

**Aus der Klinik für Innere Medizin III
Kardiologie, Angiologie und internistische Intensivmedizin,
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar
Direktor: Universitätsprofessor Dr. M. Böhm**

**Untersuchungen zum Einfluss von HMG-CoA-Reduktase-
Hemmern bei der Anthrazyklin-induzierten
Kardiomyopathie**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2011

vorgelegt von

David Valentin Steffen

geb. am 14.02.1982 in Püttlingen

Erklärung gemäß § 7 Abs. 1 Nr. 4:

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Bei der Auswahl und Auswertung folgenden Materials haben mir die nachstehend aufgeführten Personen in der jeweils beschriebenen Weise unentgeltlich/entgeltlich geholfen:

Herr Dr. Heiko Kilter, Klinik III für Innere Medizin der Universität des Saarlandes

Herr Dr. Jan Reil, Klinik III für Innere Medizin der Universität des Saarlandes

Frau Dr. Christiana Roggia, Klinik III für Innere Medizin der Universität des Saarlandes

Weitere Personen waren an der inhaltlich-materiellen Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater/innen oder anderer Personen) in Anspruch genommen. Außer den Angegebenen hat niemand von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form in einem anderen Verfahren zur Erlangung des Doktorgrades einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Ich versichere an Eides statt, dass ich nach bestem Wissen die Wahrheit gesagt und nichts verschwiegen habe.

Vor Aufnahme der vorstehenden Versicherung an Eides statt wurde ich über die Bedeutung einer eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unrichtigen oder unvollständigen eidesstattlichen Versicherung belehrt.

Ort, Datum

Unterschrift der/des Promovierenden

Unterschrift der die Versicherung an Eides statt aufnehmenden Beamtin bzw. des aufnehmenden Beamten

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1
Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen	1
1. Zusammenfassung	3
1.1 Untersuchungen zum Einfluss von HMG-CoA-Reduktase-Hemmern bei der Anthrazyklin-induzierten Kardiomyopathie	3
1.2 Studies on the effect of HMG-CoA reductase inhibitors in the anthracycline-induced cardiomyopathy	5
2. Einleitung	7
2.1 Anthrazykline	7
2.1.1 Bedeutung und Charakterisierung der Anthrazykline	7
2.1.2 Antineoplastische Wirkung der Anthrazykline	8
2.1.2.1 Radikalbildung durch Anthrazykline	8
2.1.2.2 Übersicht der antineoplastischen Effekte von Anthrazyklinen	10
2.1.3 Kardiotoxizität der Anthrazykline	11
2.1.3.1 Modulation durch Komedikation	12
2.1.3.2 Mechanismen der Kardiotoxizität	13
2.1.3.3 Übersicht der kardiotoxischen Effekte von Anthrazyklinen	15
2.1.3.4 Mechanismen zur Reduktion der Kardiotoxizität	15
2.1.3.5 Therapieoptionen der Anthrazyklin-induzierten Herzinsuffizienz	17
2.2 HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren (Statine)	18
2.2.1 Statine: Cholesterin-unabhängige Effekte	19
2.2.2 Statine und Apoptose	20
2.3 Fragestellung	22
3. Material und Methoden	24
3.1 Materialien	24
3.1.1 Versuchsmaterial	24
3.1.1.1 Neonatale Kardiomyozyten	24

3.1.1.2 C57/B16-Mäuse	25
3.1.2 Verwendete Substanzen	26
3.1.2.1 Antikörper.....	26
3.1.2.2 PCR-Primer.....	26
3.1.2.3 Kits.....	27
3.1.2.4 Geräte	27
3.1.2.5 Medien, Lösungen, Puffer	29
3.1.2.6 Verbrauchsmaterialien	30
3.1.2.7 Chemikalien	30
3.2 Methoden	32
3.2.1 InVivo-Methoden.....	32
3.2.1.1 Proteinisolation und Proteinbestimmung.....	32
3.2.1.2 Western Blot	32
3.2.1.3 RNA-Isolation.....	35
3.2.1.4 Reverse Transkription (RT).....	35
3.2.1.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	35
3.2.1.6 Gelelektrophorese der DNA.....	37
3.2.1.7 Densitometrie und Fotografie.....	37
3.2.1.8 Real-Time Quantitative Polymerase-Kettenreaktion	37
3.2.1.9. Cell Death Detection ELISA plus	39
3.2.1.10 <i>In Situ</i> Cell Death Detection Kit, TMR red	40
3.2.1.11 Morphologische und histologische Untersuchung der Mäuseherzen .	40
3.2.1.12 Hämatoxilin-Eosin-Färbung.....	41
3.2.1.13 Trichom-Färbung nach Masson Goldner.....	41
3.2.1.14 NADPH Oxidase Aktivitäts Assay	42
3.2.1.15 Messung freier Sauerstoffradikale in Gefäßmuskelzellen	42
3.2.2 InVivo-Methoden	43

3.2.2.1 Narkose der Mäuse.....	43
3.2.2.2 Echokardiographie der Mäuse	43
3.2.2.3 Working Heart	44
3.3 Statistische Auswertung.....	50
4. Ergebnisse.....	51
4.1 InVitro-Untersuchungen	51
4.1.1 Apoptose	51
4.1.2 Untersuchungen zu den Effekten auf Apoptosepathways.....	54
4.1.3 Untersuchungen zu den Effekten auf Survivalpathways	55
4.2 InVivo-Untersuchungen.....	57
4.2.1 Überlebensraten und morphologische Charakterisierung der Versuchstiere	57
4.2.2 Myokardiale Apoptose.....	59
4.2.3 Einfluss freier Sauerstoffradikale.....	62
4.2.4. Kardiale Fibrosierung	66
4.2.6 Echokardiographische Charakterisierung.....	67
4.2.7 Untersuchungen zur systolischen und diastolischen Ventrikelfunktion im Working Heart-Modell	69
4.3 Zusammenfassung der Ergebnisse.....	73
5. Diskussion	74
5.1 Bedeutung der Kombinationsbehandlung mit Doxorubicin und Atorvastatin im InVitro-Modell.....	74
5.1.1 Apoptose im InVitro-Modell	74
5.1.2 Bedeutung intrinsischer Apoptosepathways.....	75
5.1.3 Bedeutung von Survivalpathways	75
5.2 Bedeutung der Kombinationsbehandlung mit Doxorubicin und Atorvastatin im InVivo-Modell	78
5.2.1 Bedeutung der freien Sauerstoffradikale	78
5.2.2 Bedeutung der Kombinationsbehandlung für die Myokardfunktion	79

