

Aus der Herzchirurgischen Klinik und Poliklinik  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Vorstand: Prof. Dr. med. B. Reichart

**Effekte der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthase und  
Superoxid auf die Aktivierung von Matrixmetalloproteinase 2, 9  
und die koronare Endothelfunktion.  
In vivo Studie nach allogener Herztransplantation im  
Rattenmodell**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Nicole Conrad  
aus  
Kaufbeuren  
2004

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität München

Berichterstatter: PD Dr. S. M. Wildhirt

Mitberichterstatter: Prof. Dr. G. Enders  
Prof. Dr. U. Pohl  
Prof. Dr. H.-W. Pfister

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. K. Peter

Tag der mündlichen Prüfung: 26.04.2004

*für* **PETER**

---

**Inhaltsverzeichnis**

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<hr/>		
<b>1.1</b>	<b>Transplantatvaskulopathie (TVP)</b>	<b>1</b>
1.1.1	Rolle von Ischämie/Reperfusionsschäden bei der Entwicklung einer Transplantat-assoziierten Atherogenese	1
1.1.2	Endothelfunktion und Transplantatvaskulopathie	2
<b>1.2.</b>	<b>Oxidativer Stress</b>	<b>5</b>
1.2.1	Rolle von NO und therapeutische Intervention	6
1.2.2	Rolle von Superoxid und therapeutische Intervention	7
<b>1.3</b>	<b>Matrixmetalloproteinasen</b>	<b>9</b>
<b>1.4</b>	<b>Zielsetzung</b>	<b>12</b>
<b>2.</b>	<b>Methoden</b>	<b>13</b>
<hr/>		
<b>2.1</b>	<b>Wahl des Tiermodells zur in vivo Untersuchung des I/R Schadens</b>	<b>13</b>
<b>2.2</b>	<b>Experimentelles Protokoll</b>	<b>13</b>
<b>2.3</b>	<b>Therapeutische Intervention</b>	<b>14</b>
2.3.1	Kontinuierliche selektive Modulation der iNOS durch 1400W	14
2.3.2	Dismutation von Superoxid durch exogene SOD	15
<b>2.4</b>	<b>Heterotope Herztransplantation – Etablierung der Transplantationstechnik</b>	<b>16</b>
2.4.1	Anästhesie	16
2.4.2	Präparation des Empfängers	17
2.4.3	Präparation des Spenders	17
2.4.4	Heterotope Transplantation des Spenderherzens	18
<b>2.5</b>	<b>Messung der Hämodynamik und koronaren Endothelfunktion ex vivo am Langendorff-Apparat</b>	<b>20</b>
2.5.1	Explantation und Präparation des transplantierten Herzens	20
2.5.2	Grundsätzliches zur retrograden Perfusion nach Langendorff unter Konstant-Druck Bedingung	21

<b>Inhaltsverzeichnis</b>		<b>ii</b>
2.5.3	Technischer Aufbau und Funktionseinheiten des Langendorff-Apparates	22
2.5.4	Fixierung des Organs am Langendorff-Apparat	25
2.5.5	Bestimmung der koronaren Vasomotorik	25
<b>2.6</b>	<b>Gewebe Gewinnung und –aufbewahrung</b>	<b>27</b>
<b>2.7</b>	<b>Nachweis von iNOS Protein mittels Western Blot</b>	<b>27</b>
2.7.1	Anreicherung der NO-Synthasen mittels 2'5 ADP-Sepharose 4B	28
2.7.2	Elektrophorese	28
2.7.3	Transfer der Proteine auf eine Membran nach dem Semi-Dry-Verfahren	30
2.7.4	Immunologischer Nachweis mit monoklonalen Antikörpern	31
<b>2.8</b>	<b>Superoxid-Nachweis</b>	<b>31</b>
<b>2.9</b>	<b>Immunhistochemie</b>	<b>32</b>
2.9.1	Anfertigung von Gefrierschnitten	32
2.9.2	Einbettung in Paraffin, Anfertigung von Paraffinschnitten	33
2.9.3	Nachweis von Nitrotyrosin und MMP-9 in situ	33
<b>2.10</b>	<b>Zymografie mit Matrixmetalloproteinasen</b>	<b>34</b>
<b>2.11</b>	<b>Statistik</b>	<b>35</b>
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>36</b>
<b>3.1</b>	<b>Linksventrikuläre Hämodynamik</b>	<b>36</b>
<b>3.2</b>	<b>Dosis-Antwort-Bestimmung von 1400W und SOD auf die endothelabhängige CFR</b>	<b>38</b>
3.2.1	Therapie mit SOD	38
3.2.2	Therapie mit 1400W	38
<b>3.3</b>	<b>Endothelabhängige und –unabhängige Vasomotorfunktion</b>	<b>41</b>
<b>3.4</b>	<b>Nachweis des iNOS Proteins mittels Western Blot</b>	<b>44</b>
<b>3.5</b>	<b>Einfluss der Therapie mit 1400W und SOD auf die Superoxid-Bildung</b>	<b>45</b>
<b>3.6</b>	<b>Einfluss der Therapie mit 1400W und SOD auf die Nitrotyrosin- und MMP-9-Expression</b>	<b>48</b>
<b>3.7</b>	<b>Einfluss der Therapie mit 1400W und SOD auf die MMP-2 und MMP-9-Aktivitäten</b>	<b>51</b>

---

<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>53</b>
-----------	-------------------	-----------

---

4.1	Oxidativer Stress und Endothelfunktion	55
4.2	Rolle der MMPs bei I/R induzierter vaskulärer Dysfunktion - MMPs als potenzielle Effektormoleküle bei oxidativem Stress	57

---

<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>61</b>
-----------	------------------------	-----------

---

<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>63</b>
-----------	-----------------------------	-----------

---

<b>7.</b>	<b>Abkürzungen</b>	<b>73</b>
-----------	--------------------	-----------

---

<b>8.</b>	<b>Danksagung</b>	<b>76</b>
-----------	-------------------	-----------

---

<b>9.</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>78</b>
-----------	-------------------	-----------

---

## 1. Einleitung

### 1.1 Transplantatvaskulopathie (TVP)

Nach wie vor ist für Patienten mit Herzversagen im Endstadium eine Herztransplantation die Methode der Wahl, um ihre Gesundheit und das Leben aufrechtzuerhalten. Verbesserungen der Immunsuppression, Eingriffe in akute Abstoßungsreaktionen und opportunistische Infektionen haben die Überlebensrate und –zeit der transplantierten Patienten zwar gesteigert. Doch im Zuge dieser Verbesserungen trat und tritt ein neues Problem auf, welches das Langzeit-Überleben limitiert: Mittlerweile ist die Transplantat-assoziierte Arteriosklerose der Hauptgrund für das Ableben von herztransplantierten Patienten (Hosenpud *et al.*, 1998). In 6-18 % der Transplantatempfänger sind nach einem Jahr koronarangiografisch arteriosklerotische Veränderungen nachzuweisen, nach fünf Jahren sind sogar 50 % betroffen (Kerber *et al.*, 1995; Mehra *et al.*, 1995).

Letztlich ist bis jetzt die einzige vollständige Therapiemöglichkeit eine neuerliche Transplantation. Daher ist es von großem Interesse, die genauen Mechanismen zu kennen, die letztlich zu einer Organdysfunktion führen. Nur so können neue Therapieformen entwickelt und die Lebensdauer des übertragenen Organs beträchtlich gesteigert werden.

#### 1.1.1 Rolle von Ischämie/Reperfusionsschäden bei der Entwicklung einer Transplantat-assoziierten Atherogenese

Die Transplantatvaskulopathie (TVP) äußert sich als eine spezielle und rasch fortschreitende Form der koronaren Herzerkrankung, bei der intramurale und epikardiale Koronararterien und –venen betroffen sind. Die Ursachen für diese Gefäßerkrankung sind sehr vielfältig: Die immunologische Antwort des Empfängers auf die Organübertragung, Ischämie-Reperfusionsschäden, virale Infektionen, Immunsuppressiva und „klassische“ Faktoren wie Hyperlipidämie und Bluthochdruck werden in diesem Zusammenhang genannt (Weis und von Scheidt, 1997).

Der globale Ischämie- und Reperfusionsschaden des Myokards spielt in der frühen postoperativen Organdysfunktion eine wichtige Rolle.

Dabei treten im Herzgewebe viele Reaktionen zutage, die von allgemeinen Entzündungsprozessen bekannt sind. So kommt es zu einer Freisetzung von freien Sauerstoffradikalen, Zytokinen und anderen inflammatorischen Mediatoren, die sowohl neutrophile Zellen wie auch das Endothel der Herzkranzgefäße aktivieren können. Letztlich werden Neutrophile rekrutiert, die in das Myokard migrieren und dort direkt in Interaktion mit Myozyten treten. Der Reperfusionsschaden äußert sich typischerweise in einer Beeinträchtigung der Mikrozirkulation, Durchblutungsstörungen des betroffenen Organs, Myokardinfarkt, Apoptose und endothelialer Dysfunktion (Jordan *et al.*, 1999).

Vor allem eine Funktionsstörung der Endothelzellen stellt auch ein früh auftretendes und unter Umständen reversibles Phänomen in der Entwicklung der nativen und Transplantat-assoziierten Atherogenese dar (Drexler *et al.*, 1994; Schächinger *et al.*, 2000).

### **1.1.2 Endothelfunktion und Transplantatvaskulopathie**

Die Integrität der Endothelzellen ist die wichtigste Voraussetzung für eine physiologische Funktion der Gefäße. Das Endothel reguliert bedarfsgerecht den Vasotonus, vermindert Thrombusformation sowie die Adhäsion der zirkulierenden Leukozyten und vermindert die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen (Zeiher *et al.*, 1991).

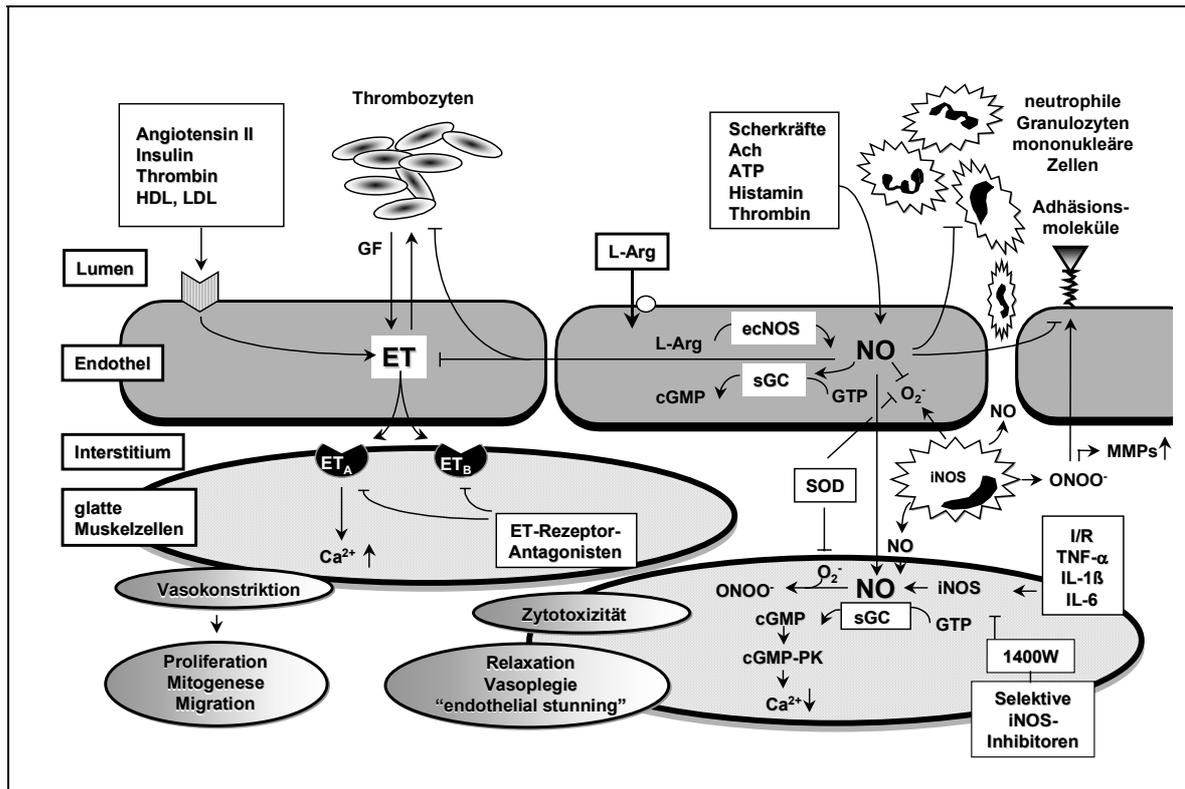
Im gesunden Herzen wird NO durch eine endotheliale und konstitutiv exprimierte NO-Synthase (ecNOS) aus L-Arginin und Sauerstoff gebildet. NO bindet an die lösliche Guanylatzyklase (sGC), die wiederum aus Guanosin-Triphosphat (GTP) zyklisches Guanosin-Monophosphat (cGMP) herstellt. cGMP aktiviert Proteinkinase G, was letztlich über eine Phosphorylierungskette zu einer Senkung des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegels und damit zur Vasodilatation führt (Schulz und Triggle, 1994). Den Gegenspieler stellt das Endothelin-System dar, das rezeptorvermittelt ( $\text{ET}_A$  und  $\text{ET}_B$ -Rezeptoren) über eine Proteinkinase zu einer Anhebung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegels und damit zu einer Gefäßkonstriktion führt.

Unter pathologischen Bedingungen führt die Interaktion zwischen Endothelzellen, Leukozyten und glatten Gefäßmuskelzellen zu einer Aktivierung unterschiedlicher

inflammatorischer Mediatoren. Dazu gehören IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  ebenso wie Wachstumsfaktoren, Adhäsionsmoleküle und vasoaktive Substanzen wie Endothelin und NO. Durch die Aktivierung der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) werden große Mengen NO sowohl in Kardiomyozyten als auch in eingewanderten neutrophilen Granulozyten/mononukleären Zellen gebildet. Zusätzlich entsteht in beträchtlichem Ausmaß Superoxid (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>), welches sehr rasch mit NO zu Peroxynitrit (ONOO-) reagieren kann.

Untersuchungen haben gezeigt, dass endothelial produziertes NO vasoprotektiv ist, wohingegen eine durch die iNOS gesteigerte NO-Produktion zu Vasomotionsstörungen beitragen kann. Die Aktivierung der genannten Mediatoren begünstigen eine Endothelschädigung, einen erhöhten Vasokonstriktortonus sowie Thrombusformation und Proliferation der glatten Gefäßmuskelzellen (Duquesnoy und Demetris, 1995; Rabinovitch *et al.*, 1995; Russel *et al.*, 1995; Treasure und Alexander, 1995).

Auf der Basis dieser Frühveränderungen können wiederkehrende immunologische und inflammatorische Schädigungsprozesse zur Verminderung der Endothelfunktion beitragen und so die Entwicklung einer manifesten TVP begünstigen (Davis *et al.*, 1996). Abb. 1 zeigt einige potenzielle Mechanismen der endothelialen Funktionsstörungen.



**Abb. 1:** Die Abbildung zeigt einige der potenziellen Mechanismen, die zur Entstehung einer endothelialen Funktionsstörung und Progression zur manifesten Transplantatvaskulopathie (TVP) beitragen können.

Endothelin (ET), Stickstoffmonoxid (NO) und deren Effektormoleküle bilden dabei die Gegenspieler für Vasokonstriktion und –dilatation.

Therapeutische Eingriffe sind an vielen Stellen dieses Netzwerkes möglich; die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Substanzen und deren mögliche Interaktionen sind ebenfalls vermerkt.

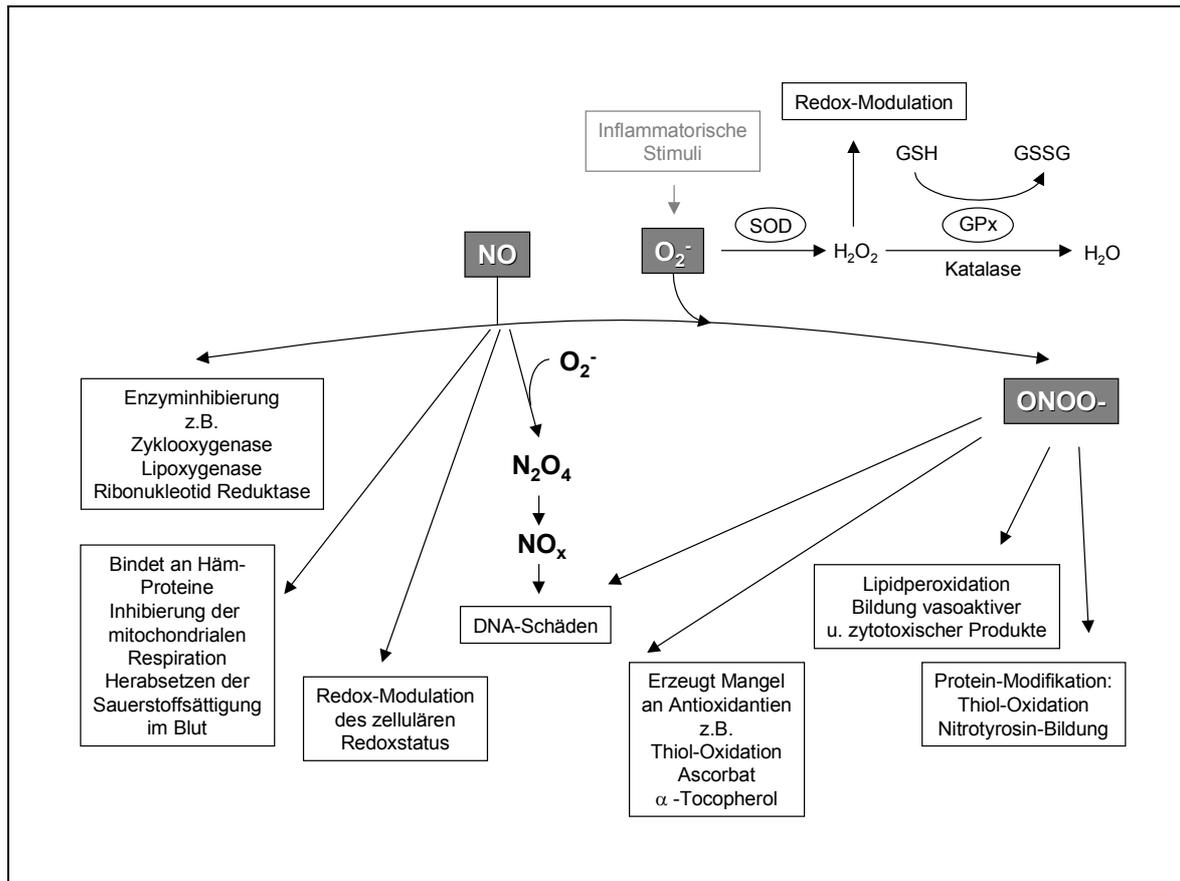
Erläuterungen siehe Text.

## 1.2 Oxidativer Stress

Unter reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) versteht man eine Gruppe von Molekülen, die molekularen Sauerstoff enthalten, und die entsprechenden Derivate, die in allen aeroben Zellen gebildet werden. Eine übermäßige Produktion von ROS und damit eine Überlastung der endogenen antioxidativen Abwehrmechanismen führt zu einer Oxidation von biologischen Makromolekülen wie DNA, Proteinen, Kohlenhydraten und Lipiden. Diese Vorgänge werden auch als „oxidativer Stress“ bezeichnet.

Zu den wichtigsten ROS gehören Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), Hydroxylradikal ( $\text{OH}\bullet$ ), Lipidperoxid ( $\text{ROO}\bullet$ ), Superoxid ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ), Stickstoffmonoxid ( $\text{NO}\bullet$ ) und Peroxynitrit ( $\text{ONOO}^-$ ). Diese Moleküle verfügen entweder über ein ungepaartes Elektron und sind daher sehr reaktiv oder haben anderweitig oxidierende Eigenschaften. Meist kommt es zu einer Kettenreaktion mit den Reaktionspartnern, die zu einer Entstehung von weiteren ROS und irreparablen Schäden in Lipiden oder Proteinen führt.

Abb. 2 zeigt die wichtigsten Interaktionen und Mechanismen bei oxidativem Stress mit Schwerpunkt auf Superoxid, NO und Peroxynitrit.



**Abb. 2:** Interaktionen und Mechanismen bei oxidativem Stress

### 1.2.1 Rolle von NO und therapeutische Intervention

Das Gas Stickstoffmonoxid wird von Monoxygenase-Enzymen, den Stickstoffmonoxid-Synthasen, hergestellt.

Die Enzymfamilie der Stickstoffmonoxid-Synthasen wird bei Säugern aus drei Isoformen gebildet: die induzierbare (iNOS), neuronale (nNOS) und endotheliale NOS (ecNOS). NOS Isoformen katalysieren als Homodimere die Oxidation von L-Arginin zu NO und L-Citrullin in Abhängigkeit von NADPH (Griffith und Stuehr, 1995; Marletta, 1994; Masters *et al.*, 1996). NOS Monomere bestehen aus einer Oxidoreduktase- und einer Oxygenase-Domäne. Die Reduktase-Domäne ist homolog zur Cytochrom-P450-Reduktase und enthält Bindestellen für NADPH, FAD und FMN (Bredt *et al.*, 1991; Wang *et al.*, 1997). Die Oxygenase-Domäne besitzt Bindestellen für das Substrat L-Arginin, die Häm prosthetische Gruppe und Tetrahydrobiopterin ( $BH_4$ ). Die Bildung stabiler Homodimere benötigt strukturelle

Elemente in der Oxygenase-Domäne und ist ein BH<sub>4</sub>-, Substrat- und Hämgruppen-abhängiger Prozess (Ghosh *et al.*, 1997; Klatt *et al.*, 1996; List *et al.*, 1997).

Bei oxidativem Stress kommt es durch die Induktion der iNOS in verschiedenen Zelltypen zu einer stark erhöhten Produktion von NO. Nach dem entsprechenden Stimulus (wie z.B. LPS, TNF- $\alpha$ , Interleukine, Ischämie) können folgende Zelltypen im Herzen iNOS exprimieren: Kardiomyozyten, mikrovaskuläres Endothel, endokardiale Endothelzellen, glatte Gefäßmuskelzellen, bestimmte inflammatorische Zellen wie Makrophagen und Neutrophile (Kelly *et al.*, 1996).

Wie in Abb. 2 gezeigt, hat NO neben seiner vasodilatatorischen Eigenschaft zahlreiche Reaktionsmöglichkeiten, um auf vielfältige Weise zytotoxisch zu wirken.

Um unter inflammatorischen Bedingungen die Überproduktion von NO zu verhindern, werden schon lange alternative Substrate der iNOS eingesetzt, die anstelle von L-Arginin binden, aber nicht zu NO umgesetzt werden. Die Entwicklung hoch selektiver und damit immer besserer iNOS Inhibitoren wird stetig vorangetrieben. Neben verschiedenen Isothioharnstoffen, Mercaptoethylguanidin und Aminoguanidin ist 1400W (N-(3-(Aminomethyl)benzyl)-acetamidin) eine neue Substanz, die eine sehr hohe Selektivität aufweist. Es wurde gezeigt, dass 1400W mindestens 5000-(human)/1000-(Ratte)-mal selektiver für iNOS im Vergleich zu ecNOS ist (Garvey *et al.*, 1997)

### 1.2.2 Rolle von Superoxid und therapeutische Intervention

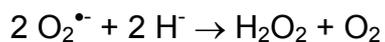
Durch die Aufnahme eines Elektrons wird aus molekularem Sauerstoff das Superoxidanion O<sub>2</sub><sup>-</sup>.

