implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1990.
6. Bienvendu K, Granger DN. Molecular determinants of shear rate-dependent leukocyte adhesion in postcapillary venules. *Am.J.Physiol* 1993;264(5 Pt 2):H1504-H1508.
7. Birdsall HH, Green DM, Trial J, Youker KA, Burns AR, MacKay CR et al. Complement C5a, TGF-beta 1, and MCP-1, in sequence, induce migration of monocytes into ischemic canine myocardium within the first one to five hours after reperfusion. *Circulation* 1997;95(3):684-92.
8. Boekstegers P, Peter W, von Degenfeld G, Nienaber CA, Abend M, Rehders TC et al. Preservation of regional myocardial function and myocardial oxygen tension during acute ischemia in pigs: comparison of selective synchronized suction and retroinfusion of coronary veins to synchronized coronary venous retroperfusion. *J.Am.Coll.Cardiol.* 1994;23(2):459-69.
9. Boyle EM, Jr., Pohlman TH, Cornejo CJ, Verrier ED. Endothelial cell injury in cardiovascular surgery: ischemia-reperfusion. *Ann.Thorac.Surg.* 1996;62(6):1868-75.
10. Boyle EM, Jr., Pohlman TH, Cornejo CJ, Verrier ED. Endothelial cell injury in cardiovascular surgery: ischemia-reperfusion. *Ann.Thorac.Surg.* 1996;62(6):1868-75.
11. Boyle MP, Weisman HF. Limitation of infarct expansion and ventricular remodeling by late reperfusion. Study of time course and mechanism in a rat model. *Circulation* 1993;88(6):2872-83.
12. Brouet A, Sonveaux P, Dessy C, Balligand JL, Feron O. Hsp90 ensures the transition from the early Ca²⁺-dependent to the late phosphorylation-dependent activation of the endothelial nitric-oxide synthase in vascular endothelial growth factor-exposed endothelial cells. *J.Biol.Chem.* 2001;276(35):32663-9.
13. Burnstock G. Local mechanisms of blood flow control by perivascular nerves and endothelium. *J Hypertens.Suppl* 1990;8(7):S95-106.
14. Busse R, Trogisch G, Bassenge E. The role of endothelium in the control of vascular tone. *Basic Res.Cardiol* 1985;80(5):475-90.
15. Chen CC, Rosenbloom CL, Anderson DC, Manning AM. Selective inhibition of E-selectin, vascular cell adhesion molecule-1, and intercellular adhesion molecule-1 expression by inhibitors of I kappa B-alpha phosphorylation. *J.Immunol.* 1995;155(7):3538-45.

16. Collins T, Read MA, Neish AS, Whitley MZ, Thanos D, Maniatis T. Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules: NF- kappa B and cytokine-inducible enhancers. *FASEB J.* 1995;9(10):899-909.
17. Czarnowska E, Kurzelewski M, Beresewicz A, Karczmarewicz E. The role of endogenous nitric oxide in inhibition of ischemia/reperfusion-induced cardiomyocyte apoptosis. *Folia Histochem.Cytobiol.* 2001;39(2):179-80.
18. De Caterina R, Libby P, Peng HB, Thannickal VJ, Rajavashisth TB, Gimbrone MA, Jr. et al. Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines. *J.Clin.Invest* 1995;96(1):60-8.
19. Di Napoli P, Antonio TA, Grilli A, Spina R, Felaco M, Barsotti A et al. Simvastatin reduces reperfusion injury by modulating nitric oxide synthase expression: an ex vivo study in isolated working rat hearts. *Cardiovasc.Res* 2001;51(2):283-93.
20. Dimmeler S, Dernbach E, Zeiher AM. Phosphorylation of the endothelial nitric oxide synthase at ser-1177 is required for VEGF-induced endothelial cell migration. *FEBS Lett.* 2000;477:258-62.
21. Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, Zeiher AM. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt- dependent phosphorylation. *Nature* 1999;399(6736):601-5.
22. Dreyer WJ, Michael LH, West MS, Smith CW, Rothlein R, Rossen RD et al. Neutrophil accumulation in ischemic canine myocardium. Insights into time course, distribution, and mechanism of localization during early reperfusion. *Circulation* 1991;84(1):400-11.
23. Duilio C, Ambrosio G, Kuppusamy P, DiPaula A, Becker LC, Zweier JL. Neutrophils are primary source of O₂ radicals during reperfusion after prolonged myocardial ischemia. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 2001;280(6):H2649-H2657.
24. Elrod JW, Greer JJ, Bryan NS, Langston W, Szot JF, Gebregzlabher H et al. Cardiomyocyte-specific overexpression of NO synthase-3 protects against myocardial ischemia-reperfusion injury. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol* 2006;26(7):1517-23.
25. Entman ML, Smith CW. Postreperfusion inflammation: a model for reaction to injury in cardiovascular disease. *Cardiovasc.Res* 1994;28(9):1301-11.
26. Entman ML, Youker K, Shappell SB, Siegel C, Rothlein R, Dreyer WJ et al. Neutrophil Adherence to Isolated Adult Canine Myocytes: Evidence for a CD 18-dependent Mechanism. *J Clin.Invest* 1990.
27. Entman ML, Youker KA, Shoji T, Kukielka GL, Shappell SB, Taylor AA et al. Neutrophil induced oxidative injury of cardiac myocytes: a compartmented system requiring CD 11b/CD 18-ICAM-1 adherence. *J Clin.Invest* 1992.
28. Fialkow L, Chan CK, Grinstein S, Downey GP. Regulation of tyrosine phosphorylation in neutrophils by the NADPH oxidase. Role of reactive oxygen intermediates. *J Biol Chem.* 1993;268(23):17131-7.
29. Flitter WD. Free radicals and myocardial reperfusion injury. *Br.Med.Bull.* 1993;49(3):545-55.
30. Forman MB, Virmani R, Puett DW. Mechanisms and therapy of myocardial reperfusion injury. *Circulation* 1990;81(3 Suppl):IV69-IV78.
31. Fortenberry J.D., Owens M.L., Chen N.X., Brown L.A. S-nitrosoglutathione inhibits TNF-alpha-induced NFkappaB activation in neutrophils. *Inflammation Research* 2001;50:89-95.