5.3 Maladaptive Prozesse im Myokard als Erklärungsmodell für die Verschlechterung der systolischen Funktion unter der Kombinationsbehandlung	80
5.4 Vergleich zu anderen Ergebnissen	82
5.5 Zusammenfassung und Ausblick	83
6. Literaturverzeichnis	86
6.1 Abbildungsverzeichnis	100
6.2 Tabellenverzeichnis	101
7. Publikationen/Dank.....	102
7.1 Publikationen	102
7.2 Dank.....	103
8. Lebenslauf	104

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

Abb.	: Abbildung
AD	: Außendurchmesser
bp	: DNA-Basenpaar
APS	: Ammoniumpersulfat
Atorva	: Atorvastatin
BSA	: Bovines Serum Albumin
bzw.	: beziehungsweise
°C	: Grad Celsius
cDNA	: copy Desoxyribonukleinsäure
CK-MB	: kardiale Kreatininkinase
CM	: Kardiomyopathie
DNA	: Desoxyribonukleinsäure
DOX(O)	: Doxorubicin
DOXFORM	: Doxorubicin-Formaldehyd-Konjugat
DOXol	: Doxorubicinol
DTT	: Dithiothreitol
E 64	: synthetischer Cystein-Proteinase-Inhibitor
EDTA	: Ethyldiamintetraessigsäure
EF	: Ejektionsfraktion (%)
EGTA	: Ethylenglykol-bis(2-aminoethyl)tetraessigsäure
FCS	: fetal calf serum, fetales Kälberserum
FeTBAP	: Fe(III)tetrakis(4-benzoic acid)porphyrin
FS	: Fraction of shortening, Verkürzungsfraction (%)
g	: Gravitationskonstante (9,81 kg x s ² /m)
g, mg	: Gramm, Milligramm
GAPDH	: Glyzerinaldehyd-3'Phosphat-Dehydrogenase
G/V	: Gewicht/Volumen
h	: Stunde(n)
HCHO, FORM	: Formaldehyd
HEPES	: N- (2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2- ethansulfonsäure
Hz	: Herz (1/Sekunde)
ID	: Innendurchmesser

kb	: Kilobase
KCN	: Kaliumcyanid
kDa	: Kilodalton
KI	: Konfidenzintervall
l, ml, μ l	: Liter, Milliliter, Mikroliter
LVEF	: linksventrikuläre Ejektionsfraktion
m, mm	: Meter, Millimeter
MDA	: Malondialdehyd-DNA-Addukte
MG	: Molekulargewicht
MHC	: Major histocompatibility complex
min.	: Minute(n)
mol, mmol, μ mol	: Mol, Millimol, Mikromol
PI3K	: Phosphatidylinositide 3-Kinase
PMSF	: Phenylmethylsulfonylfluorid
RNA	: Ribonukleinsäure
RNAse	: Ribonuklease
mRNA	: messenger Ribonukleinsäure
RT	: Raumtemperatur
MW	: arithmetischer Mittelwert
n	: Anzahl
NNT(/J)	: number needed to treat (pro Jahr)
PBS	: Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	: Polymerase-Kettenreaktion
pH	: negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
ROS	: reactive oxygen species = reaktive Sauerstoffradikale
SDS	: Natrium-dodecylsulfat
TdT	: terminal deoxynucleotidyl transferase
TEMED	: N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TUNEL	: „terminal dUTP nick end labeling“
Tris	: Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U/min, rpm	: Umdrehungen pro Minute
V, mV	: Volt, Millivolt
V/V	: Volumen/Volumen

1. Zusammenfassung

1.1 Untersuchungen zum Einfluss von HMG-CoA-Reduktase-Hemmern bei der Anthrazyklin-induzierten Kardiomyopathie

Anthrazykline gehören zu den wirksamsten antineoplastisch wirkenden Medikamenten in der Behandlung von hämatopoetischen und soliden Tumoren, die sowohl bei Kindern als auch bei Erwachsenen zur Anwendung kommen. Jedoch wird ihr Einsatz durch die Kardiotoxizität und das erhebliche Risiko der Entwicklung einer Herzinsuffizienz begrenzt. Mäuse mit einem Knockout-Gen für die NADPH-Oxidase waren signifikant weniger anfällig für die Anthrazyklin-induzierte Kardiomyopathie, sodass eine Hemmung der NADPH-Oxidase günstig sein könnte. Die effektive Hemmung der myokardialen NADPH-Oxidase-Aktivität durch Statine konnte in mehreren Studien gezeigt werden. Zugleich erhöhen Statine bei einigen malignen Tumoren das Ansprechen auf eine Chemotherapie. Ziel der Arbeit war es, die Effekte von Statinen auf die Anthrazyklin-vermittelte Kardiotoxizität zu untersuchen.