Es wird vornehmlich von Phagozyten zur Inaktivierung von Viren und Bakterien produziert, aber auch von Leukozyten, Fibroblasten und Gefäßendothelzellen (Babior und Woodman, 1990; Dhalla *et al.*, 2000). Die beteiligten Komplexe sind hier vor allem das Xanthin/Xanthin-Oxidase-System und die NADPH-Oxidase. Zudem können in jeder Körperzelle durch Elektronenfehlübertragungen in der Atmungskette Sauerstoffradikale in den Mitochondrien entstehen (Nohl, 1994). Unter bestimmten Bedingungen wie Substratmangel oder hohe

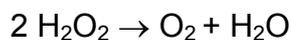
Lipoproteinkonzentrationen können NO Synthesen ebenfalls Superoxid generieren (Darley-USmar *et al.*, 1992; Xia *et al.*, 1996; Xia und Zweier, 1997)

Der Organismus besitzt drei wichtige antioxidative Enzymsysteme, die Superoxid entfernen.

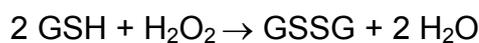
- Superoxiddismutase (SOD) existiert als zytosolische (Cu-Zn SOD), mitochondriale (MnSOD) und sezernierte oder extrazelluläre Form (ECSOD) (Squadrito und Pryor, 1998; Stralin *et al.*, 1995). Sie dismutiert Superoxid zu Wasserstoffperoxid und Sauerstoff:



- Katalase ist an Peroxysomen assoziiert und hydrolisiert das zytotoxische Wasserstoffperoxid zu Sauerstoff und Wasser:



- Wasserstoffperoxid wird in größeren Mengen effektiver von der Glutathionperoxidase umgesetzt, die vor allem im Zytoplasma zu finden ist. Sie bildet aus reduziertem Glutathion GSH die oxidierte Form GSSG:



Eine weitere Form der „Beseitigung“ von Superoxid ist eine Verbindung mit NO und daraus resultierendem Peroxynitrit, das jedoch ebenfalls zytotoxische Eigenschaften hat (vgl. auch Abb. 2). Da NO-Synthesen neben NO unter bestimmten Bedingungen (s.o.) auch Superoxid bilden können, werden sie mitunter auch als „Peroxynitrit-Synthesen“ bezeichnet (Patel *et al.*, 1999).

Die Verbindung von Superoxid und NO zu Peroxynitrit erfolgt sehr rasch ( $6,7 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) und ist damit etwa 3-mal schneller als die Reaktionsrate von Superoxid mit SOD (Thomson *et al.*, 1995).

Aus diesem Grund bietet es sich an, unter inflammatorischen Bedingungen und damit einhergehend einer starken ROS-Produktion exogen SOD zuzuführen, um einerseits vorhandene Superoxid-Radikale zu beseitigen und andererseits damit die Bildung von Peroxynitrit zu verhindern. Polyethylenglykol-gekoppelte SOD (PEG-SOD) hat eine größere Halbwertszeit im Plasma und wird von den Zellen besser aufgenommen. Es wurde unter anderem gezeigt, dass PEG-SOD gegen myokardialen I/R Schaden protektiv wirkt (Tamura *et al.*, 1988).

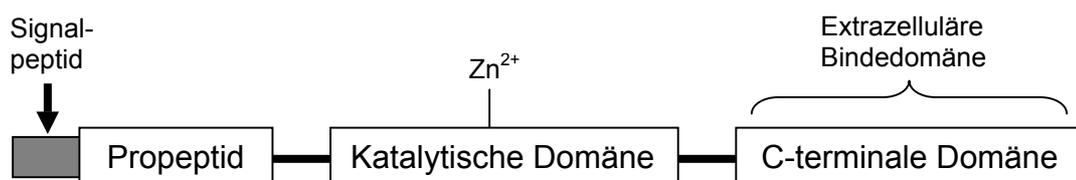
### 1.3 Matrixmetalloproteinasen

Matrixmetalloproteinasen bilden eine Familie aus Zink-abhängigen Endopeptidasen, die eine hohe Affinität zu extrazellulären Matrixbestandteilen aufweisen. Daher haben sie einen fundamentalen Einfluss auf Umstrukturierungsprozesse im Gewebe (Dollery *et al.*, 1995; Galis *et al.*, 1994).

Die für einen funktionierenden Kreislauf erforderliche intakte Gefäßwand ist bei Arteriosklerose pathologisch verändert. Bis zu 60 % eines atherosklerotischen Plaque bestehen aus fibrillärem Typ-I- und Typ-III-Kollagen (Shekhonin *et al.*, 1987). Diese Veränderungen der vaskulären Extrazellulärmatrix sind das Ergebnis der Bilanz von Kollagensynthese und -degradation durch verschiedene MMPs.

Sie werden in einer latenten Form synthetisiert (Zymogen oder pro-MMP) und unterliegen zwei Möglichkeiten der Aktivierung. Entweder wird durch Spaltung der Zink-Cystein-Bindung die katalytische Seite exponiert und das Enzym anschließend proteolytisch aktiviert (Birkedal-Hansen, 1995) oder es erfolgt eine Änderung der Konformation unter Beibehaltung des Molekulargewichtes durch oxidative Einflüsse (Okamoto *et al.*, 1997; Tyagi *et al.*, 1993).

Abb. 3 zeigt die allgemeine Struktur des MMP Zymogens.



**Abb. 3:** Allgemeine Struktur des MMP-Zymogens. Die MMP-Propeptid-Sequenz enthält ein kleines Signalpeptid, das neu synthetisierte MMPs zur Zellmembran leitet, wo sie in den extrazellulären Raum sekretiert werden. Das Propeptid enthält eine hoch konservierte Aminosäuresequenz, welche die enzymatische Latenz aufrechterhält. Die katalytische Domäne enthält drei Histidine, die das Zink-Ion binden, das für die proteolytische Aktivität notwendig ist. Die C-terminale Domäne ist für jede MMP-Spezies einzigartig, da sie die extrazellulären Bindestellen enthält und so die Spezifität des Enzyms bestimmt (verändert nach (Nagase and Okada, 1997)).

MMPs werden sowohl prä- als auch posttranskriptionell reguliert. Desweiteren kann die Regulation auch über eine Substratinteraktion oder endogene physiologische Inhibitoren (TIMPs; Tissue Inhibitor of Metalloproteinases) erfolgen (Dollery *et al.*, 1995; Vincenti *et al.*, 1996).

Tabelle 1 zeigt eine Übersicht der in dieser Arbeit behandelten MMPs.

MMP	Herkömmliche Bezeichnung und Molekulargewicht	Substrate	Aktivatoren	Inhibitoren (neben EDTA)	Induktoren	Vorkommen in Zellen/Gewebe
MMP-2	Gelatinase A Zymogen 72 kDa aktives Enzym 62 kDa	Gelatine Laminin Collagen I, IV, V, VII Fibronectin Elastin	MT-MMP	TIMP-1 TIMP-2 TIMP-3 TIMP-4	TGF $\beta$	Ubiquitär
MMP-9	Gelatinase B Zymogen 92 kDa aktives Enzym 84 kDa	Gelatine Proteoglykane Collagen IV, V, VII Fibronectin Elastin	Plasmin MMP-2	TIMP-1 TIMP-2 TIMP-3 TIMP-4 Tetrazyklin	TGF $\beta$ TNF $\alpha$ IL-1 $\beta$ LPS Phorbol EGF Ischämie	Weißer Blutkörperchen Osteoklasten Trophoblasten

**Tab. 1:** Eigenschaften von MMP-2 und MMP-9

MT-MMP=membrangebundenes MMP; TIMP="Tissue Inhibitor of Metalloproteinases"; TGF $\beta$ ="transforming growth factor  $\beta$ "; TNF $\alpha$ =Tumor-Nekrose-Faktor  $\alpha$ ; IL-1 $\beta$ =Interleukin-1  $\beta$ ; LPS=Lipopolysaccharid; EGF="epithelial growth factor"

Die Metalloproteinasen MMP-2 und MMP-9 wurden in endokardialen und subendokardialen Schichten und im interstitiellen Gewebe nachgewiesen (Tyagi *et al.*, 1993). Beide spielen eine wichtige Rolle bei der Degradation von Kollagen Typ IV, das einen Hauptbestandteil der Basalmembran darstellt, und damit beim Gefäß-"Remodeling", bei der Stabilität atherosklerotischer Plaques und bei myokardialer Ischämie/Reperfusion (I/R) (Danielsen *et al.*, 1998; Dollery *et al.*, 1995; Rajagopalan *et al.*, 1996; Takahashi *et al.*, 1990).

Es wurde gezeigt, dass Oxidantien wie Superoxid, NO und Peroxynitrit MMPs aktivieren können (Okamoto *et al.*, 1997; Rajagopalan *et al.*, 1996; Siwik *et al.*, 2001)

Die MMP Aktivität im Herzgewebe kann sich innerhalb von Sekunden bis Minuten ändern und sie tragen zu akuter myokardialer Dysfunktion bei, wie kürzlich an I/R-geschädigtem Myokard gezeigt (Cheung *et al.*, 2000).

Außerdem besteht die Möglichkeit, dass die Enzyme Signaltransduktionswege in der Zelle stimulieren, noch bevor es zu einer Veränderung der Kollagenmatrix kommt (Cleutjens, 1996). So konnten Sawicki und Kollegen zeigen, dass MMP-vermittelte Thrombozytenaggregation zu einer raschen Translokation innerhalb weniger Sekunden und Freisetzung des Enzyms aus humanen Thrombozyten führt (Sawicki *et al.*, 1997; Sawicki *et al.*, 1998).

## 1.4 Zielsetzung

Die endotheliale Dysfunktion der Koronargefäße stellt einen frühen Prozess in der Transplantat-assoziierten Atherogenese dar.

Der Einfluss von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) bei der Entstehung der endothelialen Dysfunktion im Rahmen des Ischämie/Reperfusion (I/R)-Schadens ist bereits gut untersucht, jedoch ist in diesem Zusammenhang über die Rolle der Matrixmetalloproteinasen (MMPs) als einem potenten Effektorsystem der ROS wenig bekannt.

Um Erkenntnisse über den Einfluss von MMPs auf die endotheliale Dysfunktion nach I/R zu gewinnen, wurde in einem Rattenmodell für I/R-Schaden nach allogener Herztransplantation der oxidative Stress durch Modulation des Stickstoffmonoxid-/Superoxid-Systems verringert durch:

a) die selektive Inhibierung der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) durch den synthetischen Inhibitor 1400W

und/oder

b) die kontinuierliche Gabe von Superoxiddismutase (SOD)

und die Auswirkungen dieser Therapieformen auf die Aktivität zweier extrazellulärer Matrixproteine (MMP-2 und MMP-9) und die koronare Vasomotorfunktion untersucht.

## 2. Methoden

Sofern nicht anders angegeben, wurden sämtliche Chemikalien von der Firma Sigma bezogen.

### 2.1 Wahl des Tiermodells zur in vivo Untersuchung des I/R-Schadens

Zur Untersuchung der koronaren endothelialen Dysfunktion 24 Stunden nach Herztransplantation wurde ein allogenes heterotopes Rattenmodell gewählt. Brown Norway Ratten fungierten als Spender des Organs, das in Lewis Ratten heterotop übertragen wurde. Dieses Modell ist ein chronisches Abstoßungsmodell, wobei immunologische Reaktionen erst 5-7 Tage nach Transplantation auftreten (Jiang *et al.*, 2002). Daher eignet sich dieses in-vivo-Modell, um reine I/R-Effekte nach Transplantation zu untersuchen. Da immunologische Effekte für unseren Untersuchungsrahmen von 24 Stunden ausgeschlossen werden können, war eine Immunsuppression nicht notwendig.

### 2.2 Experimentelles Protokoll

Männliche Lewis- (250-350 g) und Brown-Norway-Ratten (200-300 g) wurden von der Firma Charles River bezogen und nach den nationalen Richtlinien zur Tierhaltung untergebracht. Die Tiere erhielten Trinkwasser und Standardtrockenfutter ohne Einschränkung.

Die Empfängertiere wurden in folgende Gruppen randomisiert:

- I. Nicht transplantiert
- II. Kontrolle: physiologische Kochsalzlösung 0,5 ml/Tag s.c.
- III. selektive iNOS Inhibition: 1400 W
  - (A) 0,2 mg/kg/Tag s.c. (0,1 mg/kg b.i.d. s.c.)
  - (B) 1,0 mg/kg/Tag s.c. (0,5 mg/kg b.i.d. s.c.)
  - (C) 2,0 mg/kg/Tag s.c. (1,0 mg/kg b.i.d. s.c.)
- IV. SOD: Dem Spendertier wurde 30 min vor Explantation eine Dosis von 1000 U/kg i.v. verabreicht. Das Empfängertier erhielt nach Reperfusion einmalig
  - (A) 10 U/kg/Tag s.c.

(B) 100 U/kg/Tag s.c.

(C) 1000 U/kg/Tag s.c.

V. Kombinationstherapie 1400W + SOD

1400W 2,0 mg/kg/Tag s.c. (1,0 mg/kg b.i.d. s.c.)

SOD 1000 U/kg/Tag s.c.

Nach 24 Stunden Überlebenszeit nach Transplantation und Therapie wurden die Tiere getötet und das transplantierte Herz zu weiteren Untersuchungen verwendet. In der nicht transplantierten Gruppe wurde gesunden Brown-Norway-Ratten das Herz explantiert und zu weiteren Untersuchungen verwendet.

## 2.3 Therapeutische Intervention

### 2.3.1 Kontinuierliche selektive Modulation der iNOS durch 1400W

1400W (N-(3-(Aminomethyl)benzyl) Azetamidin) (Alexis) ist ein hoch selektiver und fest bindender Inhibitor der induzierbaren NO Synthase in vitro und in vivo. Er bindet kompetitiv an die Bindestelle für das Substrat L-Arginin und verhindert so die Bildung von NO (und Superoxid). Dabei ist 1400W mindestens 5000-(human)/1000-(Ratte)-mal selektiver für iNOS im Vergleich zu ecNOS (Garvey *et al.*, 1997)

Für die Dosis-Antwort-Bestimmung der endothelabhängigen CFR wurden drei Dosierungen verwendet (siehe 2.2 Gruppe III.(A)-(C) ).

Garvey und Kollegen beschrieben, dass 1400W in endotoxischen Ratten in einer subkutanen Dosis von 0,2-5 mg/kg die durch iNOS induzierte verzögerte Plasmadurchlässigkeit des Mikrogefäßsystems verhindert (Garvey *et al.*, 1997).

Auf dieser Beobachtung und im Vorfeld durchgeführten Dosis-Antwort-Bestimmungen basiert die für weitere Untersuchungen gewählte Dosis von 2 mg/kg/Tag (siehe 2.2 Gruppe III.(C) und V.).

### 2.3.2 Dismutation von Superoxid durch exogene SOD

SOD dismutiert Superoxid zu Sauerstoff und Wasserstoffperoxid, das dann umgehend von zellulärer Katalase zu Sauerstoff und Wasser entgiftet wird.

Um eine bessere Zellgängigkeit der exogen applizierten Superoxiddismutase zu erreichen, wird ausschließlich an Polyethylenglykol gekoppelte SOD verwendet (PEG-SOD, Sigma).

In der Literatur ist ein weites Dosisspektrum für den Einsatz von SOD *in vivo* beschrieben (500-10000 U/kg/Tag).

Mügge *et al.* untersuchten den Einfluss der SOD auf die Endothelfunktion bei arteriosklerotischen Kaninchen und konnten bei ihrer gewählten Dosis von 1000 U/kg/Tag einen protektiven Effekt auf die Vasomotorik beobachten (Mügge *et al.*, 1991).

Die Arbeitsgruppe um Becker fand Hinweise darauf, dass schon während Ischämie vor Reperfusion signifikant Superoxid durch die mitochondriale Elektronentransportkette gebildet wird (Becker *et al.*, 1999).

Aus diesem Grund wurde dem Spender 30 Minuten vor Explantation des Herzens PEG-SOD (1000 U/kg) intravenös gegeben. Für die Dosis-Antwort-Bestimmung der endothelabhängigen CFR wurden drei Dosierungen für den Empfänger verwendet (siehe 2.2 Gruppe IV.(A)-(C) ).

Für ausführlichere Untersuchungen wurde auf Grund der Dosis-Antwort-Bestimmungen und genannter Publikationen die Dosierung 1000 U/kg gewählt (siehe 2.2 Gruppe III.(C) und V.).

In der Kontrollgruppe wurde nach der Transplantation physiologische Kochsalzlösung (0,5 ml/Tag) injiziert.

## 2.4 Heterotope Herztransplantation - Etablierung der Transplantationstechnik

Die Herzen wurden in Anlehnung an das Protokoll von Ono und Lindsey (Ono und Lindsey, 1969) heterotop intraabdominal in einem allogenen Modell transplantiert (Brown-Norway- auf Lewis-Ratten).

Dieses heterotope Transplantationsmodell wurde gewählt, um ein in-vivo-Modell für Ischämie/Reperfusion etablieren zu können. Da erst nach 5-7 Tagen chronische Abstoßung auftritt werden somit reine I/R-Effekte untersucht (Jiang *et al.*, 2002).

Ein ex-vivo-Modell wie die Perfusion des Organs am Langendorff-Apparat mit physiologischen Nährlösungen hätte den Nachteil, dass der Einfluss zellulärer Blutbestandteile auf den I/R-Schaden nicht berücksichtigt würde.

### 2.4.1 Anästhesie

Es hat sich gezeigt, dass für die Experimente Diethylether keine geeignete Substanz zur Einleitung der Narkose ist. Besonders der Rattenstamm der Spendertiere (Brown Norway) reagiert äußerst empfindlich auf Diethylether, was eine Beeinträchtigung der Herzfunktion nach sich zieht.

Zunächst haben wir ausschließlich mit Ketamin (90 mg/kg) und Xylazin (5 mg/kg) anästhesiert, wie vielfach in der Literatur beschrieben. Dies führte aber zu keiner ausreichend tiefen Narkose. Die Tiere waren so wahrscheinlich nicht völlig schmerzfrei und erholten sich sehr schlecht von dem Eingriff.

Daher testeten wir verschiedenen Dosen Pentobarbital in Kombination mit Ketamin und Xylazin. Es hat sich gezeigt, dass bereits eine Dosis von 10 mg/kg in der Kombinationsnarkose ausreicht, um die Versuchstiere für etwa drei Stunden hinreichend zu betäuben.

Daher wurde von uns im folgenden ausschließlich eine Kombination aus Ketamin, Xylazin und Pentobarbital verwendet (90 mg/kg, 5 mg/kg, 10 mg/kg).

Ketamin und Xylazin können als Mischung injiziert werden, eine Beifügung von Pentobarbital würde zu einer unerwünschten Komplexbildung der Einzelsubstanzen führen. Die Injektion erfolgt mit langsamer Geschwindigkeit subkutan im Halsbereich.

### **2.4.2 Präparation des Empfängers**

Das Abdomen wird vom Sternum abwärts median bis zum Ende der Blase eröffnet, um ein ausreichend großes Präparationsfeld mit guter Sicht der Gefäße zu erhalten (Aorta, V. cava inferior, Vv. renales, A. renalis, Vv. lumbales). Kleinere Blutungen wurden elektrisch koaguliert.

Kolon und Ileum werden vorsichtig vom Magen gelöst, Bindegewebsmembranen des Ileums und des Kolons mit der Abdominalaorta durchtrennt, um den Darm aus der Bauchhöhle verlagern zu können und ein gutes Blickfeld zu gestalten. Der Darm wird in Gaze gehüllt, die regelmäßig mit warmem Wasser beträufelt wird, um ein Austrocknen und Auskühlen des Gedärms zu vermeiden.

Hierbei lässt sich die Narkose sehr gut über das Atmungsverhalten des Tieres überprüfen. Zu geringe Analgesie führt während dieser Präparationsarbeiten schnell zum Atemstillstand.

Mit Hilfe eines Wattestäbchens werden nun die V. cava inferior und die infrarenale Bauchaorta von den Nierengefäßen und Lumbalvenen getrennt (Vv. renales, A. renalis, Vv. lumbales). Auf Höhe der Einmündung der V. renalis werden die Aorta und V. cava inferior mit Hilfe einer sehr feinen gebogenen Pinzette angehoben und vorsichtig voneinander separiert. Danach werden der proximale Teil der V. cava inferior und beide distale Teile der V. cava inferior und Aorta mit einer Tourniquet-Schlinge abgebunden. Dies erfolgt vor der Abzweigung der ersten Lumbalarterie.

### **2.4.3 Präparation des Spenders**

Für die Spenderpräparation haben sich als Narkose 200 mg/kg Ketamin und 20 mg/kg Xylazin als sinnvoll erwiesen. Die Injektion erfolgt subkutan im Halsbereich. Sobald das Tier narkotisiert ist, werden 500 Einheiten Heparin zur Antikoagulation in die V. femoralis gespritzt.

Einige Minuten später wird der Thorax eröffnet und das Sternum mit Rippen kopfwärts gelegt. Das noch schlagende Herz wird umgehend mit Eis und kalter physiologischer Kochsalzlösung gekühlt und die Abdominalaorta samt Vene durchtrennt. Dann wird der Thymus abpräpariert, der über dem Herzen und den zu- und abführenden Gefäßen liegt.

Eine gebogene Pinzette wird von links unter die A. pulmonalis und Aorta geschoben und beide Gefäße angehoben. So wird der erste abzweigende Ast des Aortenbogens (Truncus brachiocephalicus) sichtbar. Dieser wird sodann durchtrennt. Mittels einer Pinzette wird das Organ am Truncus leicht aus dem Brustkorb gehoben und mit einer feinen Schere Gefäße samt Gewebe durchtrennt. Die A. pulmonalis und Aorta sollten so lang wie möglich belassen werden. Das Abklemmen der Vv. pulmonales, V. cava inferior und V. cava superior erfolgt mit Plastikwerkzeug. Dabei ist es wichtig, nicht in der Nähe des Koronarsinus zu arbeiten. Anschließend werden diese Gefäße mit 3-0 oder 4-0 Seidenfaden fest abgebunden. Dann wird das herausgelöste Herz in eiskalter physiologischer Kochsalzlösung gekühlt und die Enden der A. pulmonalis und Aorta sauber abgeschnitten, jedoch so lang wie möglich belassen.

Um die Variabilität zwischen den Experimenten zu minimieren, wurde die Ischämiezeit für alle Transplantationen auf 60 Minuten standardisiert.

#### **2.4.4 Heterotope Transplantation des Spenderherzens**

Zunächst werden die Gefäße im Empfängertier ligiert: Eine Abzweigung der Aorta (dorsal gelegen) wird von links ligiert. Eine Ligation von rechts würde später die Anfertigung der arteriellen Anastomose stören. Der proximale Teil der Aorta wird dann mit einer „Bulldog“-Klemme ligiert, anschließend das verbliebene Blut aus dem Gefäß gedrückt und die distalen Gefäßteile von Aorta und V. cava mit einer Tourniquet-Schlinge abgebunden.