32. Frangogiannis N.G., Lindsey M.L., Michael L.H., Youker K.A., Bressler R.B., Mendoza L.H. et al. Resident cardiac mast cells degranulate and release preformed TNF-alpha, initiating the cytokine cascade in experimental canine myocardial ischemia/reperfusion. *Circulation* 1998;**98**:699-710.
33. Frangogiannis NG, Youker KA, Rossen RD, Gwechenberger M, Lindsey MH, Mendoza LH et al. Cytokines and the microcirculation in ischemia and reperfusion. *J.Mol.Cell Cardiol.* 1998;**30**(12):2567-76.
34. Fulton D, Gratton JP, McCabe TJ, Fontana J, Fujio Y, Walsh K et al. Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature* 1999;**399**(6736):597-601.
35. Gelinas D.S., Bernatchez P.N., Rollin S., Bazan N.G., Sirois M.G. Immediate and delayed VEGF-mediated NO synthesis in endothelial cells: role of PI3K, PKC and PLC pathways. *British Journal of Pharmacology* 2002;**137**:1021-30.
36. Glik G., Wheeler-Jones C., Zachary I. Vascular endothelial growth factor induces protein kinase C (PKC)-dependent Akt/PKB activation and phosphatidylinositol 3'-kinase-mediated PKC delta phosphorylation: role of PKC in angiogenesis. *Cell Biology International* 2002;**26**:751-9.
37. Grines CL, Watkins MW, Helmer G, Penny W, Brinker J, Marmur JD et al. Angiogenic Gene Therapy (AGENT) trial in patients with stable angina pectoris. *Circulation* 2002;**105**(11):1291-7.
38. Grosskreutz CL, Anand-Apte B, Duplaa C, Quinn TP, Terman BI, Zetter B et al. Vascular endothelial growth factor-induced migration of vascular smooth muscle cells in vitro. *Microvasc.Res.* 1999;**58**(2):128-36.
39. Guzman NJ, Fang MZ, Tang SS, Ingelfinger JR, Garg LC. Autocrine Inhibition of Na⁺/K⁺ - ATPase by Nitric Oxide in Mouse Proximal Tubule Epithelial Cells. *J Clin.Invest* 1995.
40. Halon D.A., Tzivoni B.D., Shefer A., Gotsman M.S. Regional ventricular dysfunction in coronary artery disease. *Isr J Med Sci* 1976;**12**:181-8.
41. Hedman M, Hartikainen J, Syvanne M, Stjernvall J, Hedman A, Kivela A et al. Safety and feasibility of catheter-based local intracoronary vascular endothelial growth factor gene transfer in the prevention of postangioplasty and in-stent restenosis and in the treatment of chronic myocardial ischemia: phase II results of the Kuopio Angiogenesis Trial (KAT). *Circulation* 2003;**107**(21):2677-83.
42. Henry TD, Annex BH, McKendall GR, Azrin MA, Lopez JJ, Giordano FJ et al. The VIVA trial: Vascular endothelial growth factor in Ischemia for Vascular Angiogenesis. *Circulation* 2003;**107**(10):1359-65.
43. Houck KA, Ferrara N, Winer J, Cachianes G, Li B, Leung DW. The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. *Mol.Endocrinol.* 1991;**5**(12):1806-14.
44. Huber AR, Kunkel SL, Todd RF, III, Weiss SJ. Regulation of transendothelial neutrophil migration by endogenous interleukin-8. *Science* 1991;**254**(5028):99-102.
45. Huie RE, Padmaja S. The reaction of NO with superoxide. *Free Radic.Res.Commun.* 1993;**18**(4):195-9.
46. Ichikawa H, Flores S, Kvietys PR, Wolf RE, Yoshikawa T, Granger DN et al. Molecular mechanisms of anoxia/reoxygenation-induced neutrophil adherence to cultured endothelial cells. *Circ.Res* 1997;**81**(6):922-31.