In dieser Studie wurden C57/Bl6-Mäuse mit der Standarddosis des Anthrazyklins Doxorubicin (2x10 mg/kg KG, an Tag 0 und 6) allein und in Kombination mit Atorvastatin (2 mg/kg KG täglich, beginnend 3 Tage vor der ersten Doxorubicin-Injektion) behandelt. Die kardiale Phänotypisierung erfolgte nach vier Wochen. Darüber hinaus wurden isolierte neonatale Kardiomyozyten mit Doxorubicin und Atorvastatin behandelt, um Zeit-Konzentrations-Effekte, Apoptoseraten und Downstream-Regulierungen der Signaltransduktionswege zu untersuchen.

Die Herzen der Doxorubicin-behandelten Mäuse zeigten eine signifikante Einschränkung der enddiastolischen Druckvolumenbeziehung als Maß für die Compliance und charakterisiert durch die Steifigkeitskonstante β (0.15 ± 0.02 vs. 0.09 ± 0.01 , $p < 0.01$), eine signifikante Beeinträchtigungen der endsystolischen Druckvolumenbeziehung E_{es} als Maß für die systolische Funktion (3.40 ± 0.20 vs. 4.50 ± 0.28 , $p < 0.05$) und die Ejektionsfraktion (3.40 ± 0.20 vs. 4.50 ± 0.28 , $p < 0.05$) im Vergleich zur Kontrolle. Die Kombinationsbehandlung mit Doxorubicin und Atorvastatin schränkte die systolische Funktion im Vergleich zur Doxorubicinmonotherapie nochmal signifikant ein (E_{es} 2.34 ± 0.25 vs. 3.40 ± 0.20 , $p < 0.01$). Es zeigte sich kein signifikanter Einfluss auf das Überleben (73% vs. 67%, n.s.) der Tiere, die Fibrosierung der Herzen ($3,03 \pm 1,0$ vs. $3,06 \pm 0,6$, n. s.) oder die

Apoptoseraten der Myozyten ($16,2 \pm 0,9\%$ gegenüber $14,3 \pm 4,5\%$, n. s.). Darüber hinaus konnte Atorvastatin der Doxorubicin-induzierten Erhöhung der myokardialen NADPH-Oxidase-Aktivität nicht entgegenwirken oder die freien Sauerstoffradikale effektiv reduzieren (1.37 ± 0.09 vs. 1.38 ± 0.07 , n. s.). Die vaskuläre Produktion freier Sauerstoffradikale konnte jedoch durch die Kombinationsbehandlung mit Atorvastatin signifikant reduziert werden. Dies zeigt die pharmakologische Effektivität unserer Behandlung.

Klinisch relevante Konzentrationen von Atorvastatin schützen nicht vor der Doxorubicin-induzierten Kardiotoxizität (kardiale Fibrose und erhöhte Apoptoseraten), führen jedoch zu einer Verschlechterung der systolischen Kontraktionskraft der Herzen. Wir schließen daraus, dass der Nutzen der Therapie und das potentielle Risiko unter der Behandlung sorgfältig abgewägt werden müssen, solange klinische Daten zur Effektivität und Sicherheit der Statine während einer Chemotherapie fehlen. Bereits etablierte Statintherapien sollten aufgrund der bekannten Absetzeffekte weitergeführt, jedoch keine neuen Behandlungen unter einer Chemotherapie mit Anthrazyklinen begonnen werden.

1.2 Studies on the effect of HMG-CoA reductase inhibitors in the anthracycline-induced cardiomyopathy

Anthracyclines are potent antineoplastic agents commonly used in the treatment of hematopoietic and solid tumors in children and adults. However, the use of anthracyclines is limited by its cardiotoxic adverse effects and a considerable risk to induce heart failure. NADPH knockout mice were significantly less susceptible to anthracycline-induced cardiomyopathy, indicating that inhibition of NADPH oxidase could be favorable. The effective inhibition of myocardial NADPH oxidase activity by statins has been shown in several studies. The aim of the study was the effects of statins on anthracycline-mediated cardiotoxicity study.

In this study, C57/Bl6 mice were treated with the commonly used anthracycline doxorubicin (2x10 mg/kg, day 0 and day 6) alone and in combination with atorvastatin (2mg/kg daily, started 3 days before the first injection of doxorubicin). The cardiac phenotype was characterized after 4 weeks. Moreover, isolated neonatal cardiomyocytes were treated with doxorubicin and atorvastatin to investigate time-dose effects, apoptosis rate and downstream signalling pathways.

The hearts of doxorubicin-treated mice showed a significant reduction of end-diastolic pressure volume relationship, as a measure of compliance, and characterized by the stiffness β (0.15 ± 0.02 vs. 0.09 ± 0.01 , $p < 0.01$). Moreover, the systolic function, characterized by the end-systolic pressure volume relation Ees (3.40 ± 0.20 vs. 4.50 ± 0.28 , $p < 0.05$) and the ejection fraction (3.40 ± 0.20 vs. 4.50 ± 0.28 , $p < 0.05$) was significantly reduced. Co-treatment of the mice with atorvastatin limited the systolic function significant compared to Doxorubicin alone (2.34 ± 0.25 vs. Ees. 3.40 ± 0.20 , $p < 0.01$). There was no significant effect on survival (73% vs 67%, ns) of the animals, the fibrosis of the heart (3.03 ± 1.0 vs. 3.06 ± 0.6 , ns) or apoptosis of myocytes ($16.2 \pm 0.9\%$ vs. $14.3 \pm 4.5\%$, ns). In addition, atorvastatin did not reduce the doxorubicin-induced increasing in myocardial NADPH oxidase activity, or reduce the oxygen free radicals effectively (1.37 ± 0.09 vs. 1.38 ± 0.07 , ns). The vascular production of free oxygen radicals could be reduced significantly by the combination treatment with atorvastatin. This shows the effectiveness of our pharmacological treatment. Atorvastatin alone had no effect compared to the control.