Mit Hilfe eines Diamantmessers wird ein kleiner Schnitt in den ventralen Teil der Aorta gemacht und dieser mit einer sehr feinen Schere verlängert, bis er etwas größer als der Durchmesser des Spendergefäßes ist. Die Arterie wird mit einem 8-0 Prolenefaden auf beiden Seiten fixiert.

Nun erfolgt eine Spülung des Gefäßes mit physiologischer Kochsalzlösung, bis es vollständig blutleer ist. Das Gefäßlumen wird mit einem Metallstab mit abgerundeter Spitze überprüft.

Das Spenderherz wird im Bauchraum rechts positioniert, mit Eis und kalter physiologischer Kochsalzlösung gekühlt und die erste Anastomose angefertigt. Sie beginnt linksseitig der Aorta, nach drei Stichen wird das Spenderherz auf die linke Seite umgedreht und die Naht kaudal fortgeführt. Danach wird das Organ wieder

auf die rechte Seite gelegt. Dabei hat es sich als unbedingt notwendig erwiesen, nur einen hinreichend kleinen Saum des arteriellen Gewebes für die Anastomose zu nutzen und die Naht keinesfalls zu fest zu ziehen, um später eine Stenose an dieser Stelle zu vermeiden. Vor dem letzten Stich muss die Luft im Gefäß mit physiologischer Kochsalzlösung in einer 1 ml Spritze evakuiert werden.

Bevor mit der Venenanastomose begonnen werden kann, muss ein Ast der Aorta im Spenderherzen ligiert werden, der zum Thymus führt. Bei Brown-Norway-Ratten ist dieses Gefäß sehr stark ausgebildet und führt ohne Ligatur nach der Transplantation zu starkem Blutverlust, der den experimentellen Erfolg zunichte macht.

Dann wird das Blut aus der V. cava inferior entfernt und auch der proximale Teil des Gefäßes ligiert. Im Folgenden wird die V. cava inferior mit einem Diamantmesser angeritzt und der Schnitt mit einer Schere verlängert, bis er etwa 1,5 mal so lang wie der Durchmesser der A. pulmonalis ist. Die Vene wird wieder mit einem 8-0 Prolenefaden fixiert. Die Anastomose beginnt am kaudalen Ende der V. cava inferior. Der erste Stich beginnt an der A. pulmonalis und wird an der V. cava inferior weitergeführt. Der zweite Stich beginnt an der V. cava inferior von außen nach innen und wird so fortgeführt, bis der halbe Gefäßumfang erreicht ist. Dann wird ein neuer Faden verwendet, um zu starkem Zug auf das Gefäß zu vermeiden. Diesmal wird von innen nach außen an der V. cava inferior genäht.

Nach Fertigstellung der Anastomosen wird zuerst die ligierte Stelle an der proximalen Seite der V. cava inferior gelöst, danach die distalen Gefäße. Sollte Blutung zu beobachten sein, wird ein Fibrinplättchen aufgebracht und sanft auf die Anastomosen gedrückt. Dann wird der proximale Teil der Aorta freigegeben und die Anastomosen für einige Zeit leicht komprimiert. Dies hat so zu erfolgen, dass der Blutfluss nicht unterbunden wird, wohl aber Blutung aus den Anastomosen. Normalerweise ist eine Zeitspanne von einer Minute ausreichend. Die Erfahrung hat gezeigt, dass sich ein Blutverlust von mehr als einem Milliliter sehr ungünstig auf die Kondition des Tieres auswirkt. Es würde daher aus der Versuchsreihe ausgeschlossen.

Anschließend werden die Gedärme erneut mit warmem Wasser erwärmt und in den Bauchraum zurückgelegt.

Nun können die Therapiesubstanzen (physiologische Kochsalzlösung, 1400W, SOD, 1400W+SOD) subkutan verabreicht werden.

Das Peritoneum und die Haut werden mit einem 3-0 Prolenefaden geschlossen und subkutan 3 ml physiologische Kochsalzlösung (37°C) injiziert, um den Flüssigkeitsverlust auszugleichen.

Zur Schmerzbehandlung hat sich Temgesic® (Boehringer Mannheim, Deutschland) subkutan in einer Dosis von 0,1 mg als zufrieden stellend erwiesen.

## **2.5 Messung der Hämodynamik und koronaren Endothelfunktion ex vivo am Langendorff-Apparat**

Da eine in-vivo-Messung der Hämodynamik und koronaren Endothelfunktion schwer möglich ist, wurden die Herzen aus den Versuchstieren entnommen und ex vivo am Langendorff-Apparat untersucht.

### **2.5.1 Explantation und Präparation des Herzens**

Die Ratten wurden in einen Glaskasten überführt, der mit Diethylether-benetzten Papiertüchern ausgelegt war (Diethylether von Hoechst). Sobald die Tiere tief anästhesiert und schmerzfrei waren, erfolgte der Transfer auf einen verstellbaren Präparationstisch.

Die Bauchhöhle wurde eröffnet und 2000 U/kg Heparin (Braun) in die untere Hohlvene unterhalb des Zwerchfells appliziert. Dann wurde je nach Versuchstier wie nachfolgend unter Punkt a) bzw. b) beschrieben verfahren.

#### **a) Entnahme transplantierte Herzen aus dem Abdomen**

Die Gedärme wurden aus dem Bauchraum gelegt und anschließend die Bauchhöhle mit Eis in isotonischer Kochsalzlösung gekühlt. Die A. pulmonalis und Aorta des Spenderherzens wurden nahe der Anastomosen durchtrennt, das Herz entnommen und in eiskaltem modifiziertem Krebs-Henseleit-Puffer (KH) gespült.

#### **b) Entnahme nicht transplantierte Herzen aus dem Brustraum**

Das Diaphragma und die Rippen seitlich links und rechts des Brustkorbes wurden durchtrennt. Anschließend erfolgte umgehend die Kühlung des gesamten Brustinnenraumes durch Zugabe von Eis in isotonischer Kochsalzlösung.

Das Herz wurde freipräpariert (Entfernung des darüberliegenden Thymus und des Herzbeutels) und anschließend zügig herauspräpariert und in eiskaltem modifiziertem Krebs-Henseleit-Puffer (KH) gespült. Anliegendes Fettgewebe wurde entfernt.

In Tabelle 2 ist die Zusammensetzung des verwendeten Krebs-Henseleit-Puffers gezeigt.

Salze	mM
NaCl	118,0
CaCl <sub>2</sub>	2,52
KCl	4,7
MgSO <sub>4</sub>	1,64
NaHCO <sub>3</sub>	24,88
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,18
Glukose	5,55
Natrium-Pyruvat	2,0

**Tab. 2:** Zusammensetzung Krebs-Henseleit-Puffer (KH), modifiziert

### 2.5.2 Grundsätzliches zur retrograden Perfusion nach Langendorff unter Konstant-Druck Bedingung

Diese Methode erlaubt die Untersuchung physiologischer Parameter unter Beobachtung von Hämodynamik und Koronarfluss an isoliert perfundierten Herzen. Das Organ wird nach Präparation aus dem Versuchstier über den Aortenstumpf retrograd mit einer künstlichen physiologischen Nährlösung (z. B. Krebs-Henseleit-Puffer) perfundiert. Dabei schlägt der linke Ventrikel leer, es werden lediglich die Koronarien, der rechte Vorhof und die rechte Hauptkammer mit Puffer durchspült.

Diese Methode lässt sich sowohl unter konstanten Fluss- als auch Druckbedingungen durchführen. Wir verwendeten bei den Experimenten einen konstanten Druck von 70 mmHg und erfassten mit den Messgeräten die Änderungen des Koronarflusses.

### 2.5.3 Technischer Aufbau und Funktionseinheiten des Langendorff-Apparates

Die Versuchsanordnung wurde im Rahmen dieser Arbeit aus Bausteinen der Firma Hugo Sachs Elektronik (March-Hugstetten) zusammengestellt und ein Protokoll für die Versuchsanforderungen erarbeitet.

Der verwendete Aufbau ist in Abb. 4 schematisch dargestellt und besteht aus folgenden Teilen:

Der Oxygenator ist ein geschlossenes System, dessen Druck im Inneren den Perfusionsdruck für das Herz repräsentiert. Der Innenteil des temperierbaren doppelwandigen Glasgefäßes ist kugelig ausgebuchtet, wodurch eine große Oberfläche entsteht. Das Gasgemisch Carbogen (95 % O<sub>2</sub>/5 % CO<sub>2</sub>) wird im unteren Bereich des Oxygenators eingeleitet und verlässt ihn durch ein Röhrchen im Schleuderscheiben-Modul auf der Oberseite via eines Gottlieb-Ventils (Überdruck-Ventil-Tauchrohr). Die Oxygenierung wird in diesem System nicht mittels Gasdurchperlung erzeugt, sondern ähnlich wie im Scheibenoxxygenator einer Herz-Lungen-Maschine durch einen dünnen Flüssigkeitsfilm auf einer großen Oberfläche.

Der Gasdruck im System wird mittels eines Gottlieb'schen Ventiles manuell eingestellt, indem ein verschiebbares Eintauch-Rohr mehr oder weniger tief in Wasser eingetaucht wird.

Der Flüssigkeitspegel und damit die Menge des Perfusates im Oxygenator wird mittels einer Niveauelektrode und eines elektronischen Reglers (LLC) in Verbindung mit einer Pumpe auf konstantem Niveau gehalten. Das Perfusat wird von oben in den Oxygenator eingepumpt und trifft dort auf die rotierende Schleuderscheibe, so dass es fein verteilt wird und an der Innenwandung als dünner Film nach unten fließt. Dabei erwärmt es sich und wird mit Sauerstoff gesättigt.

Das oxygenierte Perfusat wird durch einen Wärmeblock geleitet und über die Aortenkanüle dem Herzen zugeführt. Ein Blasenfalle, direkt vor der Aortenkanüle

plaziert, fängt eventuell im Perfusat vorhandene Gasbläschen ab, bevor sie in die Koronargefäße gelangen können.

Hier befindet sich auch der Anschluss für einen Druckaufnehmer (ISOTEC) für die Messung des tatsächlichen Perfusionsdruckes.

Der Koronarfluss wird aus der Ein- und Auszeit der Pumpe und deren Förderrate errechnet.

Die Apparatur zur isovolumetrischen Messung des Herzinnendruckes („LVP“) besteht aus einem ISOTEC Druckaufnehmer mit Metallkatheter und Latexballon, Dreiwegehahn und Spindelspritze. Der Latexballon wird über den Metallkatheter im linken Ventrikel des Herzens platziert. Der Druckabnehmer selbst ist mittels eines Höhenfeintriebes vertikal verschiebbar, so dass sich die Höhenlage des Ballons im Ventrikel gut justieren lässt. Mit Hilfe der Spindelspritze wird der diastolische Vordruck eingestellt (bei Ratten üblicherweise 12 mmHg).

Die Herzkammer (Organbad) besteht aus einem temperierten doppelwandigen Glasgefäß und kann von unten über das montierte Herz geschoben werden, um die konstante Benetzung des Organs mit Perfusat zu gewährleisten.

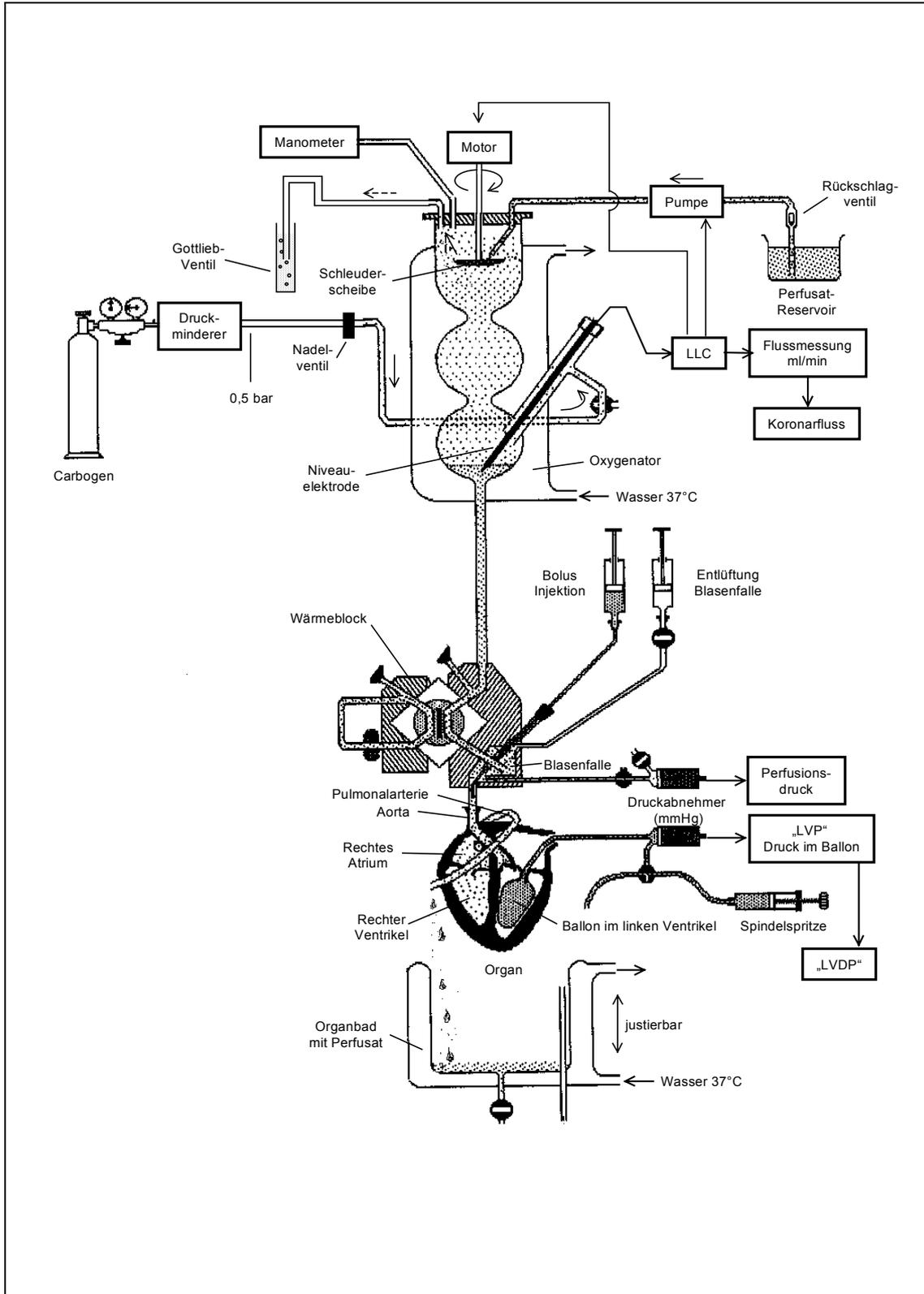


Abb. 4: Schematische Darstellung der verwendeten Langendorff-Apparatur

### 2.5.4 Fixierung des Organs am Langendorff-Apparat

Die Aorta wurde an der Aortenkanüle fixiert und das Organ an die Langendorff-Apparatur transferiert. Dazu wird der Perfusionsdruck kurzzeitig auf 0 mmHg reduziert, um Schäden am Organ während des Anbringens der Aortenkanüle am Gerät zu vermeiden.

Danach erfolgte die sofortige Einstellung des Perfusionsdruckes auf 70 mmHg und retrograde Perfusion mit KH-Puffer bei 37°C. Hierdurch nimmt das Organ sofort seine Funktion wieder auf und beginnt zu kontrahieren. Der Puffer wurde mittels eines 80 µm Filters von ungelösten Bestandteilen befreit und mit Carbogen (95 % O<sub>2</sub>/5 % CO<sub>2</sub>) begast.

Mit Hilfe des Organbades wird das Herz optimal temperiert und kann submers, in eingetauchtem Zustand arbeiten.

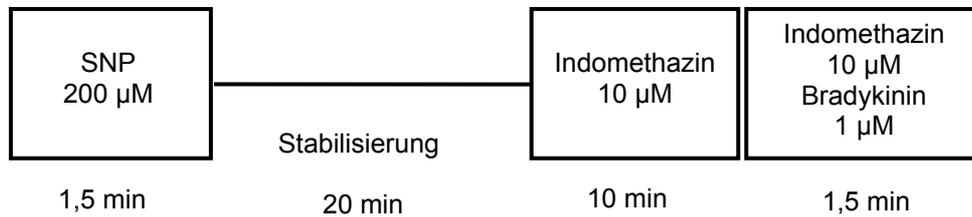
Die Herzen schlugen zunächst mit einer Spontanfrequenz und wurden gegebenenfalls elektrisch auf 300 bpm stimuliert.

Ein mit einem Druckabnehmer gekoppelter Latexballon wurde durch den linken Vorhof eingeführt und in der linken Hauptkammer positioniert. Somit konnten kontinuierlich die Herzrate, der linksventrikuläre Druck, der linksventrikuläre enddiastolische Druck, max. +/- dP/dt und linksventrikulär entwickelter Druck gemessen werden. Das Ballonvolumen wurde bei jedem Versuch auf einen initialen enddiastolischen Druck von 12 mmHg eingestellt. Der Koronarfluss wurde kontinuierlich durch Berechnung der Ein- und Auszeit der Pumpe und deren Förderrate errechnet.

### 2.5.5 Bestimmung der koronaren Vasomotorik

In Anlehnung an Veröffentlichungen von Ali, Whitman, Sitniewska (SNP), Fulton, Danser, Davidson, Veronneau (Indomethazin), Pearl (Bradykinin) und eigene Vorarbeiten wurde das in Abb. 5 gezeigte Schema zur Bestimmung der Vasomotorik erstellt (Ali *et al.*, 1998; Danser *et al.*, 1998; Davidson und Eldemerdash, 1990; Fulton *et al.*, 1996; Pearl *et al.*, 1994; Sitniewska *et al.*, 2000; Veronneau *et al.*, 1997; Whitman *et al.*, 1997).

Für die vasoaktiven Substanzen wurde in Vorversuchen die geeignete Dosis zur Erzielung maximaler Effekte ermittelt.



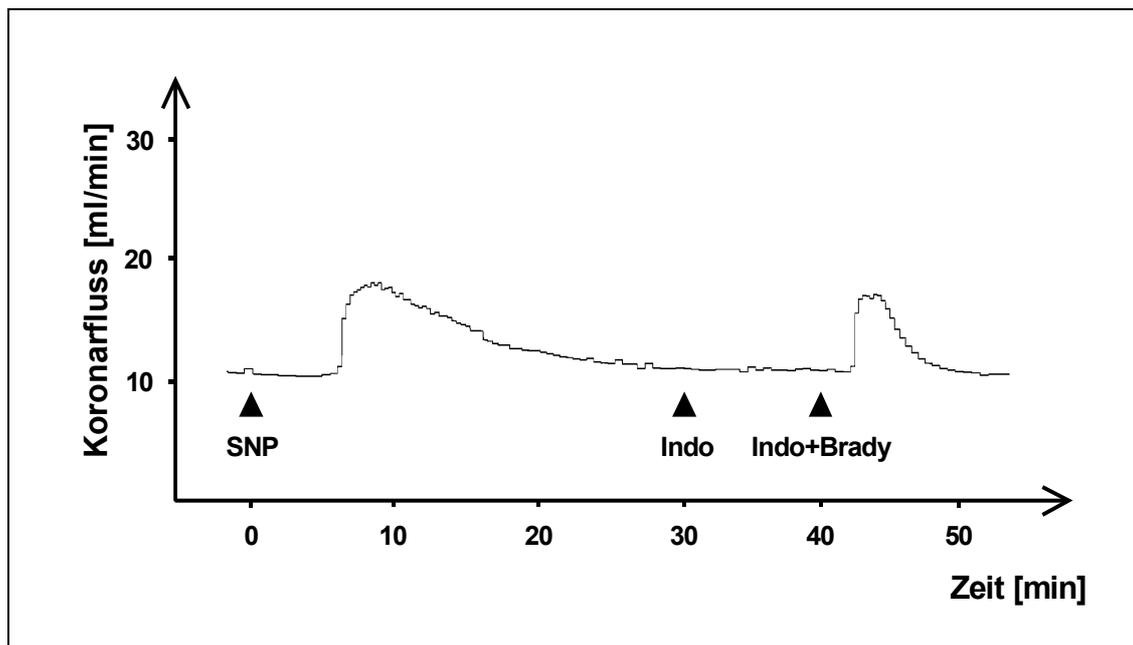
**Abb. 5:** Zeitschema zur Bestimmung der endothelunabhängigen und -abhängigen Vasomotorik am Langendorff-Apparat. Die Pharmaka wurden in KH Puffer gelöst und über die Perfusatzuleitung für die angegebene Zeitspanne infundiert.

SNP: Natrium-Nitroprussid

Zur Bestimmung der endothel-unabhängigen Vasomotorik wurde für 1,5 Minuten Natrium-Nitroprussid (200 µM) infundiert und die maximale Koronargefäßdilataion bestimmt. Natrium-Nitroprussid wirkt durch spontane chemische Spaltung der Ausgangssubstanz als NO-Donor und kann so direkt an der glatten Gefäßmuskulatur angreifen.

Danach erfolgte eine 20 minütige Stabilisierungsphase. Dann wurde für 10 Minuten Indomethazin (10 µM) (Blockierung der Zyklooxygenase) und für 1,5 Minuten Indomethazin und Bradykinin (1 µM) infundiert, um die endothel-abhängige Vasomotorik zu ermitteln. Bradykinin wirkt rezeptorvermittelt an den Endothelzellen und stimuliert diese zur NO-Freisetzung über die endotheliale NO-Synthase. Eine Teilwirkung durch EDHF kann jedoch nicht ausgeschlossen werden.

Abb. 6 zeigt stellvertretend den Zeitverlauf des Koronarflusses unter Einfluss der verwendeten Substanzen zur Bestimmung der Vasomotorik.



**Abb. 6:** Zeitverlauf des Koronarflusses in Abhängigkeit von der Infusion vasoaktiver Substanzen. SNP: Natrium-Nitroprussid; Indo: Indomethazin; Brady: Bradykinin

## 2.6 Gewebegewinnung und -aufbewahrung

Nach Beendigung des Experimentes wurden die Vorhöfe und der rechte Ventrikel entfernt. Aus dem linken Ventrikel wurden zwei 2 mm dicke Ringe und 100 mg Portionen geschnitten und entweder in flüssigem Stickstoff gefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert oder in 4%igem, gepufferten Formalin (Fischer) über Nacht fixiert, über eine aufsteigende Alkoholreihe dehydriert und in Paraffin eingebettet.

## 2.7 Nachweis von iNOS Protein mittels Western Blot

Vorversuche hatten gezeigt, dass NO-Synthasen, insbesondere iNOS, im Herzgewebe von Ratten nur schwer im Western Blot nachweisbar sind. Trotz der hohen Sensitivität der Methode ist unter normalen Aufbereitungsbedingungen des Gewebes kein zufrieden stellendes Signal detektierbar.

Aus diesem Grund haben wir das Gewebehomogenat im Vorfeld einer Aufreinigung unterzogen, bei der  $\text{NADP}^{+}$ -abhängige Dehydrogenasen

angereichert werden (NO-Synthasen enthalten in ihrer Reduktase-Domäne eine NADPH-Einheit). Auf diese Weise können im Western Blot aussagekräftige Signale für das iNOS Protein erzielt werden.