47. Isner JM, Pieczek A, Schainfeld R, Blair R, Haley L, Asahara T et al. Clinical evidence of angiogenesis after arterial gene transfer of phVEGF165 in patient with ischaemic limb. *Lancet* 1996;348(9024):370-4.
48. Jones SP, Girod WG, Palazzo AJ, Granger DN, Grisham MB, Jourd'Heuil D et al. Myocardial ischemia-reperfusion injury is exacerbated in absence of endothelial cell nitric oxide synthase. *Am.J Physiol* 1999;276(5 Pt 2):H1567-H1573.
49. Jugdutt BI. Nitric oxide and cardioprotection during ischemia-reperfusion. *Heart Fail.Rev.* 2002;7(4):391-405.
50. Kalka C, Masuda H, Takahashi T, Gordon R, Tepper O, Gravereaux E et al. Vascular endothelial growth factor(165) gene transfer augments circulating endothelial progenitor cells in human subjects. *Circ.Res.* 2000;86(12):1198-202.
51. Kalka C, Tehrani H, Laudenberg B, Vale PR, Isner JM, Asahara T et al. VEGF gene transfer mobilizes endothelial progenitor cells in patients with inoperable coronary disease. *Ann.Thorac.Surg.* 2000;70(3):829-34.
52. Kalra D, Baumgarten G, Dibbs Z, Seta Y, Sivasubramanian N, Mann DL. Nitric oxide provokes tumor necrosis factor-alpha expression in adult feline myocardium through a cGMP-dependent pathway. *Circulation* 2000;102(11):1302-7.
53. Kaminski KA, Bonda TA, Korecki J, Musial WJ. Oxidative stress and neutrophil activation--the two keystones of ischemia/reperfusion injury. *Int.J Cardiol.* 2002;86(1):41-59.
54. Karakurum M, Shreeniwas R, Chen J, Pinsky D, Yan SD, Anderson M et al. Hypoxic induction of interleukin-8 gene expression in human endothelial cells. *J.Clin.Invest* 1994;93(4):1564-70.
55. Kausalya S, Nath J. Interactive role of nitric oxide and superoxide anion in neutrophil-mediated endothelial cell injury. *J Leukoc.Biol* 1998;64(2):185-91.
56. Kilgore KS, Flory CM, Miller BF, Evans VM, Warren JS. The membrane attack complex of complement induces interleukin-8 and monocyte chemoattractant protein-1 secretion from human umbilical vein endothelial cells. *Am.J.Pathol.* 1996;149(3):953-61.
57. Kilgore KS, Lucchesi BR. Reperfusion injury after myocardial infarction: the role of free radicals and the inflammatory response. *Clin.Biochem.* 1993;26(5):359-70.
58. Kim CB, Braunwald E. Potential benefits of late reperfusion of infarcted myocardium. The open artery hypothesis. *Circulation* 1993;88(5 Pt 1):2426-36.
59. Kim I, Moon SO, Kim SH, Kim HJ, Koh YS, Koh GY. Vascular endothelial growth factor expression of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1), and E-selectin through nuclear factor-kappa B activation in endothelial cells. *J.Biol.Chem.* 2001;276(10):7614-20.
60. Kinugawa K, Shimizu T, Yao A, Kohmoto O, Serizawa T, Takahashi T. Transcriptional regulation of inducible nitric oxide synthase in cultured neonatal rat cardiac myocytes. *Circ.Res* 1997;81(6):911-21.
61. Kretz-Remy C, Munsch B, Arrigo AP. NFkappa B-dependent transcriptional activation during heat shock recovery. Thermolability of the NF-kappaB.Ikappa B complex. *J.Biol.Chem.* 2001;276(47):43723-33.
62. Kupatt C, Habazettl H, Goedecke A, Wolf DA, Zahler S, Boekstegers P et al. Tumor necrosis factor-alpha contributes to ischemia/reperfusion induced endothelial activation in isolated hearts. *Circ.Res* 1999;84(4):392-400.