Clinically relevant concentrations of atorvastatin do not protect against doxorubicin-induced cardiotoxicity (cardiac fibrosis and apoptosis) but decreases the systolic function. We conclude that, while lacking clinical data on the effectiveness and safety of statins during chemotherapy, the benefits of therapy and the potential risk during treatment must be weighed carefully. Already established statin therapy should be continued based on the known effects after withdrawal. In an ongoing chemotherapy with doxorubicin shouldn't been started a new statin treatment.

2. Einleitung

2.1 Anthrazykline

2.1.1 Bedeutung und Charakterisierung der Anthrazykline

Anthrazykline waren ursprünglich als Antibiotika aus Bakterien und Pilzen isoliert worden. Es zeigte sich jedoch, dass einige Anthrazykline – Daunorubicin, Doxorubicin, Epirubicin, Idarubicin – auch zytostatische Eigenschaften aufweisen.

Die zytostatisch wirksamen Anthrazykline ordnet man der Gruppe der Interkalantien zu. Interkalantien binden nicht kovalent an die DNA und lagern sich zwischen zwei Basenpaaren in der Doppelhelixstruktur an. So werden Doppelstrangbrüche begünstigt, vorhandene nicht repariert und die Polymerasen an ihrer Funktionsausübung gehindert (Minotti et al., 2004). Die Anthrazykline zählen bis heute zu den am besten wirksamsten Substanzen in der Therapie maligner Tumorerkrankungen. So sind sie Bestandteil vieler Standardtherapien, wie zum Beispiel von Lymphomen, Mamma-, Endometrium-, Ovarial- und Zervixkarzinomen, Bronchialkarzinomen, Magen- und Blasenkarzinomen, Sarkomen und von akuten Leukämien Erwachsener. Des Weiteren ist v.a. Doxorubicin in vielen Behandlungsschemata von malignen kindlichen Tumorerkrankungen etabliert (Berger et al., 2008). Trotz des großen Nutzens der Anthrazykline stellt vor allem deren Kardiotoxizität ein großes Problem in der Therapie dar.

Doxorubicin ist das am häufigsten verwendete Anthrazyklin. Es besteht aus einem tetrazyklischen Grundgerüst, dem planaren Antrachinon. Am C1-Atom hängt β -glykosidisch ein Glukosaminrest, an C3 eine OH-Gruppe und ein Acrylatrest. Darüber hinaus sind zwei OH-Gruppen an C5/12, an C6/11 zwei Hydroxylgruppen und ein Methylrest als Carbonsäureester an C10 angehängt.

Doxorubicin hat eine molekulare Masse von 543,52 g/mol und die Konzentration, bei der die Hälfte aller behandelten Mäuse verstirbt (LD_{50} Maus), liegt bei 570 mg/kg Körpergewicht. Doxorubicin hat eine Halbwertszeit von 12 bis 18,5 Stunden und wird vorwiegend hepatisch über CYP3A4, einem Vertreter der Cytochrom P450 Familie, metabolisiert. Die Ausscheidung erfolgt biliär.

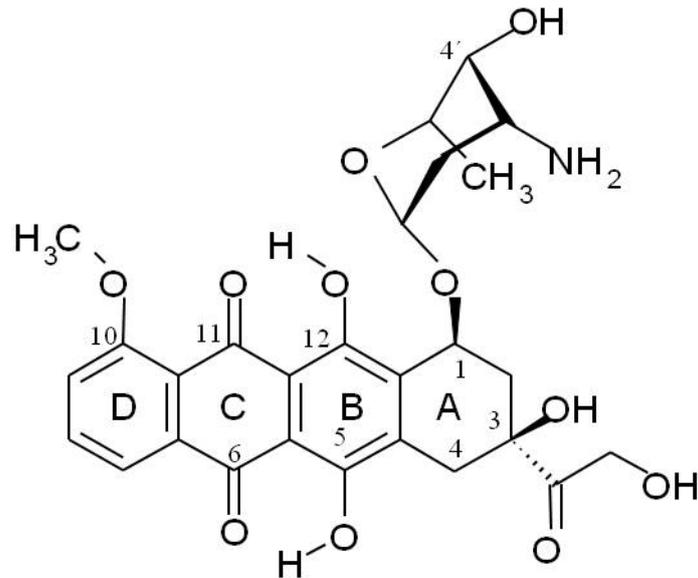


Abb. 1: Strukturformel von Doxorubicin

(7S,9S)-7-[(2R,4S,5S,6S)-4-Amino-5-hydroxy-6-methyloxan-2-yl]oxy-6,9,11-trihydroxy-9-(2-hydroxyacetyl)-4-methoxy-8,10-dihydro-7H-tetracen-5,12-dion (IUPAC).

2.1.2 Antineoplastische Wirkung der Anthrazykline

Die Vermittlung der antineoplastischen Wirkung der Anthrazykline ist vielfältig. Sie interkalieren in die DNA, führen Doppelstrangbrüche herbei und deaktivieren die Topoisomerase. Dadurch kommt es zur Arretierung der Zelle im G₁/G₂-Stadium und zur Einleitung der Apoptose über p53. p53 aktiviert das proapoptotische Gen Bax und führt über die Ausschüttung von Cytochrom c und dem Apoptosis inducing factor zur Initiierung des Caspase-Systems und zur Apoptose. Darüber hinaus werden abbauende Enzyme, z. B. Proteasomen, gehemmt, die physiologisch fehlerhafte Proteine abbauen.