### **2.7.1 Anreicherung der NO-Synthasen mittels 2'5 ADP-Sepharose 4B**

Die Sepharose (Amersham Pharmacia) wurde gemäß den Herstellerangaben vorbereitet und in Homogenisierpuffer (0,1 mM EDTA, 0,5 M DTT, 10 µg/ml Leupeptin, 25 µg/ml Phosphoramidon, 100 µg/ml Aprotinin in 50 mM Tris pH 7,5) bei 4 °C gelagert.

100 mg Herzgewebe wurde in 1 ml Puffer auf Eis homogenisiert (Polytron PT 1200, Kinematika, Schweiz) und die Proteinkonzentration bestimmt (Bradford-Methode, Biorad).

Zwei Milligramm Gesamtprotein wurden mit NP 40 (Tergitol) mit einer Endkonzentration von 0,1 % versetzt. Dieser Ansatz wurde für zwei Stunden bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde für zwei Minuten bei 13 000 rpm zentrifugiert und der Überstand in ein neues Gefäß überführt.

Nach Zugabe von 100 µl Sepharose wurde über Nacht bei 4°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Danach erfolgte eine Zentrifugation von 30 Sekunden bei 13 000 rpm zur Sedimentation der Sepharose.

Der Überstand wurde verworfen und der Sepharose-Niederschlag dreimal mit Homogenisierpuffer gewaschen.

100 µl SDS-PAGE–Auftragspuffer (1:6 vorverdünnt) wurden zugefügt und die Ansätze 4 Minuten gekocht, um die angereicherten Proteine von der Sepharose zu lösen.

Nach Zentrifugation bei 13 000 rpm für 30 Sekunden wurde der Überstand für die Elektrophorese verwendet.

### **2.7.2 Elektrophorese**

Die Elektrophorese wurde unter denaturierenden Bedingungen mittels eines Polyacrylamid-Gels durchgeführt (SDS-PAGE).

Um eine optimale Auftrennung der Proteine im Bereich 100-150 kDa zu erhalten, wurde das Trenngel 8%ig hergestellt. Die Tabellen 3 und 4 zeigen die Zusammensetzungen der Polyacrylamid-Gele und benötigter Puffer.

	Trenngel 8 %	Sammelgel 4 %
H <sub>2</sub> O	6,1 ml	4,7 ml
30 % Acrylamid/Bisacrylamid	2,7 ml	1,3 ml
1,5 M Tris-HCl pH 8,8	2,5 ml	/
0,5 M Tris-HCl pH 6,8	/	2,5 ml
10 % (w/v) SDS	0,1 ml	0,1 ml
10 % (w/v) APS	300 µl	300 µl
TEMED	5 µl	10 µl

**Tabelle 3:** Pipettierschema für Trenn- und Sammelgel

<b>10x Laufpuffer pH 8,3</b>	
250 mM	Tris-Base
1,92 M	Glycin
1 % (w/v)	SDS

<b>6x SDS-PAGE–Auftragspuffer</b>	
0,1 % (w/v)	Bromphenolblau
10 % (w/v)	DTT
10 % (w/v)	SDS
30 % (v/v)	Glycerin

in 0,5 M Tris-HCl pH 6,8

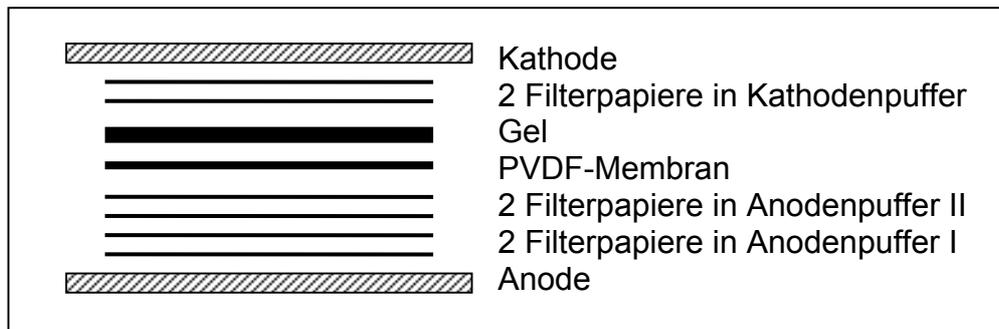
Der Laufpuffer für die Elektrophorese wurde als 10fach Konzentrat angesetzt und jeweils für den Versuch verdünnt.

**Tabelle 4:** Zusammensetzung von Lauf- und Auftragspuffer

Pro Spur wurden 10 µl des Überstandes aufgetragen und einer Elektrophorese bei 120 V für 3 Stunden unterzogen.

### 2.7.3 Transfer der Proteine auf eine Membran nach dem Semi-Dry-Verfahren

Zum Transfer der in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine auf eine PVDF Membran (Boehringer Mannheim) wurde die Blotting-Apparatur wie in Abb. 7 dargestellt zusammengebaut.



**Abb. 7.:** Anordnung der Membran und der Filterpapiere in der Blotting-Apparatur

Anodenpuffer I	
0,3 M	Tris-Base
20 % (v/v)	Methanol

Anodenpuffer II	
25 mM	Tris-Base
20 % (v/v)	Methanol

Kathodenpuffer	
40 mM	$\epsilon$ -Aminocapronsäure
0,01 % (w/v)	SDS
20 % (v/v)	Methanol

**Tabelle 5:** Zusammensetzung der Puffer für den Transfer

Je zwei Filterpapiere pro Pufferlösung wurden in der entsprechenden Lösung gebadet (siehe Tabelle 5); die PVDF-Membran wurde zuerst mit Methanol und dann mit Anodenlösung II befeuchtet.

Der Proteintransfer auf die Membran erfolgte in einer Semi-Dry-Blotting-Apparatur mit  $0,8 \text{ mA/cm}^2$  für 35 min.

#### 2.7.4 Immunologischer Nachweis mit monoklonalen Antikörpern

Alle beschriebenen Schritte wurden mit Hilfe eines 3D-Orbital-Schüttlers (Fröbel Labortechnik GmbH) durchgeführt.

Die Membran wurde der Transferapparatur entnommen und dreimal fünf Minuten in Waschpuffer gewaschen (PBS mit 0,1 % Tween als Detergenz). Anschließend erfolgte die Absättigung freier Proteinbindestellen auf der Membran durch Inkubation mit Blockierlösung bei  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  über Nacht (5 % Milchpulver in Waschpuffer). Am nächsten Tag wurde erneut mit Waschpuffer dreimal fünf Minuten gewaschen.

Die Inkubation mit dem monoklonalen Erstantikörper gegen iNOS erfolgte für 2 Stunden bei Raumtemperatur (iNOS monoklonal N39120, Transduction Laboratories; 1:5000 in Waschpuffer verdünnt).

Zur Detektion wurde der ECL Plus Westernblotting Kit verwendet (Amersham Pharmacia Biotech): Die Membran wurde mit dem Zweitantikörper für 1 Stunde bei Raumtemperatur behandelt (anti-Maus-Immunglobulin gekoppelt an Meerrettich-Peroxidase; 1:20000 in Waschpuffer verdünnt).

Nach dreimal fünfminütigem Waschen wurde das Detektionsreagenz gemäß den Herstellerangaben appliziert und die Membran für 1-3 Sekunden mit einem sensitiven Röntgenfilm in Kontakt gebracht (Amersham Hyperfilm, Amersham Pharmacia Biotech) und dieser entwickelt.

### 2.8 Superoxid-Nachweis

Die Methode wurde in Anlehnung an die von D. D. Lund et al. beschriebene Vorgehensweise für unseren Versuchsansatz optimiert (Lund *et al.*, 2000).

Der oxidative Fluoreszenzfarbstoff Hydroethidin dient hierbei als Nachweisreagenz für Superoxid/Sauerstoff-Radikale in situ. Die Zellwand ist für Hydroethidin permeabel und es wird im Zellinneren unter Anwesenheit von Superoxid/Sauerstoff-Radikalen zu Ethidiumbromid oxidiert. Ethidiumbromid interkaliert in die DNA und ist im oxidierten Zustand nicht mehr zellgängig. Einmal umgesetztes Hydroethidin verbleibt also als Ethidiumbromid in der Zelle. Durch

seine fluoreszierenden Eigenschaften kann es im Fluoreszenzmikroskop sowohl Nukleinsäure-assoziiert im Zellkern als auch im Zytoplasma detektiert werden (Tarpey and Fridovich, 2001).

25 µm Kryoschnitte wurden 30 min in Aceton fixiert und anschließend 5 min in TrisHCl pH 7,5 gewaschen. Es erfolgte eine 30 minütige Inkubation mit 8 µM Dihydroethidium (Molecular Probes bei Mo Bi Tec GmbH) in DMSO bei 37°C in einer feuchten Kammer. Nach dreimal 5 minütigem Waschen mit TrisHCl wurden die Schnitte mit Vectashield (Vektor bei Alexis) eingedeckt und im Fluoreszenzmikroskop bei 585 nm mikroskopiert.

Als Negativkontrolle (Bestimmung der Autofluoreszenz) wurden die Schnitte mit DMSO inkubiert.

Im Rahmen der Etablierung der Methode wurde als Positivkontrolle Gewebe von Ratten eingesetzt, die 10 mg/kg LPS (*E. coli*) i.v. für 6 Stunden erhalten hatten. Es wurde vielfach gezeigt, dass unter septischen Bedingungen oxidativer Stress (u.a. Entstehung von Sauerstoffradikalen) im Gewebe zu beobachten ist.

Um einen Hinweis auf die Spezifität der Methode für Superoxid-Radikale zu erhalten, behandelten wir die Proben vor Inkubation mit Hydroethidin für eine Stunde mit exogener SOD (PEG-SOD, Sigma, Taufkirchen). Dazu wurden pro Schnitt 200 U appliziert.

## 2.9 Immunhistochemie

### 2.9.1 Anfertigung von Gefrierschnitten

Frisches Gewebe wurde in 2 mm dicke Ringe geschnitten, in Tissue Tek® (Sakura) eingebettet und vorsichtig in flüssigem Stickstoff gefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

Das Gewebe wurde zur Schnitthanfertigung in flüssigen Stickstoff transferiert.

Mit einem Kryostaten (Reichert-Jung) wurden Schnitte der Dicke 5 µm angefertigt (Objekthaltertemperatur -25°C; Schneidekammertemperatur -20 °C) und auf Objektträger aufgebracht (Superfrost® Plus von Menzel-Gläser). Diese wurden staubfrei für einige Stunden bei Raumtemperatur getrocknet und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C verwahrt.

**2.9.2 Einbettung in Paraffin, Anfertigung von Paraffinschnitten**

Es wurden 2 mm dicke transmurale Ringe des linken Ventrikels aus frischem Gewebe vorbereitet und diese für sechs Stunden in 4%igem, gepufferten Formalin fixiert.

Anschließend erfolgte die Dehydrierung nach einem Standardprotokoll der Neuropathologie (automatisiert, über Nacht): aufsteigende Alkoholreihe (70 %, 80 %, 90 %, 100 %), Xylol, Aufbewahrung in flüssigem Paraffin bei 60 °C.

Am nächsten Morgen wurde das Gewebe in Paraffinblöckchen ausgegossen und bei Raumtemperatur aufbewahrt.

Mit Hilfe eines Schlittenmikrotoms (Mikrom) wurden Schnitte der Dicke 5 µm angefertigt, in eine Schale mit warmem Wasser transferiert und auf Objektträger aufgezogen.

Die getrockneten Objektträger wurden bei Raumtemperatur bis zur weiteren Verwendung verwahrt.

**2.9.3 Nachweis von Nitrotyrosin und MMP-9 in situ**

Von Paraffin-eingebettetem Gewebe wurden Schnitte der Dicke 5 µm 30 Minuten im Wärmeschrank (37 °C) getrocknet, deparaffiniert (Inkubation zweimal fünf Minuten in Xylol) und in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert (100 %, 95 %, 80 %, 70%, je zwei Minuten) und in Tris 50 mM pH 7,5 gewaschen.

Die Lokalisierung der Nitrotyrosinbildung/MMP-9 Produktion erfolgte mit einem spezifischen polyklonalen Antikörper (anti-Nitrotyrosin, Upstate/Biozol, Verdünnung 1:100; anti-MMP-9, zur Verfügung gestellt von Dr. M. R. Radomsky, Edmonton, Kanada, Konzentration 10 µg/ml), Negativkontrollen wurden unter Verwendung von Antikörperverdünnungsreagenz (Dako) anstelle des ersten Antikörpers angefertigt. Zwischen den Inkubationsschritten wurde je dreimal mit TrisHCl 50 mM pH 7,5 gewaschen. Alle Schritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

Das EnVision™ Nachweissystem (Meerrettich-Peroxidase-konjugierter Zweitantikörper) (Dako) diente zur Detektion des gebundenen Erstantikörpers.

Nach 30-minütiger Fixierung der Schnitte in Chloroform wurde die endogene Peroxidase durch eine 10 minütige Wasserstoffperoxidbehandlung (1,5 %) blockiert. Nach Waschung in Leitungswasser und TrisHCl-Puffer wurden nicht

spezifische Bindestellen mit Protein Serum Free Block (Dako) abgesättigt. Danach erfolgte die Inkubation mit dem Erstantikörper (anti-Nitrotyrosin für 45 min, anti-MMP-9 für 3 h), anschließend wurde der Sekundärantikörper (EnVision™) für 30 min appliziert. Mit dem Peroxidase Substrat Kit AEC (Vector/Alexis) erfolgte die Visualisierung der entsprechenden Proteine (Inkubation für 10 min).

Zur morphologischen Darstellung wurden die Schnitte mit Hämalaun gegengefärbt und mit 0.1 % Salzsäure differenziert.

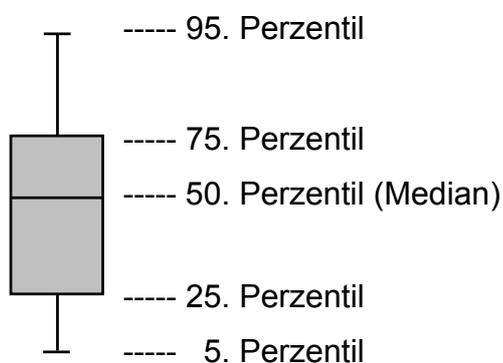
### **2.10 Zymografie mit Matrixmetalloproteinasen**

Proteine wurden auf ein 8%iges denaturierendes PAA-Gel aufgetragen, das 1 mg/ml Gelatine enthält, und elektrophoretisch aufgetrennt. Als Positivkontrolle diente eine Proteinpräparation von humanen Fibrosarcomzellen (HT1080), die mit Phorbolester stimuliert wurden und so MMP-2- und MMP-9-Aktivität aufweisen. Anschließend wurde das Gel mit Triton X-100 und Inkubationspuffer (50 mM Tris; 0,15 M NaCl; 5 mM CaCl<sub>2</sub>) gewaschen, um SDS zu entfernen. Es folgte eine Inkubation bei 37 °C für 12 oder 24 Stunden in Inkubationspuffer. Durch nachfolgende Färbung mit 0,05 % Coomassie-Brilliant-Blau-G-250-Lösung erscheinen transparente Banden an Orten gelatinolytischer Aktivität vor einem blauen Hintergrund. Die Zymogramme wurden für die densitometrische Analyse gescannt (Scan Jet 3 c scanner, Hewlett Packard) und die jeweiligen Intensitäten mittels Sigma Gel Measurement Software (Jandel Co) analysiert.

### 2.11 Statistik

Die hämodynamischen Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung angegeben. Die koronaren Flussreserven werden in Balkendiagrammen, die pro-MMP-9-Aktivitäten in Boxplots dargestellt.

Dabei wird die Häufigkeitsverteilung schematisch abgebildet, indem zwischen dem 25. und 75. Perzentil ein Kasten aufgebaut wird, in dessen Bereich 50 % der Beobachtungen fallen. Die Kennzeichnung der 5. Und 95. Perzentile vermittelt den Eindruck, wie weit die restlichen 50 % der Werte streuen (siehe Abb. 8)



**Abb. 8:** Schematische Darstellung eines Boxplots

Der Bartlett-Test wurde eingesetzt, um die Homogenität der Varianzen zu überprüfen.

Die einfaktorielle Varianzanalyse (one-way analysis of variance, ANOVA) mit anschließendem Fisher-PLSD-Test wurde zur Beurteilung der hämodynamischen Daten und koronarer Flussreserven angewendet.

p-Werte von  $< 0,05$  wurden als statistisch signifikant akzeptiert.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Linksventrikuläre Hämodynamik

Die hämodynamischen Parameter sowie die Vasomotorik wurden am isolierten, retrograd perfundierten Herzen am Langendorff-Apparat bestimmt (siehe 2.5).

Die Daten wurden in der nicht transplantierten Gruppe von sieben, in der Kontrollgruppe von acht und in den Therapiegruppen von je sechs Tieren erhoben.

Im Vorfeld wurden gesunde nicht transplantierte Spenderherzen untersucht, um einen Vergleich mit der hämodynamischen Leistung der nicht therapierten Kontrollherzen anstellen zu können. Dabei ergaben sich die in Tabelle 6 gezeigten Werte.

Tabelle 7 fasst die hämodynamischen Daten der einzelnen transplantierten Gruppen zusammen.

	Nicht transplantiert	p-Wert
HR [b/min]	291 ± 11	n.s.
LVDP [mmHg]	93 ± 6	n.s.
dP/dtmax [mmHg/s]	2184 ± 136	n.s.
dP/dtmin [mmHg/s]	-1668 ± 106	n.s.
CF [ml/min]	9,1 ± 0,6	0,0027

**Tabelle 6:** Hämodynamische Parameter gesunder, nicht transplantiertes Spenderherzen

p-Wert versus Kontrolle aus Tabelle 7; n.s. = nicht signifikant

Überprüfung der Varianzhomogenität mittels Bartlett-Test, Beurteilung der Daten mittels ANOVA und anschließend Fisher-PLSD-Test.

HR: Herzfrequenz; LVDP: links-ventrikulär entwickelter Druck; dP/dtmax: maximal positives dP/dt; dP/dtmin: maximal negatives dP/dt; CF: Koronarfluss

	Kontrolle	1400W	SOD	1400W + SOD	p-Wert
HR [b/min]	289 ± 9	277 ± 7	311 ± 5	284 ± 14	n.s.
LVDP [mmHg]	84 ± 13	109 ± 8	88 ± 10	93 ± 8	n.s.
dP/dtmax [mmHg/s]	2410 ± 305	3086 ± 218	2667 ± 296	2613 ± 198	n.s.
dP/dtmin [mmHg/s]	-1680 ± 220	-2175 ± 164	-1857 ± 214	-1814 ± 153	n.s.
CF [ml/min]	13,5 ± 1,4	11,8 ± 0,9	10,7 ± 1,0	11,1 ± 0,5	n.s.

**Tabelle 7:** *Hämodynamische Effekte von Placebo (physiologische Kochsalzlösung), kontinuierlicher iNOS Modulation (1400W) und Dismutation von Superoxid (SOD) 24 Stunden nach Transplantation*

*p-Wert versus Kontrolle; n.s. = nicht signifikant*

*Überprüfung der Varianzhomogenität mittels Bartlett-Test, Beurteilung der Daten mittels ANOVA und anschließendem Fisher-PLSD-Test.*

*HR: Herzfrequenz; LVDP: links-ventrikulär entwickelter Druck; dP/dtmax: maximal positives dP/dt; dP/dtmin: maximal negatives dP/dt; CF: Koronarfluss*

Ein Vergleich von Tabelle 6 mit den Werten der Kontrollgruppe aus Tabelle 7 ergibt keine signifikanten Unterschiede der hämodynamischen Leistung mit Ausnahme des Koronarflusses, der in der Kontrollgruppe höher ist.

Der chirurgische Eingriff einer Transplantation hat also in diesem Modell zumindest nach 24 Stunden Überlebenszeit keinen Einfluss auf die Hämodynamik des transplantierten Spenderherzens.

LVDP, HR, +/-dP/dt und Ruhefluss zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

### 3.2 Dosis-Antwort-Bestimmung von 1400W und SOD auf die endothelabhängige CFR

Die adäquate Dosis der Therapeutika für submaximale Effekte auf die koronare Flussreserve wurde durch eine Dosis-Antwort-Bestimmung beider Substanzen ermittelt (siehe 2.5.5).

Die Daten wurden in der nicht transplantierten Gruppe von sieben, in der Kontrollgruppe von acht, in den Therapiegruppen mit SOD 10 und 100 U/kg/Tag sowie 1400W 0,2 und 1 mg/kg/Tag von drei und in den Therapiegruppen mit mit SOD 1000 U/kg/Tag und 1400W 2 mg/kg/Tag von je sechs Tieren erhoben.

#### 3.2.1 Therapie mit 1400W

24 Stunden nach Transplantation ist ohne Therapie eine deutliche Einschränkung der endothelabhängigen Flussreserve zu verzeichnen (nicht transplantiert  $6,4 \pm 1,0$ ; Kontrolle  $1,7 \pm 0,4$ ;  $p < 0,0001$  vs. nicht transplantiert).

Bei einer Therapiedosis von 0,2 mg/kg/Tag 1400W ist weiterhin eine signifikante Reduktion der Flussreserve zu beobachten ( $2,8 \pm 0,3$ ;  $p = 0,0104$  vs. nicht transplantiert), wobei auch gegenüber der Kontrollgruppe noch keine signifikante Verbesserung zu verzeichnen ist.

Eine Dosis von 1 mg/kg/Tag führt zu einer signifikanten Zunahme der koronaren Flussreserve gegenüber der Kontrollgruppe ( $5,5 \pm 0,5$ ;  $p = 0,0053$  vs. Kontrolle); bereits bei diesem Therapieansatz lässt sich kein signifikanter Unterschied mehr zu nicht transplantierten Organen feststellen.

Ebenso verhält es sich mit der von uns verwendeten Dosis von 2 mg/kg/Tag, die zu einer vollständigen Wiederherstellung der endothelabhängigen koronaren Flussreserve führt ( $6,9 \pm 0,9$ ;  $p = 0,0001$  vs. Kontrolle) (vgl. Abb. 9A).