63. Kupatt C, Habazettl H, Zahler S, Weber C, Becker BF, Messmer K et al. ACE-inhibition prevents postischemic coronary leukocyte adhesion and leukocyte-dependent reperfusion injury. *Cardiovasc.Res* 1997;36(3):386-95.
64. Kupatt C, Weber C, Wolf DA, Becker BF, Smith TW, Kelly RA. Nitric oxide attenuates reoxygenation-induced ICAM-1 expression in coronary microvascular endothelium: role of NFkappaB. *J.Mol.Cell Cardiol.* 1997;29(10):2599-609.
65. Kupatt C, Wichels R, Deiss M, Molnar A, Leberherz C, Raake P et al. Retroinfusion of NFkappaB decoy oligonucleotide extends cardioprotection achieved by CD18 inhibition in a preclinical study of myocardial ischemia and retroinfusion in pigs. *Gene Ther.* 2002;9(8):518-26.
66. Kureishi Y, Luo Z, Shiojima I, Bialik A, Fulton D, Lefer DJ et al. The HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin activates the protein kinase Akt and promotes angiogenesis in normocholesterolemic animals. *Nat.Med.* 2000;6(9):1004-10.
67. Laguens R, Cabeza MP, Vera JG, Del Valle H, Lascano E, Negroni J et al. Entrance in mitosis of adult cardiomyocytes in ischemic pig hearts after plasmid-mediated rhVEGF165 gene transfer. *Gene Ther.* 2002;9(24):1676-81.
68. Lefer DJ. Myocardial protective actions of nitric oxide donors after myocardial ischemia and reperfusion. *New Horiz.* 1995;3(1):105-12.
69. Lewis MS, Whatley RE, Cain P, McIntyre TM, Prescott SM, Zimmerman GA. Hydrogen peroxide stimulates the synthesis of platelet-activating factor by endothelium and induces endothelial cell-dependent neutrophil adhesion. *J.Clin.Invest* 1988;82(6):2045-55.
70. Li X, Stark GR. NFkappaB-dependent signaling pathways. *Exp.Hematol.* 2002;30(4):285-96.
71. Lorant DE, Topham MK, Whatley RE, McEver RP, McIntyre TM, Prescott SM et al. Inflammatory roles of P-selectin. *J.Clin.Invest* 1993;92(2):559-70.
72. Lowenstein CJ, Alley EW, Raval P, Snowman AM, Snyder SH, Russell SW et al. Macrophage nitric oxide synthase gene: Two upstream regions mediate induction by interferon α and lipopolysaccharide. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1993.
73. Luo Z, Diaco M, Murohara T, Ferrara N, Isner JM, Symes JF. Vascular endothelial growth factor attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury. *Ann.Thorac.Surg.* 1997;64:993-8.
74. Ma XL, Gao F, Lopez BL, Christopher TA, Vinten-Johansen J. Peroxynitrite, a two-edged sword in post-ischemic myocardial injury- dichotomy of action in crystal. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 2000;292(3):912-20.
75. Ma XL, Lefer DJ, Lefer AM, Rothlein R. Coronary endothelial and cardiac protective effects of a monoclonal antibody to ICAM-1 in myocardial ischemia and reperfusion. *Circulation* 1992.
76. Ma XL, Weyrich AS, Lefer DJ, Buerke M, Albertine KH, Kishimoto TK et al. Monoclonal antibody to L-selectin attenuates neutrophil accumulation and protects ischemic reperfused cat myocardium. *Circulation* 1993;88(2):649-58.
77. Ma XL, Weyrich AS, Lefer DJ, Lefer AM. Diminished basal nitric oxide release after myocardial ischemia and reperfusion promotes neutrophil adherence to coronary endothelium.
78. Matata BM, Galinanes M. Peroxynitrite is an essential component of cytokines production mechanism in human monocytes through modulation of nuclear factor-kappa B DNA binding activity. *J.Biol.Chem.* 2002;277(3):2330-5.
79. Matsumura K, Jeremy RW, Schaper J, Becker LC. Progression of myocardial necrosis during reperfusion of ischemic myocardium. *Circulation* 1998;97(8):795-804.