2.1.2.1 Radikalbildung durch Anthrazykline

Eine weitere Eigenschaft der Anthrazykline ist die Fähigkeit, Radikale bilden zu können. Tritt ein Elektron in Interaktion mit der Quinongruppe am C-Ring von Doxorubicin, entsteht ein Semiquinon. Diese Reaktion wird durch verschiedene NAD(P)H-Oxidations-/Reduktions-Systeme begünstigt. Dazu gehören zum Beispiel Cytochrom P450/b3, mitochondriale NADH-Dehydrogenasen, Xanthin-Dehydrogenasen und endotheliale Stickstoffoxid-Synthetasen. Das Semiquinon wird durch Reduktion von O₂ zu reaktiven Sauerstoffradikalen (reactive oxygen species: ROS) wie einem Superoxidanion (O₂^{•-}) oder Wasserstoffperoxid (H₂O₂) wieder in die

Quinon-Gruppe überführt. Alternativ kann die Bindung zwischen dem Daunosamin (Zuckerrest des DOX) und dem A-Ring oxidiert werden. Dabei entsteht 7-Deoxyglycon, das aufgrund seiner hohen Lipophilie mit der Zellmembran interkaliert und dort ROS bildet. Dieser Reduktions-/Oxidations-Zyklus ist mit einer Eisenfreisetzung aus den intrazellulären Speichern vergesellschaftet. Das Eisen ist obligater Bestandteil der Reaktion, dabei geht ein Eisenatom mit drei Molekülen Doxorubicin einen Komplex ein. Dieser Komplex kann die entstandenen Superoxidanionen und Wasserstoffperoxidmoleküle in noch potentere Hydroxyl-Radikale ($\bullet\text{OH}$) umwandeln (Minotti et al., 1999, Myers, 1998).

Die NADPH-Oxidase ist ebenfalls an der Modulation freier Sauerstoffradikale durch Doxorubicin beteiligt. In Wildtyp-Mäusen bewirkte die Behandlung mit Doxorubicin eine Abnahme der linksventrikulären Funktion. Mäuse mit einer defizitären Untereinheit gp91 dieses Enzyms zeigten keine Funktionseinschränkungen (Wojnowski et al., 2005). Die reaktiven Sauerstoffradikale bewirken DNA-Strangbrüche durch Oxidierung der DNA-Basen (DNA-Basenmodifikation) und des Desoxiribose-Skeletts (Fragmentierung). ROS führen durch Freisetzung von Calcium aus den Mitochondrien (Senkung des mitochondrialen Membranpotentials) und Inaktivierung des Calciumtransportersystems im endoplasmatischen Retikulum zu einem Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration. Dieser intrazelluläre Calciumanstieg aktiviert Endonukleasen, die die Fragmentierung der DNA katalysieren (Kim et al., 2002).

Auch die Modulation von proapoptotischen und antiapoptotischen Signalen zu Gunsten der Apoptose konnte für ROS gezeigt werden (Kim et al., 2002). ROS und p53 stehen in enger Wechselbeziehung. ROS aktivieren p53 und verändern Signaltransduktionswege der Zellen unter anderem über die Inaktivierung des PI3K/AKT-Weges, indem sie PTEN hemmen. Die Vermittlung der Apoptose über die modulatorischen Prozesse und die Calciumfreisetzung sind vermutlich gewichtiger als die direkte DNA-Schädigung und die damit verbundene Apoptoseeinleitung durch ROS (Minotti et al., 2004). Radikalkonzentrationen, die zur direkten DNA-Schädigung benötigt werden, treten meist erst oberhalb der therapeutischen Dosen (max. Plasmaspiegel $> 5 \mu\text{mol/l}$ DOX) von Doxorubicin auf und gehen mit einer Zeitverzögerung um 16 h nach Applikation einher. Daher sind diese ROS-Konzentrationen eher auf den gestörten Zellmetabolismus zurückzuführen. Diskutiert

wird allerdings auch eine mangelnde Sensitivität der Nachweismethoden für ROS (Gewirtz, 1999).

2.1.2.2 Übersicht der antineoplastischen Effekte von Anthrazyklinen

Tabelle 1: Übersicht der antineoplastischen Effekte von Anthrazyklinen

Wirkmechanismus	Effekt	Literatur
DNA-Interkalierung	DNA-Strangbrüche, p53-Aktivierung	(Binaschi et al., 2001) (Gordon et al., 2001)
Topoisomerase-Inhibierung	DNA-Einzel-/Doppelstrangbrüche, Hemmung der Transkription, p53-Aktivierung	(Gordon et al., 2001) (Perego et al., 2001) (Zunino et al., 2001)
p53-Aktivierung	Arretierung und Einleitung der Apoptose über Hemmung der Cycline D/E und der Phosphorylierung von Rb. Bax-Upregulierung, Aktivierung des Caspase-Systems	(Minotti et al., 2004) (Penault-Llorca et al., 2003) (Ruiz-Ruiz et al., 2003) (Stearns et al., 2003)
Cytochrom c, Apoptosis inducing factor	Aktivierung von DNAasen, Zerstörung des Zytoskeletts, Chromatinkondensierung und DNA-Fragmentierung	(Clementi et al., 2003) (Daugas et al., 2000) (Minotti et al., 2004) (Pastorino et al., 1998) (Wang et al., 1998)
Proteasomen-Interaktion	Transport des Doxorubicins in den Zellkern, Hemmung des Proteasoms und Akkumulation von ansonsten kurzlebigen und falschen Proteinen	(Adams, 2003) (Figueiredo-Pereira et al., 1996) (Kiyomiya et al., 2001)
Radikalbildung	Exazerbation der ROS: DNA-Basenmodifikation, DNA-Fragmentierung, Senkung des mitochondrialen Transmembranpotentials, p53-Aktivierung	(Kim et al., 2002) (Minotti et al., 1999) (Minotti et al., 2004) (Myers, 1998)
Lipidoxidation	Bildung von Malondialdehyd-DNA-Addukten → Basenfehlpaarung, Insertionen und Deletionen, Arretierung im Zellzyklus	(Marnett et al., 2003) (Minotti et al., 2004) (Niedernhofer et al., 2003)
Anthrazyklin-Formaldehydkonjugate	DNA-Interkalierung, Synthesehemmung, Strangbrüche, p53-Aktivierung	(Taatjes et al., 1999) (Taatjes et al., 2001)