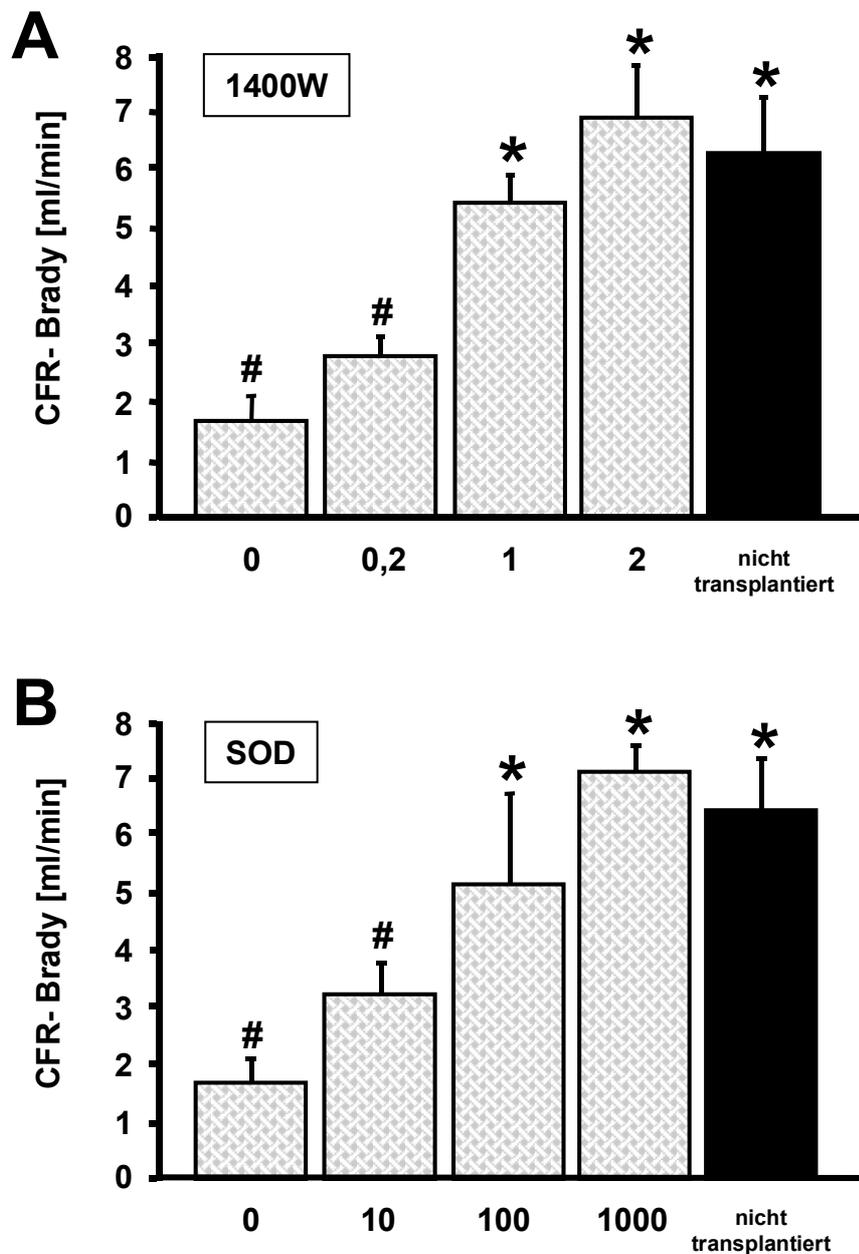
#### 3.2.2 Therapie mit SOD

Die abgestufte Therapie mit Superoxiddismutase führt bezüglich der endothelabhängigen koronaren Flussreserve zu vergleichbaren Ergebnissen wie die Behandlung mit dem selektiven iNOS Inhibitor 1400W:

Während nach Transplantation ohne SOD-Gabe die Flussreserve massiv eingeschränkt ist (nicht transplantiert  $6,4 \pm 1,0$ ; Kontrolle  $1,7 \pm 0,4$ ;  $p < 0,0001$  vs.

nicht transplantiert), findet bei 10 U/kg/Tag lediglich tendenziell eine Verbesserung statt ( $3,2 \pm 0,6$ ;  $p = 0,0163$  vs. nicht transplantiert).

Doch schon mit 100 U/kg/Tag lässt sich die koronare Flussreserve vollständig wiederherstellen ( $5,1 \pm 1,6$ ;  $p = 0,0096$  vs. Kontrolle), ebenso mit 1000 U/kg/Tag ( $7,0 \pm 0,5$   $p < 0,0001$  vs. Kontrolle) (vgl. Abb. 9B).



**Abb. 9:** Endothelabhängige Flussreserve (CFR-Brady) in Abhängigkeit von der Therapiedosis: (A) 1400W in mg/kg/Tag; (B) SOD in U/kg/Tag

Die angegebene Dosis von „0“ entspricht der Kontrollgruppe; zum Vergleich ist die Flussreserve von gesunden, nicht transplantierten Spenderorganen angegeben.

\* $p < 0,05$  versus Kontrolle

# $p < 0,05$  versus nicht transplantiert

Überprüfung der Varianzhomogenität mittels Bartlett-Test, Beurteilung der Daten mittels ANOVA und anschließendem Fisher-PLSD-Test.

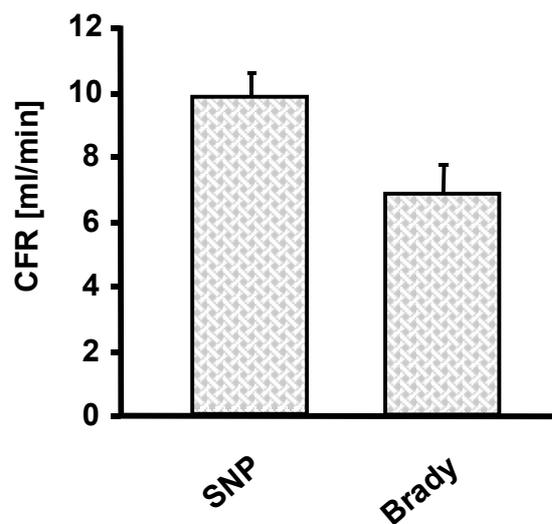
Vorversuche mit einer subtherapeutischen Kombinationstherapie von 1400W 0,2 mg/kg/Tag und SOD 10 U/kg/Tag führten zu keiner deutlichen Verbesserung der endothelabhängigen koronaren Flussreserve. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden für weiterführende Experimente die folgenden Dosierungen verwendet:

1400W: 2,0 mg/kg/Tag s.c. (1,0 mg/kg b.i.d. s.c.)

SOD: Dem Spendertier wurde 30 min vor Explantation eine Dosis von 1000 U/kg i.v. verabreicht. Das Empfängertier erhielt nach Reperfusion 1000 U/kg/Tag s.c.

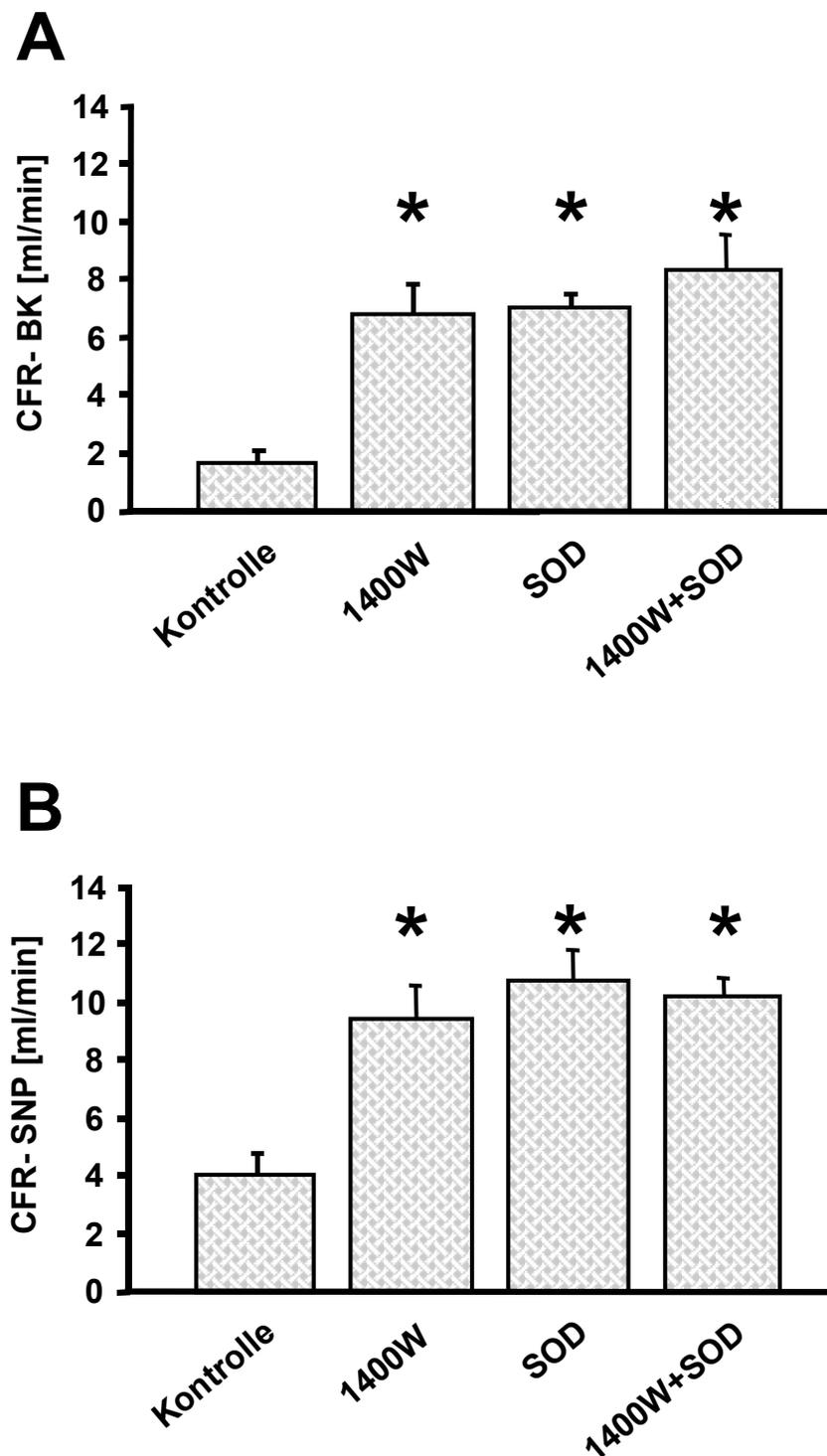
### 3.3 Endothelabhängige und –unabhängige Vasomotorfunktion

Abb. 10 und 11 zeigen die endothelabhängigen (CFR-Brady) und endothelunabhängigen (CFR-SNP) koronaren Flussreserven (siehe 2.5.5).



**Abb. 10:** Koronare Flussreserve (CFR) gesunder, nicht transplantierter Spenderherzen nach Stimulation mit SNP (endothelunabhängig) und Bradykinin (endothelabhängig).

SNP: Natrium-Nitroprussid; Brady: Bradykinin



**Abb. 11:** Endothelabhängige (CFR-Brady) (A) und endothelunabhängige (CFR-SNP) (B) koronare Flussreserven der Therapiegruppen.

Überprüfung der Varianzhomogenität mittels Bartlett-Test, Beurteilung der Daten mittels ANOVA und anschließendem Fisher-PLSD-Test; \* $p < 0,05$  versus Kontrolle

Dabei findet sich eine massive Einschränkung sowohl der endothelabhängigen wie auch der –unabhängigen koronaren Flussreserve bei transplantierten Kontrollherzen im Vergleich zu nicht transplantierten Spenderorganen (CFR-Brady: nicht transplantiert  $6,8 \pm 0,9$  vs. Kontrolle  $1,7 \pm 0,4$ ,  $p < 0,0001$ ; CFR-SNP: nicht transplantiert  $9,8 \pm 0,7$  vs. Kontrolle  $4,0 \pm 0,7$ ,  $p < 0,0001$ )

Der selektive iNOS-Inhibitor 1400W und SOD verbesserten die koronare Flussreserve als Antwort auf endothelabhängige (Bradykinin) und endothelunabhängige (SNP) Stimuli in allen Therapiegruppen.

CFR-Brady: Kontrolle  $1,7 \pm 0,4$ ; 1400W  $6,9 \pm 0,9$   $p < 0,0001$  vs. Kontrolle; SOD  $7,0 \pm 0,5$   $p < 0,0001$  vs. Kontrolle; 1400W+SOD  $8,3 \pm 1,2$   $p < 0,0001$  vs. Kontrolle  
CFR-SNP: Kontrolle  $4,0 \pm 0,7$ ; 1400W  $9,4 \pm 1,2$   $p = 0,0001$  vs. Kontrolle; SOD  $10,7 \pm 1,1$   $p < 0,0001$  vs. Kontrolle; 1400W+SOD  $10,2 \pm 0,8$   $p < 0,0001$  vs. Kontrolle

Die Transplantation per se führt zu einem Anstieg des Ruheflusses (siehe 3.1) und damit zu einer Abnahme der koronaren Flussreserve. Die Maximalflüsse unterschieden sich jedoch nicht zwischen nicht transplantierten Spenderorganen und Kontrollherzen ( $CF_{max}$ -Brady: nicht transplantiert  $15,8 \pm 1,3$  vs. Kontrolle  $15,2 \pm 1,4$ ,  $p = n.s.$ ;  $CF_{max}$ -SNP: nicht transplantiert  $18,9 \pm 0,9$  vs. Kontrolle  $17,5 \pm 1,6$ ,  $p = n.s.$ )

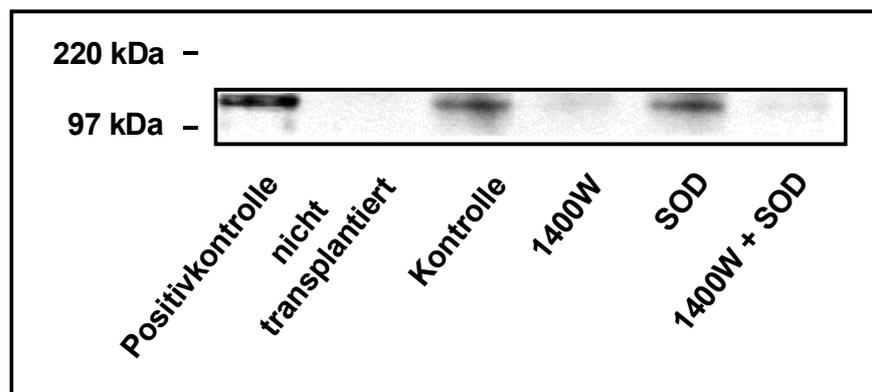
Die Therapie mit 1400W und SOD führte größtenteils sogar zu einer signifikanten Steigerung des Maximalflusses:

$CF_{max}$ -Brady: Kontrolle  $15,2 \pm 1,4$ ; 1400W  $18,7 \pm 0,8$   $p = 0,045$  vs. Kontrolle; SOD  $17,7 \pm 0,9$   $p = n.s.$  vs. Kontrolle; 1400W+SOD  $19,4 \pm 1,3$   $p = 0,018$  vs. Kontrolle  
 $CF_{max}$ -SNP: Kontrolle  $17,5 \pm 1,6$ ; 1400W  $21,2 \pm 0,8$   $p = 0,043$  vs. Kontrolle; SOD  $21,4 \pm 1,5$   $p = 0,036$  vs. Kontrolle; 1400W+SOD  $21,3 \pm 0,8$   $p = 0,041$  vs. Kontrolle

### 3.4 Nachweis des iNOS Proteins mittels Western Blot

Mit Hilfe eines monoklonalen spezifischen Antikörpers gegen iNOS wurde der Einfluss der selektiven iNOS Inhibierung durch 1400W und SOD Therapie auf die iNOS-Protein-Produktion untersucht (siehe 2.7).

Die Ergebnisse der Autoradiografie sind repräsentativ in Abb. 12 gezeigt. Die iNOS-Proteinproduktion wurde bei drei Versuchstieren pro Gruppe untersucht und der Versuch je dreimal wiederholt.



**Abb. 12:** iNOS-Proteinproduktion: Repräsentativer Western Blot mit aufgereinigten Proteinextrakten.

Zur Abschätzung der Proteingröße von iNOS wurden die Signale eines Proteingrößenstandards in der Abbildung markiert (220 kDa, 97 kDa)

Die Positivkontrolle zeigt ein deutliches Signal bei etwa 130 kDa, der erwarteten Größe für das iNOS-Protein.

In nicht transplantiertem Gewebe lässt sich iNOS-Protein im Western Blot nicht nachweisen, wohingegen in der Kontrollgruppe eine starke Induktion zu verzeichnen ist. Die Therapiegruppe mit SOD zeigt ebenfalls ein deutliches und mit der Kontrollgruppe vergleichbares Signal für das iNOS Protein.

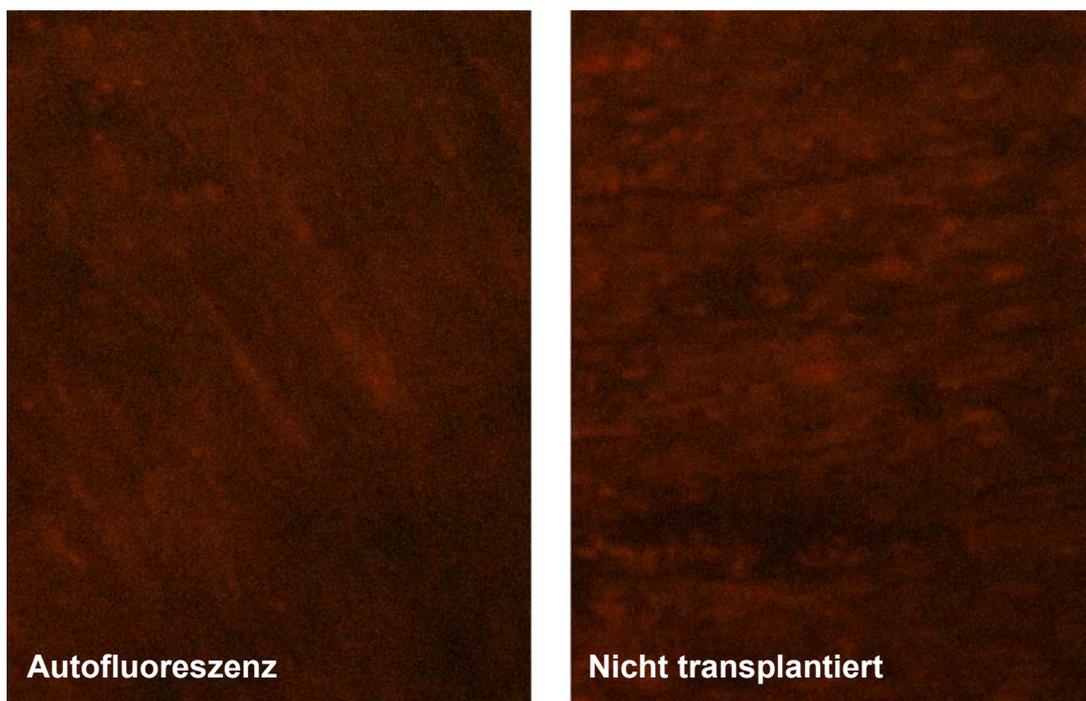
Die selektive Inhibierung der iNOS durch 1400W und die kombinierte Therapie mit 1400W und SOD dagegen führen zu einer starken Reduktion der iNOS Produktion. Sie ist im Western Blot kaum mehr nachzuweisen.

### 3.5 Einfluss der Therapie mit 1400W und SOD auf die Superoxid-Bildung

Mit Hydroethidin als Nachweisreagenz für Superoxid werden prinzipiell auch andere Sauerstoff-Spezies neben Superoxid-Radikalen nachgewiesen. Benov et al. publizierten allerdings, dass Superoxid im Gegensatz zu Sauerstoff oder Wasserstoffperoxid Hydroethidin sehr schnell zu Ethidium oxidiert (Benov *et al.*, 1998). Bindokas et al. wiesen zudem nach, dass Hydroethidin weder durch Hydroxyl-Radikale, Stickstoffmonoxid, Peroxynitrit und Hypochlorit noch durch Singlet-Sauerstoff oxidiert wird (Bindokas *et al.*, 1996). Ebenso berichtet Tarpey über eine relative Spezifität für Superoxid (Tarpey und Fridovich, 2001).

In eigenen Vorversuchen konnte die Fluoreszenz im Gewebe (Anwesenheit von durch Sauerstoff-Radikale oxidiertes Hydroethidin) jedoch durch die Aktivität exogen applizierter SOD auf die Intensität einer Negativkontrolle reduziert werden. Daraus ist zu schließen, dass zumindest für die Bedingungen in unseren Versuchen von einer relativ großen Spezifität der Methode für Superoxid ausgegangen werden kann (siehe 2.8).

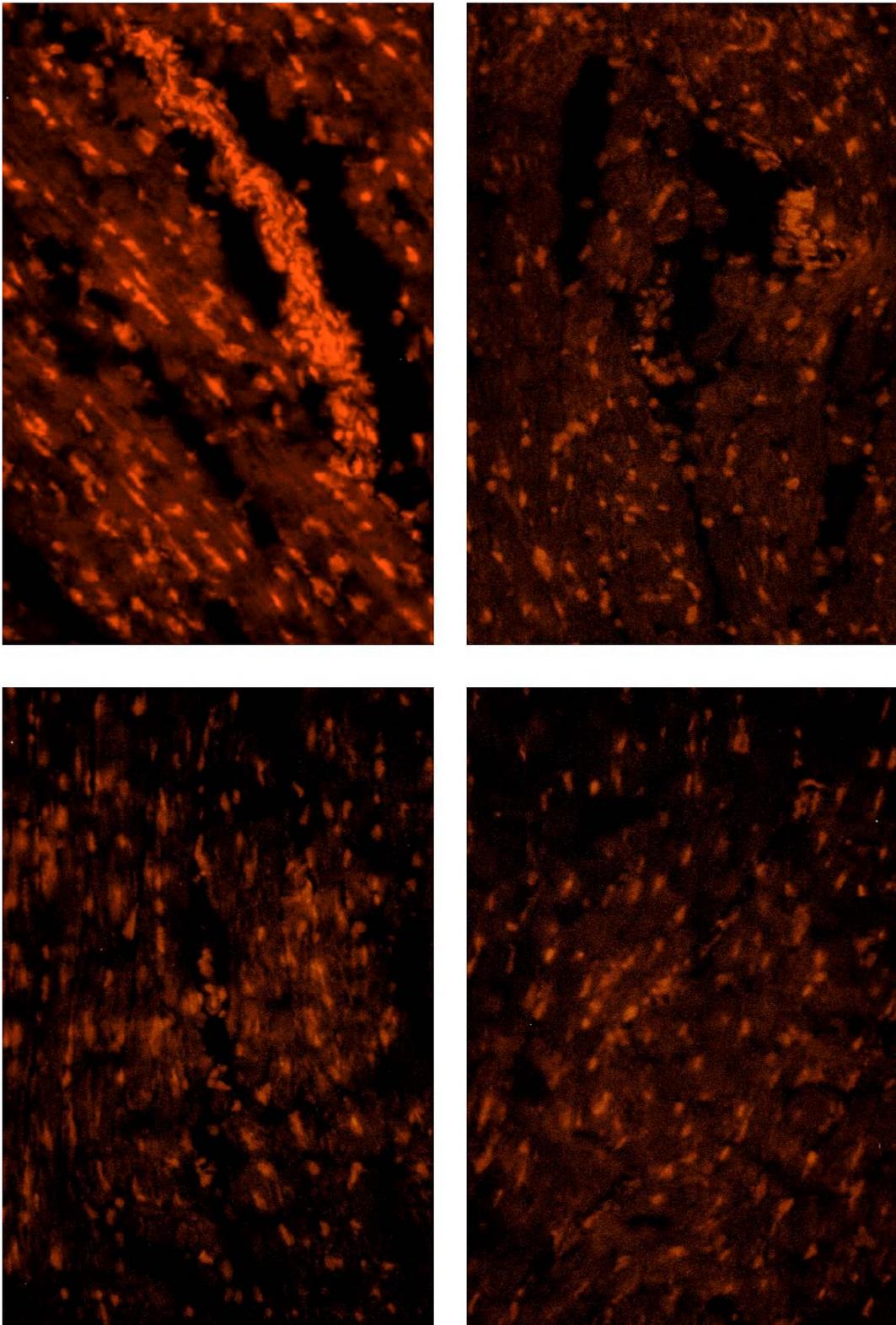
Abb. 13 zeigt die Autofluoreszenz der Gewebeschnitte (Inkubation mit DMSO anstelle von Hydroethidin) und im Vergleich dazu Gewebe eines nicht transplantierten Herzens, das mit Hydroethidin inkubiert wurde. Dabei lässt sich kein deutlicher Unterschied zwischen beiden Färbungen darstellen. Es sind lediglich zelluläre Strukturen im nicht transplantierten Gewebe erkennbar.