80. Meerbaum S, Lang TW, Osher JV, Hashimoto K, Lewis GW, Feldste C et al. Diastolic retroperfusion of acutely ischemic myocardium. *Am J Cardiol* 1976.
81. Meyer M, Pahl HL, Baeuerle PA. Regulation of the transcription factors NF-kappa B and AP-1 by redox changes. *Chem.Biol Interact.* 1994;91(2-3):91-100.
82. Moncada S, Higgs EA. Endogenous nitric oxide: physiology, pathology and clinical relevance. *Eur.J Clin.Invest* 1991;21(4):361-74.
83. Müller JM, Rupec RA, Baeuerle PA. Study of gene regulation by NF-kappa B and AP-1 in response to reactive oxygen intermediates. *Methods* 1997;11(3):301-12.
84. Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J* 1999;13(1):9-22.
85. Nossuli TO, Frangogiannis NG, Knuefermann P, Lakshminarayanan V, Dewald O, Evans AJ et al. Brief murine myocardial I/R induces chemokines in a TNF-alpha- independent manner: role of oxygen radicals. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 2001;281(6):H2549-H2558.
86. Nossuli TO, Hayward R, Jensen D, Scalia R, Lefer AM. Mechanisms of cardioprotection by peroxynitrite in myocardial ischemia and reperfusion injury. *Am.J.Physiol* 1998;275(2 Pt 2):H509-H519.
87. Padmaja S, Huie RE. The reaction of nitric oxide with organic peroxy radicals. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 1993;195(2):539-44.
88. Papapetropoulos A, Garcia-Cardena G, Madri JA, Sessa WC. Nitric oxide production contributes to the angiogenic properties of vascular endothelial growth factor in human endothelial cells. *J Clin.Invest* 1997;100(12):3131-9.
89. Paroczai M, Roth E, Matos G, Temes G, Lantos J, Karpati E. Effects of bisaramil on coronary-occlusion-reperfusion injury and free- radical-induced reactions.
90. Peng HB, Libby P, Liao JK. Induction and stabilization of I kappa B alpha by nitric oxide mediates inhibition of NF-kappa B. *J.Biol.Chem.* 1995;270(23):14214-9.
91. Pinsky DJ, Naka Y, Liao H, Oz MC, Wagner DD, Mayadas TN et al. Hypoxia-induced exocytosis of endothelial cell Weibel-Palade bodies. A mechanism for rapid neutrophil recruitment after cardiac preservation. *J.Clin.Invest* 1996;97(2):493-500.
92. Pohl U, de Wit C, Gloe T. Large arterioles in the control of blood flow: role of endothelium-dependent dilation. *Acta Physiol Scand.* 2000;168(4):505-10.
93. Pohl U, Wagner K, de Wit C. Endothelium-derived nitric oxide in the control of tissue perfusion and oxygen supply: physiological and pathophysiological implications. *Eur.Heart J* 1993;14 Suppl I:93-8.
94. Ramakrishnan S, Olson TA, Bautch VL, Mohanraj D. Vascular endothelial growth factor-toxin conjugate specifically inhibits KDR/flk-1-positive endothelial cell proliferation in vitro and angiogenesis in vivo. *Cancer Res.* 1996;56(6):1324-30.
95. Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 1997;386(6626):671-4.
96. Rissanen TT, Rutanen J, Yla-Herttuala S. Gene transfer for therapeutic vascular growth in myocardial and peripheral ischemia. *Adv.Genet.* 2004;52:117-64.
97. Roberts CS, Maclean D, Maroko P, Kloner RA. Relation of early mononuclear and polymorphonuclear cell infiltration to late scar thickness after experimentally induced myocardial infarction in the rat. *Basic Res.Cardiol.* 1985;80(2):202-9.