2.1.3 Kardiotoxizität der Anthrazykline

Die Kardiotoxizität der Anthrazykline ist eine wichtige und die Therapie oftmals limitierende Nebenwirkung mit weitreichenden Folgen für Therapie und Prognose der Patienten. Es wird eine akute und eine chronische Kardiotoxizität unterschieden. Die akute Kardiotoxizität tritt innerhalb weniger Tage auf und äußert sich durch Herzrhythmusstörungen, Hypertension und eventuell einer milden Einschränkung der kontraktile Funktion. Diese akute Komplikation tritt in bis zu einem Prozent der Fälle auf und ist in der Regel vollständig reversibel. Seltener Komplikationen der akuten Kardiotoxizität sind Myokarditiden und Perikardergüsse (Zucchi et al., 2003).

Die bedeutsameren Komplikationen treten gegebenenfalls auch erst mit einer Latenz von vielen Jahren als manifeste Herzinsuffizienz auf. In Myokardbiopsien imponiert dies durch den Verlust von Myofibrillen, einer Dilatation des sarkoplasmatischen Retikulums, einer Vakuolisierung des Zytoplasmas, einer Mitochondrienschwellung und einer massiven Steigerung der Lysosomenzahl (Singal et al., 2000). Das Ausmaß der Kardiotoxizität ist umgekehrt proportional zur Aktivität und Menge der P-Glykoproteintransporter in dem Endothel der Arteriolen und Kapillaren des Herzens. Der Akkumulation von Anthrazyklinen in den Kardiomyozyten wird durch diesen Transporter entgegengewirkt. Es zeigt sich also ein direkter Zusammenhang zwischen der akkumulierten Menge der Anthrazykline in den Kardiomyozyten und deren Schädigung (Meissner et al., 2002). Swain et al. (2003) konnten den Zusammenhang einer steigenden Prävalenz an kardialen Ereignissen bei steigender Kumulativdosis von Doxorubicin zeigen. So zeigen bei einer Gesamtdosis von 550 mg/m² 65% der Patienten kardiale Einschränkungen im Sinne einer eingeschränkten linksventrikulären Herzleistung. Auch eine Abhängigkeit vom Alter und der Dosierungsschemata wird immer wieder diskutiert. Zunächst schien es, als seien Kinder weniger anfällig für die Entwicklung einer Kardiomyopathie. Es zeigte sich jedoch, dass sie lediglich eine längere Latenzphase aufweisen und oftmals erst im Erwachsenenalter eine manifeste und klinisch relevante Herzinsuffizienz entwickeln (Von Hoff et al., 1979). Die maximale Gesamtdosis des Doxorubicins wurde auf 500 mg/m² festgelegt, da bei höheren Konzentrationen die Komplikationsraten deutlich ansteigen. Man entdeckte strukturelle Veränderungen in Myokardbiopsien allerdings bereits bei deutlich geringeren (< 500 mg/m²) Dosen von Doxorubicin (Niitsu et al., 1998). Es scheint eine individuelle Varianz durch eine mögliche genetische

Komponente zu bestehen, die bei einigen Patienten schon bei geringen Dosen zur Entwicklung einer Herzinsuffizienz führt.

2.1.3.1 Modulation durch Komedikation

Anthrazykline können auch in geringen kumulativen Dosen eine relevante Kardiotoxizität bewirken, wenn sie in Kombination mit einigen anderen Medikamenten verabreicht werden. Zu diesen Medikamenten gehören Taxane, Trastuzumab und Cyclooxygenase-2-Inhibitoren.

Taxane (Paclitaxel, PTX) sind Inhibitoren der Mikrotubuli, induzieren in Mammakarzinomzellen die Apoptose und hemmen die Tumorangio-genese (Grant et al., 2003). Diese Kombination hat den Vorteil einer sehr hohen Response-Rate, aber auch den Nachteil einer hohen Inzidenz (18%) der chronischen Herzinsuffizienz bei einer kumulativen Doxorubicindosis von „nur“ 480 mg/m² (Gianni et al., 1995).

Trastuzumab ist ein monoklonaler Antikörper gegen die transmembranöse Tyrosin-Kinase HER2. HER2 spielt eine essentielle Rolle in Transkriptionswegen, die zum Wachstum und Überleben der Kardiomyozyten beitragen. Man konnte in der Kombination von Anthrazyklinen und Trastuzumab (+ evtl. Paclitaxel) auch primär chemoresistente Mammakarzinome therapieren. Allerdings waren signifikant höhere Inzidenzen für die chronische Herzinsuffizienz beobachtet worden. Unter der Anthrazyklin-/Cyclophosphamid-Therapie traten in 8% der Fälle und unter der Therapie mit Anthrazyklin/Cyclophosphamid + Trastuzumab in 27% der Fälle eine chronische Herzinsuffizienz auf (Slamon et al., 2001). Bei einer alleinigen Therapie mit Trastuzumab trat die chronische Herzinsuffizienz in 7% der Fälle auf.

Cyclooxygenasen (COX) sind Enzyme, die Arachidonsäure in Prostaglandin H₂ überführen. Eine Überexpression vor allem der COX-2 führt zur Stimulation der epithelialen Zellproliferation, Angiogenese und Apoptosehemmung. COX-Inhibitoren könnten durch die Hemmung potentiell kardioprotektiver Prostaglandine unter einer laufenden Anthrazyklintherapie die akute Kardiotoxizität und die Apoptoseraten der Kardiomyozyten potenzieren (Dowd et al., 2001).