**Abb. 13:** *In situ* Nachweis von Superoxid mittels Hydroethidin-Färbung. Darstellung der Autofluoreszenz des Gewebes und Färbeintensität von gesundem, nicht transplantiertem Spendergewebe; Vergrößerung 200x

In Abb. 14 sind repräsentative Gewebeschnitte für den Superoxid-Nachweis durch oxidiertes Hydroethidin gezeigt. Der Versuch wurde mit Gewebe von drei Tieren pro Gruppe durchgeführt und dreimal wiederholt.

In der nicht therapierten Kontrollgruppe findet sich ein starkes Fluoreszenzsignal vor allem in Gefäßen, infiltrierenden Zellen sowie in Myozyten. Im Gegensatz dazu zeigen Gewebeproben der drei Therapiegruppen eine stark reduzierte Fluoreszenz. Ebenfalls hat die kombinierte Therapie mit 1400W und SOD keine synergistischen Effekte.



**Abb. 14:** *In situ* Nachweis von Superoxid mittels Hydroethidin-Färbung.  
Darstellung der Fluoreszenz in der Kontroll- und den drei Therapiegruppen;  
Vergrößerung 200x

### **3.6 Einfluss der Therapie mit 1400W und SOD auf die Nitrotyrosin- und MMP-9-Expression**

Die Färbungen wurden von 4 bis 6 Tieren pro Gruppe durchgeführt und dreimal wiederholt (siehe 2.9.2/2.9.3).

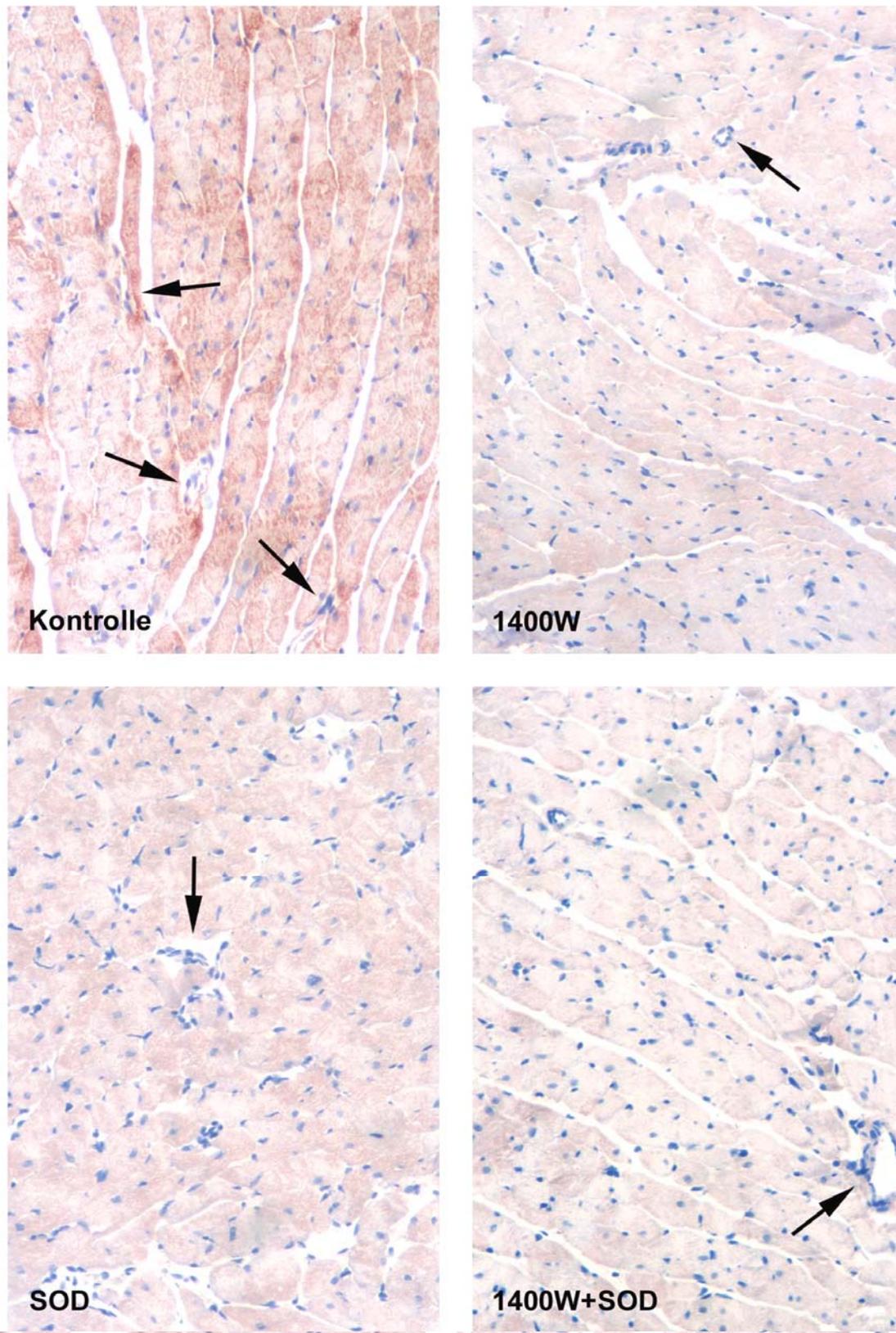
Nitrotyrosin als nachweisbares Endprodukt der Aktivität von Peroxynitrit im Gewebe wurde immunhistochemisch in Myozyten und in der perivaskulären Region intramyokardialer Gefäße detektiert (Abb. 15).

Im Gegensatz zu Gewebe der Kontrollgruppe fand sich in allen drei Therapiegruppen eine eindeutig reduzierte Färbung für Nitrotyrosin in Myozyten. Zudem zeigte hier die perivaskuläre Region intramyokardialer Gefäße keine spezifische Reaktivität für Nitrotyrosin-Antikörper (Pfeile in Abb. 15).

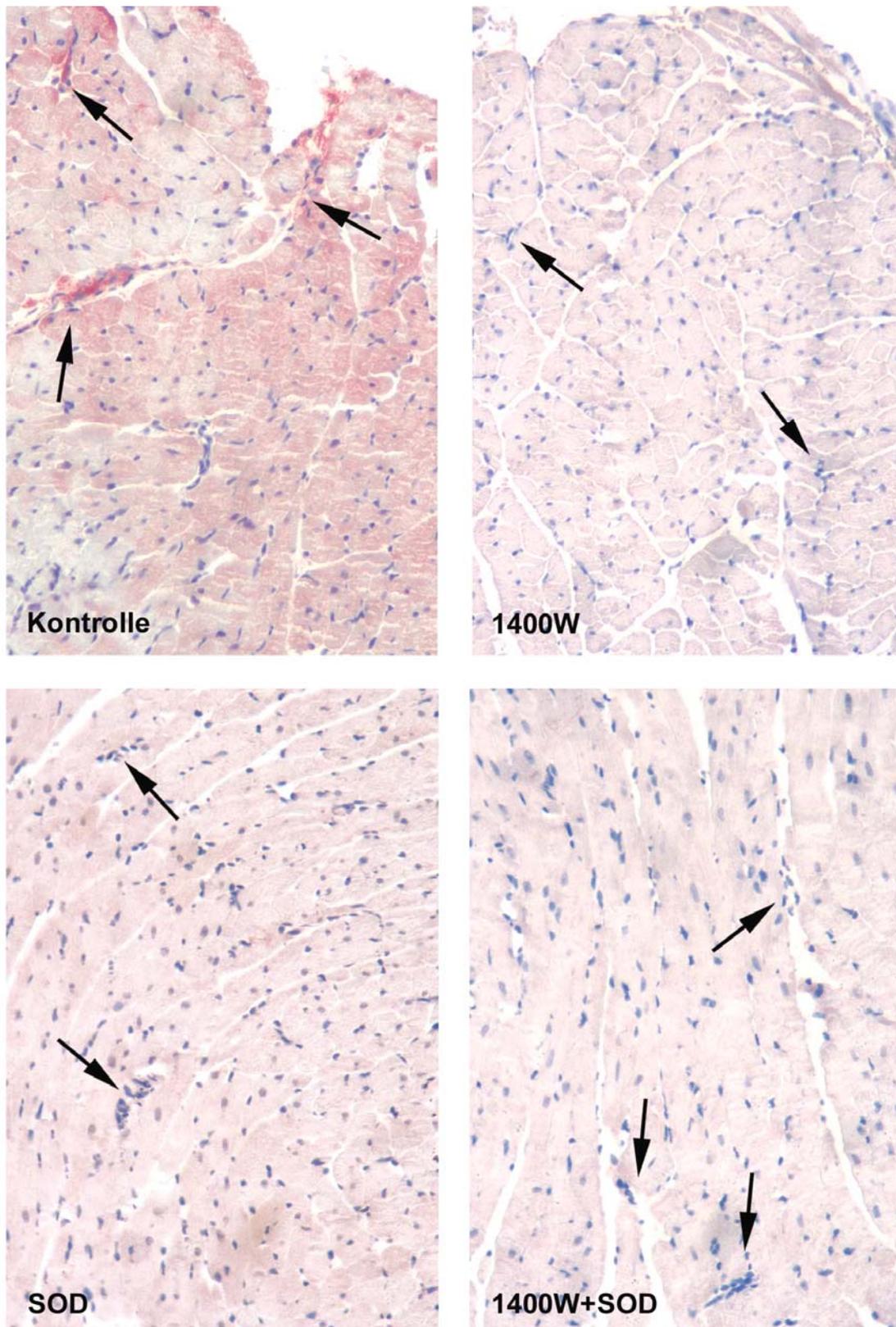
(Die Daten der Nitrotyrosinfärbung wurden in Zusammenarbeit mit Haluk Akdemir erstellt.)

In der Kontrollgruppe konnte MMP-9 immunhistochemisch vorwiegend in intramyokardialen Gefäßen nachgewiesen werden (Pfeile in Abb. 16). Therapie mit 1400W, SOD oder die Kombination aus beiden führt zu einer stark reduzierten Nachweisbarkeit von MMP-9.

Die Inkubation mit Antikörperverdünnungsreagenz anstelle des Erstantikörpers (Negativkontrolle) führte zu keiner Immunreaktivität.



**Abb. 15:** Immunhistochemische Darstellung von Nitrotyrosin; Vergrößerung 200x  
Pfeile zeigen die Lokalisation von intramyokardialen Gefäßen an, um die Identifikation des perivaskulären Antikörper-Nachweises zu erleichtern



**Abb. 16:** Immunhistochemische Darstellung von MMP-9; Vergrößerung 200x  
Pfeile zeigen die Lokalisation von intramyokardialen Gefäßen an, um die Identifikation des perivaskulären Antikörper-Nachweises zu erleichtern.

### 3.7 Einfluss der Therapie mit 1400W und SOD auf die MMP-2 und MMP-9 Aktivitäten

Zymogramme wurden von fünf Tieren je Gruppe durchgeführt und dreimal wiederholt (siehe 2.10).

Um sicherzustellen, dass trotz der hohen Sensitivität der Zymografie die Aktivität für proMMP-2 nicht an der Nachweisgrenze liegt, wurden Gele neben 12 Stunden auch für 24 Stunden inkubiert. Auch bei verlängerter Inkubationszeit blieb das Muster der Banden für proMMP-2 gleich, Signale für proMMP-9 waren jedoch übersteuert. Daher wurden zur Auswertung Gele mit 12 Stunden Inkubationszeit herangezogen.

Abb. 17 zeigt repräsentativ die gelatinolytische Aktivität des linken Ventrikels transplantierter Rattenherzen von je drei Tieren pro Gruppe (unterer Bildteil).

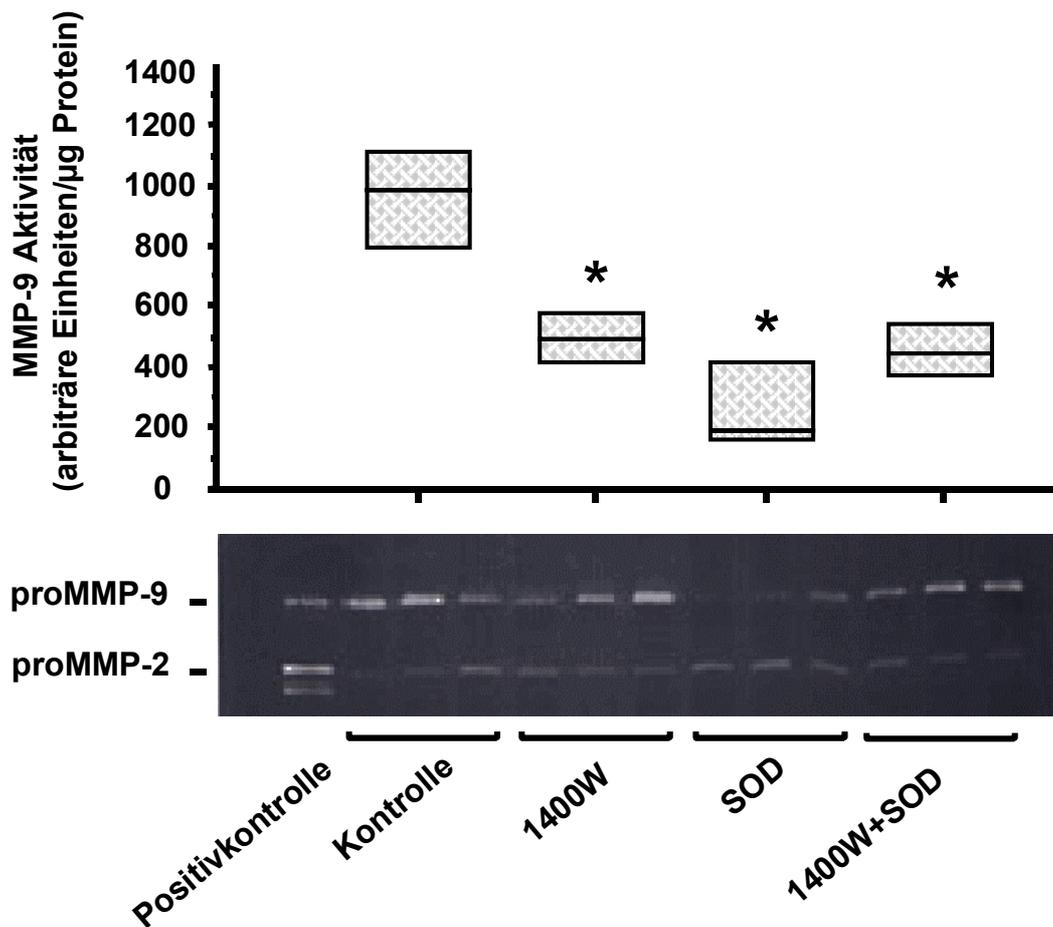
Als Positivkontrolle dienten humane Fibrosarcomzellen, die zuvor mit Phorbol ester stimuliert wurden und so MMP-2- und MMP-9-Aktivität aufweisen.

Im Zymogramm zeigen sich Proteine der Größe 92 kDa und 72 kDa mit gelatinolytischer Aktivität.

Die Therapie mit 1400W, SOD oder beidem führt zu einer Verringerung der Aktivität des 92 kDa-Proteins (proMMP-9) im Vergleich zur nicht therapierten Kontrollgruppe. Auffallend ist die starke Reduktion der gelatinolytischen Aktivität von pro-MMP-9 unter Einfluss von SOD.

Auf die Aktivität von pro-MMP-2 (72 kDa) haben die drei angewandten Therapieformen keinen Einfluss.

Die densitometrische Analyse der gelatinolytischen Aktivität im Ventrikelgewebe verifiziert die im Zymogramm gemachte Beobachtung für proMMP-9 (oberer Bildteil der Abb. 17). Alle drei Therapieformen führen zu einer signifikanten Reduktion der Aktivität, wobei die Applikation von SOD den massivsten Einfluss auf die Aktivität hat ( $n = 5$  je Gruppe; Kontrolle  $955 \pm 124$ ; 1400W  $492 \pm 62$   $p = 0,03$  vs. Kontrolle; SOD  $274 \pm 107$   $p = 0,01$  vs. Kontrolle; 1400W+SOD  $455 \pm 114$   $p = 0,02$  vs. Kontrolle).



**Abb. 17:** Densitometrische Analyse der gelatinolytischen Aktivität von MMP-9 in Herzgewebe nach Transplantation (obere Hälfte); Darstellung des Zymogramms von proMMP-2 und -9 als Gelbild (untere Hälfte)

Überprüfung der Varianzhomogenität mittels Bartlett-Test, Beurteilung der Daten mittels ANOVA und anschließendem Fisher-PLSD-Test.

\* $p < 0,05$  versus Kontrolle

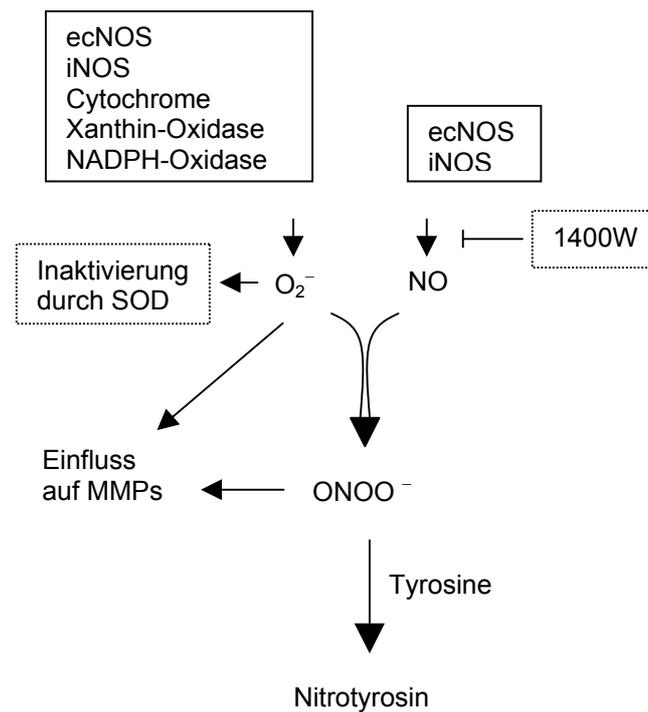
## 4. Diskussion

Eine Vielzahl von Veröffentlichungen weist darauf hin, dass die endotheliale Dysfunktion der Koronargefäße bei herztransplantierten Patienten einen frühen Hinweis für die Entwicklung einer Transplantat-Arteriosklerose darstellt. Generell beobachtet man bei Patienten mit einem Risiko für Arteriosklerose sehr oft eine Einschränkung der Vasodilatation. Dabei ergeben sich immer mehr Hinweise, dass die beobachtete Dysfunktion tatsächlich als prädiktiver Parameter für die Entwicklung einer Arteriosklerose oder anderer kardiovaskulärer Ereignisse betrachtet werden kann (Schächinger *et al.*, 2000).

Weiterhin gibt es immer mehr Hinweise darauf, dass die Oxidantien NO und Superoxid ursächlich an der Entstehung der endothelialen Dysfunktion beteiligt sind, wobei die genauen Mechanismen noch nicht geklärt sind (Kessler *et al.*, 1997; Wildhirt *et al.*, 2001; Cai und Harrison, 2000; Gunnett *et al.*, 2001).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, inwiefern die selektive iNOS-Inhibierung durch 1400W sowie die kontinuierliche Gabe von SOD Einfluss auf zwei extrazelluläre Matrixproteine (MMP-2 und MMP-9) und die koronare Vasomotorfunktion nach Ischämie/Reperfusion in transplantierten Rattenherzen hat.

Abb. 18 zeigt mögliche Quellen der NO- und Superoxid-Produktion im verwendeten Versuchsmodell und Interaktionen mit Therapeutika oder anderen zellulären Strukturen.



**Abb. 18:** NO- und Superoxidproduktion: mögliche Quellen und Interaktionen

Es konnte gezeigt werden, dass die kontinuierliche Therapie mit dem hoch selektiven iNOS Inhibitor oder SOD während I/R sowohl die endothelabhängige als auch die endothelunabhängige koronare Flussreserve in transplantierten Rattenherzen dosisabhängig verbessert. Die Kombination der Einzeldosierungen von 1400W und SOD resultiert nicht in einem weiteren Effekt auf die Protektion der koronaren Vasomotorik (siehe 3.3). Superoxid- und Nitrotyrosin-Färbung fand sich in nicht therapierten Kontrollherzen. In allen Therapiegruppen waren Superoxid Nitrotyrosin deutlich reduziert nachzuweisen (siehe 3.5/3.6).

Weiterhin wurde gezeigt, dass Ischämie und nachfolgende Reperfusion zu einer gesteigerten MMP-9-Synthese und -Aktivität führt. Beides wird durch die Therapie mit 1400W oder SOD signifikant reduziert und führt zu einer signifikanten Verbesserung der vaskulären Funktion. Eine kombinierte Therapie resultiert in vergleichbaren Effekten auf die Inhibierung der MMP-9-Aktivität und Gefäßprotektion (siehe 3.6/3.7/3.3).

### 4.1 Oxidativer Stress und Endothelfunktion

Es stellt sich die Frage, warum iNOS-Inhibierung oder Superoxid-„scavenging“ durch SOD zu vergleichbaren protektiven Effekten führen.

Die Induktion der iNOS unter pathologischen Bedingungen resultiert in einer Produktion von NO und Superoxid gleichermaßen (Vos *et al.*, 2000; Xia und Zweier, 1997). Daher könnte die Inhibierung der iNOS direkt zu einer Verminderung der Superoxid-Bildung führen. Die durch Oxidantien vermittelte Einschränkung der vaskulären Funktion kann durch diese Wirkung zumindest zum Teil verhindert werden. Die hier vorgestellten Daten zeigen eine signifikante Verminderung der Superoxidbildung durch Therapie mit dem selektiven iNOS-Inhibitor 1400W (siehe 3.5). Im verwendeten Versuchsmodell ist also ebenfalls zu vermuten, dass iNOS neben NO auch Superoxid freisetzt. In diesem Zusammenhang konnten Gunnett und Kollegen zeigen, dass die Transfektion von iNOS in Kaninchen-Arterien zu einer Einschränkung der NO-abhängigen Relaxierung führt; diese kann durch die Applikation von PEG-SOD oder Tiron entscheidend verbessert werden, wodurch die Rolle von Superoxid bei der Entwicklung der vaskulären Dysfunktion neuerlich betont wird (Gunnett *et al.*, 2001). Die Autoren beschreiben ebenfalls das in dieser Arbeit beobachtete Phänomen, dass iNOS unter bestimmten Bedingungen anscheinend anstelle größerer Mengen NO auch Superoxid produziert. In weiterführenden Versuchen belegen die Autoren, dass diese Beobachtung auf eine Substratknappheit (L-Arginin) zurückzuführen ist. In dem beschriebenen Rattenmodell mit chronischer Herzinsuffizienz trägt die gesteigerte Superoxid-Bildung bei den Versuchstieren zur Hyperreaktivität der Mesenterialarterien bei, obwohl sie über ein intaktes Endothel verfügen. Sowohl 1400W als selektiver iNOS Inhibitor als auch ein SOD-Analog heben die Überempfindlichkeit der Gefäße auf vasoaktive Stimuli auf (Miller *et al.*, 2000).