98. Romson JL, Hook BG, Kunkel SL, Abrams GD, Schork MA, Lucchesi BR. Reduction of the extent of ischemic myocardial injury by neutrophil depletion in the dog. *Circulation* 1983;67(5):1016-23.
99. Rossen RD, Michael LH, Hawkins HK, Youker K, Dreyer WJ, Baughn RE et al. Cardiolipin-protein complexes and initiation of complement activation after coronary artery occlusion. *Circ.Res* 1994;75(3):546-55.
100. Rubbo H, Radi R, Trujillo M, Telleri R, Kalyanaraman B, Barnes S et al. Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipid peroxidation. Formation of novel nitrogen-containing oxidized lipid derivatives. *J.Biol.Chem.* 1994;269(42):26066-75.
101. Rupec RA, Baeuerle PA. The genomic response of tumor cells to hypoxia and reoxygenation. Differential activation of transcription factors AP-1 and NF-kappa B. *Eur.J Biochem.* 1995;234(2):632-40.
102. Salgo MG, Squadrito GL, Pryor WA. Peroxynitrite causes apoptosis in rat thymocytes. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 1995;215(3):1111-8.
103. Sato K, Wu T, Laham RJ, Johnson RB, Douglas P, Li J et al. Efficacy of intracoronary or intravenous VEGF165 in a pig model of chronic myocardial ischemia. *J.Am.Coll.Cardiol.* 2001;37(2):616-23.
104. Scalia R, Booth G, Lefer DJ. Vascular endothelial growth factor attenuates leukocyte-endothelium interaction during acute endothelial dysfunction: essential role of endothelium-derived nitric oxide. *FASEB J.* 1999;13(9):1039-46.
105. Schreck R, Rieber P, Baeuerle PA. Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1. *EMBO J.* 1991;10(8):2247-58.
106. Schwarz ER, Speakman MT, Patterson M, Hale SS, Isner JM, Kedes LH et al. Evaluation of the effects of intramyocardial injection of DNA expressing vascular endothelial growth factor (VEGF) in a myocardial infarction model in the rat--angiogenesis and angioma formation. *J Am Coll.Cardiol* 2000;35(5):1323-30.
107. Sharp BR, Jones SP, Rimmer DM, Lefer DJ. Differential response to myocardial reperfusion injury in eNOS-deficient mice. *Am J Physiol Heart Circ.Physiol* 2002;282(6):H2422-H2426.
108. Shintani S, Murohara T, Ikeda H, Ueno T, Honma T, Katoh A et al. Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction. *Circulation* 2001;103(23):2776-9.
109. Simons M, Annex BH, Laham RJ, Kleiman N, Henry T, Dauerman H et al. Pharmacological treatment of coronary artery disease with recombinant fibroblast growth factor-2: double-blind, randomized, controlled clinical trial. *Circulation* 2002;105(7):788-93.
110. Simpson PJ, Todd RF, III, Fantone JC, Mickelson JK, Griffin JD, Lucchesi BR. Reduction of experimental canine myocardial reperfusion injury by a monoclonal antibody (anti-Mo1, anti-CD11b) that inhibits leukocyte adhesion. *J.Clin.Invest* 1988;81(2):624-9.
111. Spiecker M, Darius H, Kaboth K, Hubner F, Liao JK. Differential regulation of endothelial cell adhesion molecule expression by nitric oxide donors and antioxidants. *J.Leukoc.Biol.* 1998;63(6):732-9.
112. Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 1994;76(2):301-14.
113. Stamler JS, Singel DJ, Loscalzo J. Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science* 1992;258(5090):1898-902.