2.1.3.2 Mechanismen der Kardiotoxizität

Es existieren mehrere Mechanismen der Anthrazyklin-vermittelten Kardiotoxizität, einer besteht in der Einleitung der Apoptose der Kardiomyozyten.

Doxorubicin induziert über DNA-Schäden und p53 sowie über einen noch nicht vollständig geklärten Mechanismus auf Transkriptionsebene die Hochregulation von Bax und daraus resultierend die Apoptoseeinleitung (Wang et al., 1998). Doxorubicin aktiviert saure Sphingomyelinasen, die Ceramide freisetzen. Ceramide vermitteln über die spannungsgesteuerten Typ-B-Ca²⁺-Kanäle eine PT-Porenaktivierung, die zur Cytochrom c- und AIF-Freisetzung und zur Schwellung der Mitochondrien führt (Henaff et al., 2002). Dadurch kommt es zur Aktivierung des Caspasensystems und zur Induktion der Apoptose. Darüber hinaus führt der Ca²⁺-Ausstrom aus den Mitochondrien zur Aktivierung von Endonukleasen mit anschließender DNA-Fragmentierung. Dieser Mechanismus der Ceramidbildung ist mit Carnitin, einem Inhibitor der sauren Sphingomyelinase, antagonisierbar.

Über freie Sauerstoffradikale kommt es zu einer vermehrten Degradation der gesamten Gata4-mRNA, zu einer verminderten Transkription durch Modulation des Promotors von GATA4 und zur Herabsetzung der DNA-Bindungsaktivität (Kim et al., 2002). Darüber hinaus scheint der PI3K/Akt-Signaltransduktionsweg eine wichtige Rolle zu spielen. GATA4 ist ein wichtiger Faktor in der embryonalen Entwicklung und Differenzierung von Zellen und ist speziell in Bezug auf Kardiomyozyten ein Survivalfaktor. Es ist unter anderem ein Transkriptionsfaktor für Bcl-X_L, Antioxidationsenzyme und die Stickstoffoxid-Synthetase. Im Zusammenhang mit der Cytochrom c-Freisetzung ist vor allem das Bcl-X_L von Bedeutung, da es antagonistisch zu Bax wirkt (Gille et al., 1997, Kim et al., 2003).

Ein weiterer wichtiger Mechanismus besteht in der Bildung von freien Sauerstoffradikalen über den Oxidations-/Reduktions-Zyklus der Anthrazykline. Das dabei entstandene 7-Deoxyaglycon akkumuliert unter anderem in der inneren Mitochondrienmembran. Es kommt dadurch zu Störungen der Elektronentransportkette und zum Abzug von Elektronen aus diesem System. So kommt es unmittelbar an der inneren Mitochondrienmembran zur Bildung von O₂[•] und H₂O₂ (Gille et al., 1997). Es wurde weiterhin gezeigt, dass die Exposition der Kardiomyozyten mit Doxorubicin ein weiteres wichtiges Enzym im Abbau der ROS,

nämlich die Selen-abhängige GSH-Peroxidase 1 (GSH-px1), inaktiviert (Doroshov, 1995, Siveski-Iliskovic et al., 1995). Ebenfalls wird die Kupfer-Zink-Superoxid-Dismutase (CuZn-SOD) in ihrer Aktivität durch Doxorubicin herabgesetzt, was zu einem Anstieg der noch potenteren Hydroxyl-Radikale ($\bullet\text{OH}$) führt (Li et al., 2002). Diese niedrigen Enzymaktivitäten und die damit verbundenen steigenden ROS-Konzentrationen erhöhen die kardiotoxischen Effekte wie direkte Schädigung der DNA, mRNA und der Zellmembranen und Steigerung des apoptotischen Signals über die Aktivierung von p53/Bax (Miyashita et al., 1995).

Anthrazykline aktivieren ROS-abhängig die p38 MAPK (mitogen-activated-protein-kinase), die wiederum den Transkriptionsfaktor NF- κ B aktiviert. Dies führt über die Heraufregulierung apoptotischer Gene (FasL, Fas c-myc) und die Herabregulierung antiapoptotischer Gene (Bcl-X_L, Bcl-2) in Kardiomyozyten zur Aktivierung der Apoptose. Dieser Weg ist durch NF- κ B-Inhibitoren wie SN50 inhibierbar (Minotti et al., 2004, Poulaki et al., 2002, Wang et al., 2002)

Doxorubicin reduziert die Expression der sarkoplasmatischen Ca²⁺-ATPase (SERCA) und inhibiert bestehende Moleküle durch Bindung einer SH-Gruppe der SERCA an seine Quinon-Gruppe (Burke et al., 2003, Shadle et al., 2000). Über die SERCA wird der positiv inotrope und positiv lusitrope Effekt der Katecholamine am Herzen vermittelt. Weitere wichtige Proteine, deren Expression herunterreguliert wird, sind Ryanodinrezeptor 2 (RyR2), Phospholamban und Calsequestrin (Ito et al., 1990, Jeyaseelan et al., 1997, Jeyaseelan et al., 1997). Durch diese massive Depletion wichtiger kardialer Proteine kommt es zur diastolischen (Relaxationsstörung) und systolischen (Kontraktionsstörung) Dysfunktion. Außerdem erfolgt durch die Nitrierung der CK-MB deren Inaktivierung und die Herunterregulierung der ADP/ATP-Translokase und der Mt-CK. Somit ist nicht nur die Energiebereitstellung über ATP in den Kardiomyozyten dauerhaft gestört, sondern auch die Beladung mit Ca²⁺ als Vermittler der Kontraktilität (Zhou et al., 2001).