Welcher Anteil der Superoxid-Produktion in diesem Versuchsmodell allerdings auf die direkte Aktivität der iNOS zurückzuführen ist, bleibt spekulativ.

Zudem kann iNOS indirekt zu einer Superoxid-Freisetzung durch das Endothel führen. Diese Möglichkeit entsteht durch einen relativen Mangel an Kofaktoren wie Tetrahydrobiopterin (BH<sub>4</sub>) oder der Verminderung des intrazellulären L-Arginin-Spiegels (als Substrat). Es wurde von verschiedenen

Gruppen gezeigt, dass unter diesen Bedingungen die endotheliale NOS (ecNOS) einem sogenannten „uncoupling“ unterliegt, das eine Produktion von Superoxid anstelle NO nach sich zieht (Cai und Harrison, 2000; Andrew und Mayer, 1999).

Eine weitere Möglichkeit, die vergleichbaren protektiven Effekte von 1400W und SOD zu erklären, ist das Potenzial beider Therapieformen, die Produktion des starken Oxidanz Peroxynitrit zu verhindern. Da sowohl NO als auch Superoxid für die Peroxynitrit-Bildung benötigt werden, kann die Inhibierung und „Scavenging“ beider Reaktionspartner einen Schutz der vaskulären Funktion nach sich ziehen. Diese Hypothese wird durch die immunhistochemischen Färbungen für Nitrotyrosin unterstützt, da in allen Therapiegruppen eine deutliche Reduktion von Nitrotyrosin nachweisbar ist (siehe 3.6). Diese Beobachtung wurde auch in anderen Modellen gemacht, wie z. B. experimenteller Myokarditis und in Endotoxin-behandelter Rattenlunge (Bouloumie *et al.*, 1997; Brady *et al.*, 1997; Ishiyama *et al.*, 1997; Xia und Zweier, 1997). Wang und Kollegen konnten die Entstehung von Peroxynitrit in den ersten Minuten der Reperfusion in isolierten Rattenherzen direkt nachweisen. Sie bestimmten den zeitlichen Verlauf der NO- und Superoxidbildung mittels Elektronmagnetresonanz-Messung und die Entstehung von Peroxynitrit durch Chemilumineszenz. Die Gabe von NOS Inhibitoren oder SOD verhinderte die Bildung von Peroxynitrit. Die Bildung von Nitrotyrosinen im Gewebe konnte immunhistochemisch in postischämischen Herzen nachgewiesen werden (Wang und Zweier, 1996).

In der vorliegenden Studie wurde Nitrotyrosin (als „nichtflüchtiger“ Marker für die Peroxynitrit-Entstehung) in myokardialen Zellen und in perivaskulären Regionen intramyokardialer Gefäße nachgewiesen, und zwar ausschließlich in der nicht therapierten Kontrollgruppe (siehe 3.6). Die hämodynamischen Parameter unterschieden sich nicht zwischen den Gruppen, doch die Anwesenheit von Nitrotyrosin korrelierte mit einer Einschränkung der koronaren Flussreserve in der Kontrollgruppe (siehe 3.3). Dies lässt sich durch eine größere Sensitivität der Endothelzellen auf oxidativen Stress unter pathologischen Bedingungen erklären (Bhagat *et al.*, 1996; Szabo *et al.*, 1998). Dies wird durch eine vor kurzem erschienene Veröffentlichung von Yamamoto gestützt, in der beschrieben wird, dass unter inflammatorischen Bedingungen die Bindung der EC-SOD

(extrazelluläre SOD) an die endotheliale Zelloberfläche von Blutgefäßen durch eine starke Produktion von NO vermindert wird. Daraus resultiert ein verminderter Schutz der endothelialen Zelloberfläche vor oxidativem Stress (Yamamoto *et al.*, 2001). Unterschreitet dieser Schutzmechanismus ein bestimmtes Maß, so werden die Endothelzellen apoptotisch oder nekrotisch, je nach Ausmaß des oxidativen Stresses (Burlacu *et al.*, 2001).

Eine weitere interessante Beobachtung im Rahmen dieser Arbeit ist - neben einer Verbesserung der vaskulären Funktion - die signifikante Reduktion der iNOS-Proteinsynthese bei einer Therapie mit 1400W oder der Kombination aus 1400W und SOD, nicht jedoch bei alleiniger Therapie mit SOD (siehe 3.4). Die Tatsache, dass sowohl die selektive iNOS-Inhibierung als auch Superoxid-„scavenging“ zu vergleichbaren funktionellen Effekten führt, lässt darauf schließen, dass in diesem Versuchsansatz Superoxid oder die Bildung von Peroxynitrit eine entscheidende Rolle in der Entwicklung von Endotheldysfunktion spielt. Dies wird auch durch die vorliegenden Nitrotyrosin- und Superoxid-Nachweise unterstützt (siehe 3.5/3.6).

In diesem Zusammenhang zeigten Ruetten und Kollegen, dass die selektive iNOS Inhibierung mit Aminoguanidin oder Aminoethyl-isothioharnstoff die Synthese von iNOS-Protein in LPS-stimulierten Makrophagen und in der Rattenlunge verhindert (Ruetten und Thiernemann, 1996).

#### **4.2 Rolle der MMPs bei I/R induzierter vaskulärer Dysfunktion - MMPs als potenzielle Effektormoleküle bei oxidativem Stress**

Die Rolle pathologisch erhöhter MMP-Aktivität in der Entwicklung von Endothelfunktionsstörungen ist derzeit unklar. Allerdings konnten in arteriosklerotischen Plaques Lipid-haltige Makrophagen mit einer erhöhten MMP-Aktivität nachgewiesen werden, wobei *in vivo* generierte Makrophagen-Schaumzellen große Mengen Superoxid und NO produzieren. Unter inflammatorischen Bedingungen stellen Sauerstoffspezies wie Superoxid oder Peroxynitrit potente Aktivatoren der Gelatinasen dar (Danielsen *et al.*, 1998; Rajagopalan *et al.*, 1996; Eberhardt *et al.*, 2000b). Reaktive Sauerstoffspezies können in Arealen mit großem oxidativen Stress die Matrixdegradation modulieren

und daher zur Instabilität von atherosklerotischen Plaques beitragen (Rajagopalan et al., 1996). Weiterhin ist bekannt, dass MMP-1, MMP-2 und MMP-9 bei myokardialer und vaskulärer Dysfunktion hochreguliert werden (Cheung et al., 2000; Danielsen et al., 1998; Eberhardt et al., 2000b).

In diesem Zusammenhang zeigten Cheung und Kollegen, dass nach I/R in isolierten Rattenherzen die MMP-2-Aktivität unmittelbar hochreguliert wird. Eine Inhibierung der Matrixmetalloproteinasen durch den nicht selektiven Inhibitor Doxyzyklin oder Phenanthrolin ex vivo verbesserte die Funktion der Herzen und spricht für eine direkte regulatorische Rolle von MMP-2 bei der Kontrolle der myokardialen Funktion (Cheung et al., 2000).

Upchurch und Kollegen zeigten, dass die Hemmung der Zytokin-induzierten NO-Bildung in glatten Gefäßmuskelzellen in vitro zu selektiver Dosis-abhängiger Zunahme der MMP-9-Expression und -Synthese führt (Upchurch et al., 2001).

Daher könnten Veränderungen der lokalen NO-Synthese die MMP-9-abhängige Gefäßwand-Schädigung beeinflussen.

Weiterhin konnte die Gruppe um Danielsen eine positive Regulation von MMP-1 und MMP-9 im ischämischen reperfundierten Myokard zeigen (Danielsen et al., 1998).

Es ist jedoch nicht klar, durch welchen Mechanismus MMPs die vaskuläre Funktion ändern können.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde MMP-9-Synthese vorwiegend in intramyokardialen Gefäßen nachgewiesen (siehe 3.6). Gurjar und Kollegen zeigten, dass in glatten Gefäßmuskelzellen infolge gesteigerter Superoxid-Produktion die MMP-9-Aktivität erhöht ist (Gurjar et al., 2001), und auch die Gruppe um J. Pfeilschifter fand Superoxid als ko-stimulatorischen Faktor für die MMP-9-Expression (Eberhardt et al., 2000b). Da auch der Superoxid-Nachweis dafür spricht, dass beide therapeutischen Interventionen zu einer Reduktion von Superoxid führen, korreliert dieses Ergebnis mit der verminderten MMP-9-Bildung unter Therapiebedingungen mit 1400W und/oder SOD (siehe 3.5/3.6). Damit einhergehend sind die hier gezeigten immunhistologischen Färbungen für Nitrotyrosin (siehe 3.6), da aus in-vitro-Versuchen bekannt ist, dass pro-MMP-

Formen durch Peroxynitrit in aktive MMPs umgewandelt werden (Okamoto *et al.*, 1997).

Bedeutsam ist die Beobachtung im Rahmen dieser Arbeit, dass durch indirekte therapeutische Intervention (selektive iNOS-Inhibierung und Superoxid-„scavenging“) und damit Herabsetzung des oxidativen Stresses die MMP-9-Aktivität signifikant erniedrigt wurde, was mit einer direkten Verbesserung der Endothelfunktion einhergeht (siehe 3.3/3.7).

Eine selektive pharmakologische Hemmung von MMP-9 ist derzeit mangels geeigneter Inhibitoren nicht möglich, wodurch ein direkter Nachweis der MMP-Beteiligung an der endothelialen Dysfunktion nicht geführt werden kann.

Weitere durch MMPs beeinflusste Faktoren sind bekannt, die potente Mediatoren der endothelialen und vaskulären Dysfunktion darstellen: Matrixmetalloproteinasen bauen nach I/R extrazelluläre Matrix ab und steigern die Einwanderung inflammatorischer Zellen in das Gewebe. Durch ihren Einfluss nimmt die Aggregation der Thrombozyten zu und glatte Gefäßmuskelzellen migrieren verstärkt (Danielsen *et al.*, 1998; Madri *et al.*, 1996; Sawicki *et al.*, 1997).

Doch auch eine weitere Möglichkeit zur Modulation der Endothelfunktion durch MMPs ist denkbar: Kürzlich wurde gezeigt, dass MMPs Big-Endothelin-1 in die vasoaktive Form Endothelin-1 spalten können (Fernandez-Patron *et al.*, 2001). Somit würde unter pathologischen Bedingungen ein wichtiger Gegenspieler von NO in der Regulation der Vasomotorik eine Rolle spielen, da Endothelin-1 der derzeit potenteste bekannte Vasokonstriktor ist. Eine Imbalance von Endothelin und NO führt somit zu einer Funktionsstörung des Endothels.

Die hier vorgestellten Daten deuten ebenfalls darauf hin, dass MMP-9 eine bedeutende Rolle bei der Entstehung der ROS-vermittelten vaskulären Dysfunktion der Koronargefäße spielt. Dabei bestätigt sich, dass die Endothelfunktionsstörung im Rahmen der Arterioskleroseentstehung einen reversiblen Prozess darstellt.

Die Bedeutung dieser Beobachtung auf Langzeiteffekte bei der Organfunktion bleibt abzuklären. Doch die Endotheldysfunktion der Koronargefäße ist ein Vorreiter und früher Indikator für die Entwicklung der Transplantatvaskulopathie. In

diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass MMP-9 Überexpression die Proliferation und Wanderung der glatten Gefäßmuskelzellen steigert. Dies führte zu verändertem Gefäß-„Remodeling“, dokumentiert durch erhöhten Gefäßumfang, dünnere Gefäßwände und Reduktion des Matrixgehaltes in der Intima (Mason *et al.*, 1999).

Weiterführende Studien sind nötig, um die Verknüpfung zwischen früher Gefäßdysfunktion (verbunden mit der Induktion von iNOS, Superoxid-Produktion und MMP-9-Aktivierung) und morphologischen Veränderungen der Transplantatvaskulopathie oder der klassischen Arteriosklerose herzustellen. Dabei wäre die Entwicklung von selektiven Hemmstoffen der MMP Isoenzyme von großer Bedeutung, allerdings existieren derzeit noch keine Substanzen dieser Art mit zufrieden stellenden selektiven Eigenschaften für in-vivo-Experimente.

## 5. Zusammenfassung

Die progressive Entwicklung einer Transplantatvaskulopathie ist die Hauptursache für ein Versagen des initial gesunden transplantierten Organs und damit der limitierende Faktor für das Langzeitüberleben. In diesem Zusammenhang spielt das Endothel eine entscheidende Rolle, da es anatomisch gesehen eine strategische Position zwischen zirkulierendem Blut und glatter Gefäßmuskulatur einnimmt und so als wichtiger Regulator der Gefäßwandfunktion wirkt.

Der globale Ischämie- und Reperfusionsschaden des Myokards spielt in der frühen postoperativen Organdysfunktion eine wichtige Rolle. Dabei entsteht eine Vielzahl von Mediatoren, die Einfluss auf die Endothelfunktion nehmen, wie etwa NO, Superoxid und Peroxynitrit als reaktive Sauerstoffspezies und deren Effektormoleküle (z.B. Matrixmetalloproteinasen).

Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht, inwieweit die beobachtete Funktionsstörung der Koronargefäße 24 Stunden nach I/R nach heterotoper, allogener Herztransplantation in der Ratte durch endogene, oxidative Substanzen und deren Effektormoleküle vermittelt wird.

Dazu wurden zwei Substanzen einzeln und in Kombination therapeutisch eingesetzt. Der hoch selektive iNOS Inhibitor 1400W verhindert die Bildung von NO durch die induzierbare NO Synthase und exogen zugeführte SOD neutralisiert das im Zuge der I/R entstehende Superoxid. Somit wird auch Einfluss auf die Bildung von Peroxynitrit genommen. Zusätzlich sollte die Rolle von Matrixmetalloproteinasen bei der Entstehung der endothelialen Dysfunktion näher untersucht werden, wobei eine selektive MMP Inhibierung nicht vorgenommen wurde.

Es wurde gezeigt, dass die kontinuierliche Therapie mit einem hoch selektiven iNOS-Inhibitor oder SOD während I/R die koronare Vasomotorik nach Herztransplantation dosisabhängig verbessert (sowohl endothelab- als auch – unabhängig).

Der selektive iNOS Inhibitor 1400W führt zu einer verminderten NO- und Superoxidbildung. Peroxynitrit als reaktives Produkt aus NO und Superoxid ist als Nitrotyrosin immunhistochemisch in den Therapiegruppen deutlich vermindert nachzuweisen. Matrix-Metalloproteinase-9 wird durch ROS wie NO, Superoxid und Peroxynitrit aktiviert, ihre Aktivität wird durch Therapie mit 1400W und/oder

SOD reduziert und damit die Vasomotorik verbessert, weswegen über ihre potenzielle Rolle bei der Vermittlung der endothelialen Dysfunktion spekuliert werden kann.

Die Ergebnisse dieser Untersuchung haben Bedeutung für Klinik und Therapie, denn die Entwicklung einer TVP zu einem späteren Zeitpunkt könnte reduziert oder gar verhindert werden, wenn die frühe Organfunktion nach I/R nicht beeinträchtigt wird.

---

## 6. Literaturverzeichnis

- Ali, I.S., Gandhi, M., Finegan, B.A., Koshal, A. und Clanachan, A.S. (1998) Cardioprotection by activation of NO/cGMP pathway after cardioplegic arrest and 8-hour storage. *Ann Thorac Surg*, **65**, 1303-9.
- Andrew, P.J. und Mayer, B. (1999) Enzymatic function of nitric oxide synthases. *Cardiovasc Res*, Vol. 43, pp. 521-31.
- Babior, B.M. und Woodman, R.C. (1990) Chronic granulomatous disease. *Semin Hematol*, **27**, 247-59.
- Becker, L.B., vanden Hoek, T.L., Shao, Z.H., Li, C.Q. und Schumacker, P.T. (1999) Generation of superoxide in cardiomyocytes during ischemia before reperfusion. *Am J Physiol*, Vol. 277, pp. H2240-6.
- Benov, L., Sztejnberg, L. und Fridovich, I. (1998) Critical evaluation of the use of hydroethidine as a measure of superoxide anion radical. *Free Radic Biol Med*, **25**, 826-31.
- Bhagat, K., Moss, R., Collier, J. und Vallance, P. (1996) Endothelial "stunning" following a brief exposure to endotoxin: a mechanism to link infection and infarction? *Cardiovasc Res*, **32**, 822-9.
- Bindokas, V.P., Jordan, J., Lee, C.C. und Miller, R.J. (1996) Superoxide production in rat hippocampal neurons: selective imaging with hydroethidine. *J Neurosci*, **16**, 1324-36.
- Birkedal-Hansen, H. (1995) Proteolytic remodeling of extracellular matrix. *Curr Opin Cell Biol*, **7**, 728-35.
- Bouloumie, A., Bauersachs, J., Linz, W., Scholkens, B.A., Wiemer, G., Fleming, I. und Busse, R. (1997) Endothelial dysfunction coincides with an enhanced nitric oxide synthase expression and superoxide anion production. *Hypertension*, **30**, 934-41.
- Brady, T.C., Chang, L.Y., Day, B.J. und Crapo, J.D. (1997) Extracellular superoxide dismutase is upregulated with inducible nitric oxide synthase after NF-kappa B activation. *Am J Physiol*, Vol. 273, pp. L1002-6.
- Bredt, D.S., Hwang, P.M., Glatt, C.E., Lowenstein, C., Reed, R.R. und Snyder, S.H. (1991) Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. *Nature*, **351**, 714-8.

- Burlacu, A., Jinga, V., Gafencu, A.V. und Simionescu, M. (2001) Severity of oxidative stress generates different mechanisms of endothelial cell death. *Cell Tissue Res*, **306**, 409-16.
- Cai, H. und Harrison, D.G. (2000) Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress [In Process Citation]. *Circ Res*, Vol. 87, pp. 840-4.
- Cheung, P.Y., Sawicki, G., Wozniak, M., Wang, W., Radomski, M.W. und Schulz, R. (2000) Matrix metalloproteinase-2 contributes to ischemia-reperfusion injury in the heart. *Circulation*, Vol. 101, pp. 1833-9.
- Cleutjens, J.P. (1996) The role of matrix metalloproteinases in heart disease. *Cardiovasc Res*, **32**, 816-21.
- Danielsen, C.C., Wiggers, H. und Andersen, H.R. (1998) Increased amounts of collagenase and gelatinase in porcine myocardium following ischemia and reperfusion. *J Mol Cell Cardiol*, Vol. 30, pp. 1431-42.
- Danser, A.H., de Vries, R., Schoemaker, R.G. und Saxena, P.R. (1998) Bradykinin-induced release of nitric oxide by the isolated perfused rat heart: importance of preformed pools of nitric oxide-containing factors. *J Hypertens*, **16**, 239-44.
- Darley-Usmar, V.M., Hogg, N., O'Leary, V.J., Wilson, M.T. und Moncada, S. (1992) The simultaneous generation of superoxide and nitric oxide can initiate lipid peroxidation in human low density lipoprotein. *Free Radic Res Commun*, **17**, 9-20.
- Davidson, D. und Eldemerdash, A. (1990) Endothelium-derived relaxing factor: presence in pulmonary and systemic arteries of the newborn guinea pig. *Pediatr Res*, **27**, 128-32.
- Davis, S.F., Yeung, A.C., Meredith, I.T., Charbonneau, F., Ganz, P., Selwyn, A.P. und Anderson, T.J. (1996) Early endothelial dysfunction predicts the development of transplant coronary artery disease at 1 year posttransplant. *Circulation*, **93**, 457-62.
- Dhalla, N.S., Temsah, R.M. und Netticadan, T. (2000) Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. *J Hypertens*, **18**, 655-73.
- Dollery, C.M., McEwan, J.R. und Henney, A.M. (1995) Matrix metalloproteinases and cardiovascular disease. *Circ Res*, Vol. 77, pp. 863-8.

- Drexler, H., Fischell, T.A., Pinto, F.J., Chenzbraun, A., Botas, J., Cooke, J.P. und Alderman, E.L. (1994) Effect of L-arginine on coronary endothelial function in cardiac transplant recipients. Relation to vessel wall morphology. *Circulation*, **89**, 1615-23.
- Duquesnoy, R.J. und Demetris, A.J. (1995) Immunopathology of cardiac transplant rejection. *Curr Opin Cardiol*, **10**, 193-206.
- Eberhardt, W., Beeg, T., Beck, K.F., Walpen, S., Gauer, S., Bohles, H. und Pfeilschifter, J. (2000a) Nitric oxide modulates expression of matrix metalloproteinase-9 in rat mesangial cells. *Kidney Int*, Vol. 57, pp. 59-69.
- Eberhardt, W., Huwiler, A., Beck, K.F., Walpen, S. und Pfeilschifter, J. (2000b) Amplification of IL-1 beta-induced matrix metalloproteinase-9 expression by superoxide in rat glomerular mesangial cells is mediated by increased activities of NF-kappa B and activating protein-1 and involves activation of the mitogen-activated protein kinase pathways. *J Immunol*, **165**, 5788-97.
- Fernandez-Patron, C., Zouki, C., Whittal, R., Chan, J.S., Davidge, S.T. und Filep, J.G. (2001) Matrix metalloproteinases regulate neutrophil-endothelial cell adhesion through generation of endothelin-1[1-32]. *Faseb J*, **15**, 2230-40.
- Fulton, D., McGiff, J.C. und Quilley, J. (1996) Role of phospholipase C and phospholipase A2 in the nitric oxide-independent vasodilator effect of bradykinin in the rat perfused heart. *J Pharmacol Exp Ther*, **278**, 518-26.
- Galis, Z.S. und Khatri, J.J. (2002) Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly. *Circ Res*, **90**, 251-62.
- Galis, Z.S., Muszynski, M., Sukhova, G.K., Simon-Morrissey, E., Unemori, E.N., Lark, M.W., Amento, E. und Libby, P. (1994) Cytokine-stimulated human vascular smooth muscle cells synthesize a complement of enzymes required for extracellular matrix digestion. *Circ Res*, **75**, 181-9.
- Garvey, E.P., Oplinger, J.A., Furfine, E.S., Kiff, R.J., Laszlo, F., Whittle, B.J. und Knowles, R.G. (1997) 1400W is a slow, tight binding, and highly selective inhibitor of inducible nitric-oxide synthase in vitro and in vivo. *J Biol Chem*, Vol. 272, pp. 4959-63.