114. Takahashi N, Seko Y, Noiri E, Tobe K, Kadowaki T, Sabe H et al. Vascular endothelial growth factor induces activation and subcellular translocation of focal adhesion kinase (p125FAK) in cultured rat cardiac myocytes. *Circ.Res.* 1999;84(10):1194-202.
115. Tanimoto T, Jin ZG, Berk BC. Transactivation of vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor Flk-1/KDR is involved in sphingosine 1-phosphate-stimulated phosphorylation of Akt and endothelial nitric-oxide synthase (eNOS). *J Biol Chem.* 2002;277(45):42997-3001.
116. Tomita N, Morishita R, Tomita S, Yamamoto K, Aoki M, Matsushita H et al. Transcription factor decoy for nuclear factor-kappaB inhibits tumor necrosis factor-alpha-induced expression of interleukin-6 and intracellular adhesion molecule-1 in endothelial cells. *J Hypertens.* 1998;16(7):993-1000.
117. von Andrian UH, Chambers JD, McEvoy LM, Bargatze RF, Arfors KE, Butcher EC. Two-step model of leukocyte-endothelial cell interaction in inflammation: Distinct roles for LECAM-1 and the leukocyte beta2 integrins in vivo. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1991.
118. Voraberger G, Schafer R, Stratowa C. Cloning of the human gene for intercellular adhesion molecule 1 and analysis of its 5'-regulatory region. Induction by cytokines and phorbol ester. *J.Immunol.* 1991;147(8):2777-86.
119. Wang W, Sawicki G, Schulz R. Peroxynitrite-induced myocardial injury is mediated through matrix metalloproteinase-2. *Cardiovasc.Res* 2002;53(1):165-74.
120. Weisman HF, Bartow T, Leppo MK, Marsh HC, Jr., Carson GR, Concino MF et al. Soluble human complement receptor type 1: in vivo inhibitor of complement suppressing post-ischemic myocardial inflammation and necrosis. *Science* 1990;249(4965):146-51.
121. Weiss SJ. Tissue destruction by neutrophils. *N.Engl.J.Med.* 1989;320(6):365-76.
122. Weyrich AS, Ma XL, Lefer AM. The role of L-arginine in ameliorating reperfusion injury after myocardial ischemia in the cat. *Circulation* 1992;86(1):279-88.
123. Xie QW, Kashiwabara Y, Nathan C. Role of Transcription Factor NF- κ -B/Rel in Induction of Nitric Oxide Synthase. *J Biol Chem.* 1994.
124. Yla-Herttuala S, Rissanen TT, Vajanto I, Hartikainen J. Vascular endothelial growth factors: biology and current status of clinical applications in cardiovascular medicine. *J Am Coll.Cardiol* 2007;49(10):1015-26.
125. Zeiher AM, Fisslthaler B, Schray-Utz B, Busse R. Nitric oxide modulates the expression of monocyte chemoattractant protein 1 in cultured human endothelial cells. *Circ.Res* 1995;76(6):980-6.
126. Ziche M, Morbidelli L, Choudhuri R, Zhang HT, Donnini S, Granger HJ et al. Nitric oxide synthase lies downstream from vascular endothelial growth factor-induced but not basic fibroblast growth factor-induced angiogenesis. *J.Clin.Invest* 1997;99(11):2625-34.
127. Zingarelli B, Hake PW, Yang Z, O'Connor M, Denenberg A, Wong HR. Absence of inducible nitric oxide synthase modulates early reperfusion- induced NF-kappaB and AP-1 activation and enhances myocardial damage. *FASEB J.* 2002;16(3):327-42.

8 Lebenslauf

PERSON

Name: Vachenauer
Vorname: Robert Peter
Geburtsdatum: 10.09.1977
Geburtsort: Ebersberg
Staatsangehörigkeit: deutsch

ANSCHRIFT

Strasse, Hausnummer: Landenbergstrasse 22
Postleitzahl, Ort: 8037 Zürich
Land: Schweiz

Telefon: +41-(0)43-5413480
Mobil: +41-(0)76-4666915
eMail: vachenauer.robert@gmx.de

AUSBILDUNG

1984 – 1988 Grundschule Ebersberg
1988 – 1997 Gymnasium Grafing
 Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
1997 – 1998 Zivildienst: Chirurgische Abteilung der Kreisklinik
 Ebersberg
1998 – 2005 Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilian-
 Universität München
 September 2000: Physikum
 August 2001: 1. Staatsexamen
 März 2004: 2. Staatsexamen
 April 2005: 3. Staatsexamen

FAMULATUREN

20.02.2001 – 20.03.2001	Kreisklinik Ebersberg <i>Plastische Chirurgie</i>
02.09.2002 – 13.10.2002	Berufsgenossenschaftliche Unfallklinik Murnau <i>Unfallchirurgie / Nothilfe</i>
05.03.2003 – 04.04.2003	Radiologie am Herkomerplatz, München <i>Radiologie</i>
01.08.2003 – 31.08.2003	Universitätsspital Zürich <i>Herzchirurgie</i>

PRAKTISCHES JAHR

19.04. 2004 – 08.08.2004	Klinikum der Universität München – Grosshadern Medizinische Klinik und Poliklinik I <i>Kardiologie</i>
09.08.2004 - 28.11.2004	Universitätsspital Zürich <i>Viszeralchirurgie / Unfallchirurgie</i>
29.11.2004 – 20.03.2005	Mount Sinai School of Medicine, New York <i>Anästhesie</i>

WISSENSCHAFTLICHE ARBEIT

Veröffentlichungen:

VEGF165 transfection decreases postischemic NF-kappa B-dependent myocardial reperfusion injury in vivo: role of eNOS phosphorylation.