- Ghosh, D.K., Wu, C., Pitters, E., Moloney, M., Werner, E.R., Mayer, B. und Stuehr, D.J. (1997) Characterization of the inducible nitric oxide synthase oxygenase domain identifies a 49 amino acid segment required for subunit dimerization and tetrahydrobiopterin interaction. *Biochemistry*, **36**, 10609-19.
- Griffith, O.W. und Stuehr, D.J. (1995) Nitric oxide synthases: properties and catalytic mechanism. *Annu Rev Physiol*, **57**, 707-36.
- Gunneth, C.A., Lund, D.D., Chu, Y., Brooks, R.M., 2nd, Faraci, F.M. und Heistad, D.D. (2001) NO-dependent vasorelaxation is impaired after gene transfer of inducible NO-synthase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **21**, 1281-7.
- Gurjar, M.V., DeLeon, J., Sharma, R.V. und Bhalla, R.C. (2001) Mechanism of inhibition of matrix metalloproteinase-9 induction by NO in vascular smooth muscle cells. *J Appl Physiol*, **91**, 1380-6.
- Hosenpud, J.D., Bennett, L.E., Keck, B.M., Fiol, B., Boucek, M.M. und Novick, R.J. (1998) The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: fifteenth official report--1998. *J Heart Lung Transplant*, **17**, 656-68.
- Ishiyama, S., Hiroe, M., Nishikawa, T., Abe, S., Shimojo, T., Ito, H., Ozasa, S., Yamakawa, K., Matsuzaki, M., Mohammed, M.U., Nakazawa, H., Kasajima, T. und Marumo, F. (1997) Nitric oxide contributes to the progression of myocardial damage in experimental autoimmune myocarditis in rats. *Circulation*, Vol. 95, pp. 489-96.
- Jiang, H., Wynn, C., Pan, F., Ebbs, A., Erickson, L.M. und Kobayashi, M. (2002) Tacrolimus and cyclosporine differ in their capacity to overcome ongoing allograft rejection as a result of their differential abilities to inhibit interleukin-10 production. *Transplantation*, **73**, 1808-17.
- Jordan, J.E., Zhao, Z.Q. und Vinten-Johansen, J. (1999) The role of neutrophils in myocardial ischemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res*, Vol. 43, pp. 860-78.
- Kelly, R.A., Balligand, J.L. und Smith, T.W. (1996) Nitric oxide and cardiac function. *Circ Res*, Vol. 79, pp. 363-80.

- Kerber, S., Rahmel, A., Heinemann-Vechtel, O., Budde, T., Deng, M., Scheld, H.H. und Breithardt, G. (1995) Angiographic, intravascular ultrasound and functional findings early after orthotopic heart transplantation. *Int J Cardiol*, **49**, 119-29.
- Kessler, P., Bauersachs, J., Busse, R. und Schini-Kerth, V.B. (1997) Inhibition of inducible nitric oxide synthase restores endothelium-dependent relaxations in proinflammatory mediator-induced blood vessels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **17**, 1746-55.
- Klatt, P., Pfeiffer, S., List, B.M., Lehner, D., Glatter, O., Bachinger, H.P., Werner, E.R., Schmidt, K. und Mayer, B. (1996) Characterization of heme-deficient neuronal nitric-oxide synthase reveals a role for heme in subunit dimerization and binding of the amino acid substrate and tetrahydrobiopterin. *J Biol Chem*, **271**, 7336-42.
- List, B.M., Klosch, B., Volker, C., Gorren, A.C., Sessa, W.C., Werner, E.R., Kukovetz, W.R., Schmidt, K. und Mayer, B. (1997) Characterization of bovine endothelial nitric oxide synthase as a homodimer with down-regulated uncoupled NADPH oxidase activity: tetrahydrobiopterin binding kinetics and role of haem in dimerization. *Biochem J*, **323**, 159-65.
- Lund, D.D., Faraci, F.M., Miller, F.J., Jr. und Heistad, D.D. (2000) Gene transfer of endothelial nitric oxide synthase improves relaxation of carotid arteries from diabetic rabbits. *Circulation*, Vol. 101, pp. 1027-33.
- Madri, J.A., Graesser, D. und Haas, T. (1996) The roles of adhesion molecules and proteinases in lymphocyte transendothelial migration. *Biochem Cell Biol*, **74**, 749-57.
- Marletta, M.A. (1994) Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis. *Cell*, **78**, 927-30.
- Mason, D.P., Kenagy, R.D., Hasenstab, D., Bowen-Pope, D.F., Seifert, R.A., Coats, S., Hawkins, S.M. und Clowes, A.W. (1999) Matrix metalloproteinase-9 overexpression enhances vascular smooth muscle cell migration and alters remodeling in the injured rat carotid artery. *Circ Res*, **85**, 1179-85.

- Masters, B.S., McMillan, K., Sheta, E.A., Nishimura, J.S., Roman, L.J. und Martasek, P. (1996) Neuronal nitric oxide synthase, a modular enzyme formed by convergent evolution: structure studies of a cysteine thiolate-ligated heme protein that hydroxylates L-arginine to produce NO. as a cellular signal. *Faseb J*, **10**, 552-8.
- Mehra, M.R., Ventura, H.O., Smart, F.W., Stapleton, D.D., Collins, T.J., Ramee, S.R., Murgo, J.P. und White, C.J. (1995) New developments in the diagnosis and management of cardiac allograft vasculopathy. *Tex Heart Inst J*, **22**, 138-44.
- Miller, A.A., Megson, I.L. und Gray, G.A. (2000) Inducible nitric oxide synthase-derived superoxide contributes to hypereactivity in small mesenteric arteries from a rat model of chronic heart failure. *Br J Pharmacol*, **131**, 29-36.
- Mügge, A., Elwell, J.H., Peterson, T.E., Hofmeyer, T.G., Heistad, D.D. und Harrison, D.G. (1991) Chronic treatment with polyethylene-glycolated superoxide dismutase partially restores endothelium-dependent vascular relaxations in cholesterol-fed rabbits. *Circ Res*, **69**, 1293-300.
- Nagase, H. und Okada, Y. (1997) Proteinases and matrix degradation. In Kelly, W., Harris, E., Ruddy, S. und Sledge, C. (eds.), *Textbook of rheumatology*. W.B. Saunders, New York, pp. 323-341.
- Nohl, H. (1994) Generation of superoxide radicals as byproduct of cellular respiration. *Ann Biol Clin (Paris)*, **52**, 199-204.
- Okamoto, T., Akaike, T., Nagano, T., Miyajima, S., Suga, M., Ando, M., Ichimori, K. und Maeda, H. (1997) Activation of human neutrophil procollagenase by nitrogen dioxide and peroxynitrite: a novel mechanism for procollagenase activation involving nitric oxide. *Arch Biochem Biophys*, **342**, 261-74.
- Ono, K. und Lindsey, E.S. (1969) Improved technique of heart transplantation in rats. *J Thorac Cardiovasc Surg*, Vol. 57, pp. 225-9.
- Patel, R.P., McAndrew, J., Sellak, H., White, C.R., Jo, H., Freeman, B.A. und Darley-Usmar, V.M. (1999) Biological aspects of reactive nitrogen species. *Biochim Biophys Acta*, **1411**, 385-400.

- Pearl, J.M., Laks, H., Drinkwater, D.C., Sorensen, T.J., Chang, P., Aharon, A.S., Byrns, R.E. und Ignarro, L.J. (1994) Loss of endothelium- dependent vasodilation and nitric oxide release after myocardial protection with University of Wisconsin solution. *J Thorac Cardiovasc Surg*, **107**, 257- 264.
- Rabinovitch, M., Molossi, S. und Clausell, N. (1995) Cytokine-mediated fibronectin production and transendothelial migration of lymphocytes in the mechanism of cardiac allograft vascular disease: efficacy of novel therapeutic approaches. *J Heart Lung Transplant*, **14**, S116-23.
- Rajagopalan, S., Meng, X.P., Ramasamy, S., Harrison, D.G. und Galis, Z.S. (1996) Reactive oxygen species produced by macrophage-derived foam cells regulate the activity of vascular matrix metalloproteinases in vitro. Implications for atherosclerotic plaque stability. *J Clin Invest*, Vol. 98, pp. 2572-9.
- Ruetten, H. und Thiemermann, C. (1996) Prevention of the expression of inducible nitric oxide synthase by aminoguanidine or aminoethyl-isothiourea in macrophages and in the rat. *Biochem Biophys Res Commun*, Vol. 225, pp. 525-30.
- Russel, M., Wallace, A., Wyner, L., Newell, J. und Karnovsky, M. (1995) Upregulation and modulation of inducible nitric oxide synthase in rat cardiac allografts with chronic rejection and transplant arteriosclerosis. *Circulation*, **92**, 457-464.
- Sawicki, G., Salas, E., Murat, J., Miszta-Lane, H. und Radomski, M.W. (1997) Release of gelatinase A during platelet activation mediates aggregation. *Nature*, **386**, 616-9.
- Sawicki, G., Sanders, E.J., Salas, E., Wozniak, M., Rodrigo, J. und Radomski, M.W. (1998) Localization and translocation of MMP-2 during aggregation of human platelets. *Thromb Haemost*, **80**, 836-9.
- Schächinger, V., Britten, M.B. und Zeiher, A.M. (2000) Prognostic impact of coronary vasodilator dysfunction on adverse long-term outcome of coronary heart disease. *Circulation*, **101**, 1899-906.
- Schulz, R. und Triggle, C.R. (1994) Role of NO in vascular smooth muscle and cardiac muscle function. *Trends Pharmacol. Sci.*, **15**, 255-9.

- Shekhonin, B.V., Domogatsky, S.P., Idelson, G.L., Koteliansky, V.E. und Rukosuev, V.S. (1987) Relative distribution of fibronectin and type I, III, IV, V collagens in normal and atherosclerotic intima of human arteries. *Atherosclerosis*, **67**, 9-16.
- Sitniewska, E.M., Wisniewska, R.J. und Wisniewski, K. (2000) Influence of nitric oxide on the cardiovascular action of secretin in intact rats. Part B. Does nitric oxide influence the effect of secretin on isolated heart function? *Pol J Pharmacol*, **52**, 375-81.
- Siwik, D.A., Pagano, P.J. und Colucci, W.S. (2001) Oxidative stress regulates collagen synthesis and matrix metalloproteinase activity in cardiac fibroblasts. *Am J Physiol Cell Physiol*, **280**, C53-60.
- Spinale, F.G. (2002) Matrix metalloproteinases: regulation and dysregulation in the failing heart. *Circ Res*, **90**, 520-30.
- Squadrito, G.L. und Pryor, W.A. (1998) Oxidative chemistry of nitric oxide: the roles of superoxide, peroxynitrite, and carbon dioxide. *Free Radic Biol Med*, **25**, 392-403.
- Sternlicht, M.D. und Werb, Z. (2001) How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **17**, 463-516.
- Stralin, P., Karlsson, K., Johansson, B.O. und Marklund, S.L. (1995) The interstitium of the human arterial wall contains very large amounts of extracellular superoxide dismutase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **15**, 2032-6.
- Szabo, G., Bahrle, S., Batkai, S., Stumpf, N., Dengler, T.J., Zimmermann, R., Vahl, C.F. und Hagl, S. (1998) L-arginine: effect on reperfusion injury after heart transplantation. *World J Surg*, Vol. 22, pp. 791-7; discussion 797-8.
- Takahashi, S., Barry, A.C. und Factor, S.M. (1990) Collagen degradation in ischaemic rat hearts. *Biochem J*, Vol. 265, pp. 233-41.
- Tamura, Y., Chi, L.G., Driscoll, E.M., Jr., Hoff, P.T., Freeman, B.A., Gallagher, K.P. und Lucchesi, B.R. (1988) Superoxide dismutase conjugated to polyethylene glycol provides sustained protection against myocardial ischemia/reperfusion injury in canine heart. *Circ Res*, **63**, 944-59.

- Tarpey, M.M. und Fridovich, I. (2001) Methods of detection of vascular reactive species: nitric oxide, superoxide, hydrogen peroxide, and peroxynitrite. *Circ Res*, **89**, 224-36.
- Thomson, L., Trujillo, M., Telleri, R. und Radi, R. (1995) Kinetics of cytochrome c<sup>2+</sup> oxidation by peroxynitrite: implications for superoxide measurements in nitric oxide-producing biological systems. *Arch Biochem Biophys*, **319**, 491-7.
- Treasure, C. und Alexander, R. (1995) Relevance of vascular biology to the ischemic syndromes of coronary atherosclerosis. *Cardiovascular Drugs and Therapy*, **9**, 13-19.
- Tyagi, S.C., Ratajska, A. und Weber, K.T. (1993) Myocardial matrix metalloproteinase(s): localization and activation. *Mol Cell Biochem*, **126**, 49-59.
- Upchurch, G.R., Jr., Ford, J.W., Weiss, S.J., Knipp, B.S., Peterson, D.A., Thompson, R.W., Eagleton, M.J., Broady, A.J., Proctor, M.C. und Stanley, J.C. (2001) Nitric oxide inhibition increases matrix metalloproteinase-9 expression by rat aortic smooth muscle cells in vitro. *J Vasc Surg*, **34**, 76-83.
- Veronneau, M., Tanguay, M., Fontaine, E., Jasmin, G. und Dumont, L. (1997) Reactivity to endothelium-dependent and -independent vasoactive substances is maintained in coronary resistance vessels of the failing hamster heart. *Cardiovasc Res*, **33**, 623-30.
- Vincenti, M.P., White, L.A., Schroen, D.J., Benbow, U. und Brinckerhoff, C.E. (1996) Regulating expression of the gene for matrix metalloproteinase-1 (collagenase): mechanisms that control enzyme activity, transcription, and mRNA stability. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, **6**, 391-411.
- Vos, I.H., Joles, J.A., Schurink, M., Weckbecker, G., Stojanovic, T., Rabelink, T.J. und Grone, H.J. (2000) Inhibition of inducible nitric oxide synthase improves graft function and reduces tubulointerstitial injury in renal allograft rejection. *Eur J Pharmacol*, Vol. 391, pp. 31-8.
- Wang, P. und Zweier, J.L. (1996) Measurement of nitric oxide and peroxynitrite generation in the postischemic heart. Evidence for peroxynitrite-mediated reperfusion injury. *J Biol Chem*, **271**, 29223-30.

- Wang, M., Roberts, D.L., Paschke, R., Shea, T.M., Masters, B.S. und Kim, J.J. (1997) Three-dimensional structure of NADPH-cytochrome P450 reductase: prototype for FMN- and FAD-containing enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 8411-6.
- Weis, M. und von Scheidt, W. (1997) Cardiac allograft vasculopathy: a review. *Circulation*, Vol. 96, pp. 2069-77.
- Whitman, G.J., Niibori, K., Yokoyama, H., Crestanello, J.A., Lingle, D.M. und Momeni, R. (1997) The mechanisms of coenzyme Q10 as therapy for myocardial ischemia reperfusion injury. *Mol Aspects Med*, 18 Suppl, S195-203.
- Wildhirt, S.M., Weis, M., Schulze, C., Conrad, N., Pehlivanli, S., Rieder, G., Enders, G., von Scheidt, W. und Reichart, B. (2001) Expression of endomyocardial nitric oxide synthase and coronary endothelial function in human cardiac allografts. *Circulation*, **104**, I336-43.
- Xia, Y., Dawson, V.L., Dawson, T.M., Snyder, S.H. und Zweier, J.L. (1996) Nitric oxide synthase generates superoxide and nitric oxide in arginine-depleted cells leading to peroxynitrite-mediated cellular injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 6770-4.
- Xia, Y. und Zweier, J.L. (1997) Superoxide and peroxynitrite generation from inducible nitric oxide synthase in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 6954-8.
- Yamamoto, M., Hara, H. und Adachi, T. (2001) Nitric oxide and its decomposed derivatives decrease the binding of extracellular-superoxide dismutase to the endothelial cell surface. *FEBS Lett*, **505**, 296-300.
- Zeiger, A.M., Drexler, H., Wollschlager, H. und Just, H. (1991) Endothelial dysfunction of the coronary microvasculature is associated with coronary blood flow regulation in patients with early atherosclerosis. *Circulation*, **84**, 1984-92.

---

**7. Abkürzungen**

1400W	N-(3-(Aminomethyl)benzyl)-acetamidin
% (w/v)	Massenprozent
°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
µM	mikromolar
A.	„Arteria“, Arterie
Abb.	Abbildung
Ach	Acetylcholin
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BH <sub>4</sub>	Tetrahydrobiopterin
bpm	„beats per minute“, Schläge pro Minute, Herzfrequenz
Ca <sup>2+</sup>	Kalzium-Ion
CF	Koronarfluss
CFR	Koronare Flussreserve
cGMP	zyklisches Guanosin-Monophosphat
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
Cu-Zn SOD	Zytosolische Form der SOD
DNA	Desoxyribonukleinsäure
-dP/dt	maximal negatives dP/dt
+dP/dt	maximal positives dP/dt
dP/dtmax	maximal positives dP/dt
dP/dtmin	maximal negatives dP/dt
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ecNOS	konstitutiv exprimierte NO-Synthase, endotheliale NO-Synthase
ECSOD	sezernierte oder extrazelluläre Form der SOD
EDHF	„endothelium-derived hyperpolarizing factor“
EDTA	Ethylendiamintetraazetat
ET	Endothelin

---

GSH	Reduziertes Glutathion
GSSG	oxidierte Form von Glutathion
GTP	Guanosin-Triphosphat
h	Stunden
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HR	Herzfrequenz
i.v.	intravenös
I/R	Ischemie/Reperfusion
IL-1 $\beta$	Interleukin-1 $\beta$
IL-6	Interleukin-6
iNOS	induzierbare NO-Synthase
kDa	kilo-Dalton
kg	Kilogramm
KH	Krebs-Henseleit-Puffer
L-Arg	L-Arginin
LLC	„liquid level controller“
LPS	Lipopolysaccharid
LVDP	links-ventrikulär entwickelter Druck
LVP	Herzinnendruck
mA	Milliampère
mg	Milligramm
mm	Millimeter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
MMP	Matrixmetalloproteinase
MnSOD	Mitochondriale Form der SOD
MT-MMP	membrangebundenes MMP
n.s.	nicht signifikant
NADP(H)	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (oxidiert/reduziert)
NF- $\kappa$ B	Nukleärer Faktor kappaB
nNOS	Neuronale NO-Synthase
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthase, Stickstoffmonoxid-Synthase
NP40	Tergitol (Nonidet P40)

---

O <sub>2</sub>	Sauerstoff
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Superoxid
OH•	Hydroxylradikal
ONOO <sup>-</sup>	Peroxynitrit
PBS	Phosphat-gepufferte physiologische Kochsalzlösung
PEG-SOD	Polyethylenglykol-gekoppelte Superoxiddismutase
ROO•	Lipidperoxid
ROS	„reactive oxygen species“, reaktive Sauerstoffspezies
rpm	„rounds per minute“, Umdrehungen pro Minute
s.c.	subkutan
s.o.	siehe oben
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
sGC	lösliche Guanylatzyklase
SNP	Natrium-Nitroprussid
SOD	Superoxiddismutase
Tab.	Tabelle
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
TIMP	Tissue Inhibitor of Metalloproteinases
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
TVP	Transplantatvaskulopathie
U	Einheiten
V	Volt
V.	„Vena“, Vene
Vv.	„Venae“, Venen

## 8. Danksagung

Herr Prof. Dr. Bruno Reichart hat mir die Möglichkeit gegeben, neben meinen Verpflichtungen in seinem Labor auch an meiner eigenen Promotion arbeiten zu können und mir dafür die apparative Ausstattung und Materialien zur Verfügung gestellt. Dafür sei ihm herzlich gedankt.

Ausdrücklichen Dank möchte ich PD Dr. Stephen Wildhirt aussprechen, der sich besonders um diese Arbeit verdient gemacht hat: Ohne sein Bemühen, mir für mein eigenes Promotionsvorhaben den Rücken frei zu halten und mich bestmöglich zu unterstützen, hätte diese Arbeit nicht in der vorliegenden Form entstehen können. Durch seinen unerschütterlichen Optimismus und sein Engagement beim Aufbau des Labors konnte er über manche Durststrecke hinweghelfen.

Ganz besonders bedanke ich mich bei Dr. Koso Egi, der die chirurgischen Arbeitsschritte übernommen hat und immer ein offenes Ohr für meine Fragen hatte. Mit seiner fröhlichen Art, den mittäglichen Japanisch-Kursen und den kulinarischen Mitbringeln aus seiner Heimat hat er nicht nur erheblich zur guten Stimmung im Labor beigetragen – wir wissen jetzt auch, wie Fischbonbons schmecken.

Dr. Rick Schulz und seinem Team der Cardiovascular Research Group (Universität Alberta, Edmonton, Kanada) danke ich für die Durchführung der MMP-Zymografie und seine fachliche Beratung bei der Interpretation der Ergebnisse.

Dr. Marek Radomski sei für die Überlassung des anti-MMP-9-Antikörpers für immunhistochemische Färbungen gedankt.

Zu großem Dank verpflichtet bin ich weiterhin:

- Andrea Bedynek, die als Unterstützung der „Frauenpower“ eine Menge frischen Wind und gute Laune in den Laboralltag gebracht und mich bei der Bewältigung des Arbeitspensums tatkräftig unterstützt hat

- Costas Schulze, dem „back-up-Stephen“, der so manche Kohlen aus dem Feuer geholt und immer ein zuverlässiger Kollege gewesen ist. Durch sein Engagement im fernen Kanada wurde die Zusammenarbeit der beteiligten Arbeitsgruppen intensiviert und ermöglichte einen Blick über den eigenen Tellerrand hinaus
- Unseren „gelehrigen Studenten“ Haluk Akdemir, Christina Höpp, Sören Kühnapfel, Torsten Kühn und Daniel Schneider: sie tauchten mit großem Eifer und Engagement in das Laborleben ein und bereicherten unsere Arbeitsgruppe nicht nur in arbeitstechnischer Hinsicht
- Holger Schlaszus, der mit seinem fundierten praktischen Wissen wesentlich an der Entwicklung von Arbeitsmethoden mitgewirkt hat
- Allen Mitgliedern des Forschungslabors B, die mich während meines Gastaufenthaltes mitsamt meiner anfangs drei Pipetten freundlich aufgenommen haben; und auch als meine Arbeitsgeräte und damit der benötigte Raum größer wurden, rückten sie bereitwillig noch näher zusammen und standen mir mit Rat und Tat zur Seite.
- Timon Romeijn, ohne dessen spontane fachliche Unterstützung in Grafikdingen ich mit Sicherheit mein erstes graues Haar bekommen hätte
- Dr. Cornelia Wersig für Ihre Fehlerteufel-Tätigkeit im Austausch gegen etwas auf Papier gebannte Laborluft

Meine Freunde, Eltern und Geschwister haben mich durch alle Krisensituationen begleitet und wieder aufgebaut, dafür sei ihnen ganz besonders gedankt.

Peter Lutz verdanke ich durch seinen unbeirrbaren Glauben an mich und seine liebevolle und geduldige Unterstützung letztlich die schriftliche Niederlegung dieser Arbeit. Dafür sollte ihm ein Ehrendokortitel verliehen werden.

## 9. Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name	<u>Nicole</u> Esther Conrad
Geburtsdatum	12. Mai 1971
Geburtsort	Kaufbeuren
Eltern	Waldtraud und Wolf-Dietrich Conrad

### Schulbildung

1977-1981	Grundschule Loschgeschule, Erlangen
1981-1982	Marie-Therese-Gymnasium, Erlangen
1982-1991	Gymnasium Selb, Selb/Ofr.
Juli 1991	Abitur

### Hochschulbildung

1991-1994	Studium der Biologie an der Universität Bayreuth
1994-1997	Studium der Biologie an der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg
	Diplomarbeit am Lehrstuhl für Mikrobiologie unter der Betreuung von Prof. Dr. W. Hillen
	Thema: Charakterisierung von einzelkettigen Tet Repressoren
Februar 1997	Diplom in Biologie (Prüfungsfächer: Mikrobiologie, Zoologie, Immunologie, Toxikologie)

### Berufliche Tätigkeiten

1997-2001	Wissenschaftliche Angestellte der LMU, Herzchirurgische Klinik, Klinikum Großhadern, München
	Direktor: Prof. Dr. med. B. Reichart
2000-2003	Anfertigung einer Promotionsarbeit in der Herzchirurgischen Klinik unter der Betreuung von PD Dr. med. S. Wildhirt
seit 2002	Mitarbeiterin in der Klinischen Forschung bei MedPharmTec-Services, München