Kupatt C, Hinkel R, Vachenaer R, Horstkotte J, Raake P, Sandner T, Kreuzpointner R, Muller F, Dimmeler S, Feron O, Boekstegers P.
FASEB J. 2003 Apr;17(6):705-7. Epub 2003 Feb 05

Myocardial gene transfer by selective pressure-regulated retroinfusion of coronary veins: comparison with surgical and percutaneous intramyocardial gene delivery.

Raake P, von Degenfeld G, Hinkel R, Vachenaer R, Sandner T, Beller S, Andrees M, Kupatt C, Schuler G, Boekstegers P.
J Am Coll Cardiol. 2004 Sep 1;44(5):1124-9

Accuracy of dual-source CT coronary angiography: first experience in a high pre-test probability population without heart rate control

Scheffel H, Alkadhi H, Plass A, Vachenaue R, Desbiolles L, Gaemperli O, Schepis T, Frauenfelder T, Schertler T, Husmann L, Grünenfelder J, Genoni M, Kaufmann P A, Marincek B, Leschka S
Eur Radiol. 2006 Sep 21

New transverse plate fixation system for complicated sternal wound infection after median sternotomy.

Plass A, Grünenfelder J, Reuthebuch O, Vachenaue R, Gauer JM, Zünd G, Genoni M.
Ann Thorac Surg. 2007 Mar;83(3):1210-2

Accuracy of 64-slice computed tomography for the preoperative detection of coronary artery disease in patients with chronic aortic regurgitation.

Scheffel H, Leschka S, Plass A, Vachenaue R, Gaemperli O, Garzoli E, Genoni M, Marincek B, Kaufmann P, Alkadhi H.
Am J Cardiol. 2007 Aug 15;100(4):701-6. Epub 2007 Jun 21

Aortic regurgitation: assessment with 64-section CT.

Alkadhi H, Desbiolles L, Husmann L, Plass A, Leschka S, Scheffel H, Vachenaue R, Schepis T, Gaemperli O, Flohr TG, Genoni M, Marincek B, Jenni R, Kaufmann PA, Frauenfelder T.
Radiology. 2007 Oct;245(1):111-21. Epub 2007 Aug 23

Myocardial bridging: depiction rate and morphology at CT coronary angiography--comparison with conventional coronary angiography.

Leschka S, Keopfli P, Husmann L, Plass A, Vachenaue R, Gaemperli O, Schepis T, Genoni M, Marincek B, Eberli FR, Kaufmann PA, Alkadhi H.
Radiology. 2008 Mar;246(3):754-62. Epub 2008 Jan 25

Changing lifestyle habits as secondary prophylaxis after coronary artery bypass grafting

Vachenaue R, Grünenfelder J, Plass a, Slankamenak K, Pantic L, Kisner D, Genoni M.
Heart Surg Forum. 2008;11(4):E243-7.

WEITERBILDUNG

28.11.2005	Basic Life Support-Kurs - USZ
18.-22.10.2006	10 th HeartLab International 2006, Zürich
07.05.2008	Schulterverletzung – wie weiter? Traumaweiterbildungskurs der SGTV, Stadtspital Triemli, Zürich
28.-30.05.2008	95. Jahreskongress der Schweizerischen Gesellschaft für Chirurgie, Basel

9 Danksagung

Ich möchte folgenden Personen danken:

Prof. Dr. med. Peter Boekstegers für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und das Herstellen der Rahmenbedingungen, welche die Versuchsdurchführung überhaupt erst ermöglichten.

Priv. Doz. Dr. med. Christian Kupatt für das Überlassen des Themas dieser Arbeit. Besonderer Dank gilt ihm für seine Unterstützung sowohl in methodischen wie auch inhaltlichen Fragen und seiner Betreuung beim Entstehen dieser Arbeit.

Frau Rabea Hinkel und Dr. med. Philipp Raake für die Einführung in die wissenschaftliche Arbeit auf einem sehr interessanten Forschungsgebiet. Beide standen mir bei der Versuchsdurchführung tatkräftig zur Seite, wofür ich ihnen speziell danken möchte.

Allen Mitarbeitern unserer Arbeitsgruppe, insbesondere Frau Susanne Helbig und Frau Elisabeth Ronft. Ohne deren vielfältige Unterstützung wäre vorliegende Arbeit nicht zustande gekommen.

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. mult. Konrad Messmer, der uns die Räumlichkeiten des Institutes für Chirurgische Forschung (ICF im Walter-Brendel-Zentrum für Experimentelle Medizin) zur Durchführung unserer Experimente zur Verfügung stellte.

Meinen Eltern, die mich stets unterstützten und denen ich nahezu alles verdanke.