Der sekundäre Alkoholmetabolit von Doxorubicin, Doxorubicinol, vermittelt weitere wichtige kardiotoxische Effekte. Doxorubicinol reduziert die Expression wichtiger Proteine wie der Ca²⁺-gesteuerten Ca²⁺-Kanäle des sarkoplasmatischen Retikulums und der Ryanodin-Rezeptoren vom Typ 2, was mit einer Einschränkung der systolischen Funktion verbunden ist (Gambliel et al., 2002). Wichtige

Elektronenpumpen (wie z. B. $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -ATPase und Na^+/K^+ -ATPase) werden gehemmt und der Eisenhaushalt nachhaltig gestört (Narahari et al., 2000). Dadurch wird die Pufferung von ROS durch Redoxsysteme in den Kardiomyozyten reduziert und die toxischen Effekte werden eskaliert (Minotti et al., 2004).

2.1.3.3 Übersicht der kardiotoxischen Effekte von Anthrazyklinen

Tabelle 2: Übersicht der kardiotoxischen Effekte von Anthrazyklinen

Wirkmechanismus	Effekt	Literatur
ROS	Verstärkte Produktion von ROS durch Downregulation antioxidativer Enzyme führt zur vermehrten DNA-Schädigung	(Gille et al., 1997) (Li et al., 2002) (Minotti et al., 2004)
GATA4-Downregulierung	Direkter Effekt auf den Promotor des GATA4, welches als Survivalfaktor in Kardiomyozyten fungiert	(Kim et al., 2002)
Inhibierung der AKT und PI3K	Fehlende p53 Inhibierung, Apoptoseinitialisierung über Bad und Caspase 9, Hemmung von Wachstumsfaktoren und Arretierung im Zellzyklus	(Bergmann et al., 2004) (Chu et al., 2004) (Kang et al., 2000) (Minotti et al., 2004) (Miyashita et al., 1995)
Ceramidfreisetzung	DOX induzierte Ceramidfreisetzung führt zur Schwellung der Mitochondrien und Cytochrom c-Ausschüttung	(Henaff et al., 2002)
NF- κ B-Aktivierung	Transkription von ca. 200 Effektorgenen mit resultierendem apoptotischen Übergewicht	(Minotti et al., 2004) (Poulaki et al., 2002) (Wang et al., 2002)
Downregulation von - SERCA - Ryanodinrezeptoren - Phospholamban - Elektronenpumpen durch Doxorubicinol	Störung der Eisen- und Calciumhomöostase → Dysfunktion in der Energie- und Redoxkapazität, kontraktile Dysfunktion	(Minotti et al., 2004) (Gambliel et al., 2002) (Narahari et al., 2000)

2.1.3.4 Mechanismen zur Reduktion der Kardiotoxizität

Einer kurzen Bolus-Injektion über 15 Minuten wird gegenüber einer längeren Applikationsdauer von 48 bis 96 Stunden aufgrund der dann erhöhten Rate an Nebenwirkungen (Erbrechen, Schwindel, Myelotoxizität, erhöhtes Risiko einer sekundären malignen Entartung) der Vorzug gegeben. Die Entwicklung der

Herzinsuffizienz scheint allerdings eher von der maximalen Doxorubicinkonzentration als von der Gesamtdosis abzuhängen.

Dexrazoxan, ein Eisenchelator, konnte in der Behandlung des metastasierten Mammakarzinoms das Risiko der Entwicklung einer Herzinsuffizienz bei einer Gesamtdosis von mehr als 300 mg/m² Doxorubicin reduzieren. Dexrazoxane selbst haben geringe antineoplastische Eigenschaften, die über die Inhibierung der Topoisomerase II vermittelt werden. Anfängliche Befürchtungen, dass die Responderaten unter der Kombinationstherapie sinken könnten, bestätigten sich nicht (Hensley et al., 2009). Die Behandlung wird aufgrund nicht ausreichender Daten aktuell nur im Rahmen klinischer Studien beim metastasierten Mammakarzinom empfohlen.

Ein weiterer Ansatzpunkt ist es, die antioxidative Kapazität der Kardiomyozyten zu erhöhen. Man konnte nämlich zeigen, dass Mäuse mit einer kardialen Überexpression des mitochondrialen MnSOD (Yen et al., 1996) und Cystein-reichen Metallothionin (Sun et al., 2001) deutlich weniger kardiale Schäden nach einer Anthrazyklinbehandlung zurückbehielten. Flavanoide, die in Tierversuchen eine Inhibierung der Carbonyl-Reduktase und somit eine Reduktion der DOXol-Konzentrationen in den Kardiomyozyten bewirkten (Mordente et al., 2003), befinden sich aktuell in der klinischen Untersuchung.

Anthrazykline wirken nicht spezifisch in Tumoren, sondern im gesamten Körper. Durch liposomales Coating sollen sich die Anthrazykline in Tumoren anreichern, aber auch zu geringeren Konzentrationen in schützenswerten Organen wie dem Herzen führen. Das Polyethylenglycol-Coated ("Pegylated") Liposomale Doxorubicin ist mit seiner Pharmakokinetik und seinem Nebenwirkungsprofil dem freien Doxorubicin überlegen. Es zeigten sich deutlich weniger Einschränkungen in der LVEF bei kumulativen Dosen über 500 mg/m². Es wird heute zur Behandlung von Glioblastomen und dem primär chemoresistenten Ovarialkarzinom eingesetzt (Safra et al., 2000). Es existieren noch weitere Ansätze, die Anthrazyklinmoleküle zu verändern. So wurde versucht, sie mit HER2/neu-Antikörpern (Mammakarzinom) oder mit CD19 (Myelomzellen) zu koppeln, um spezifischer in Tumoren wirken zu können (Drummond et al., 1999).

2.1.3.5 Therapieoptionen der Anthrazyklin-induzierten Herzinsuffizienz

Die manifeste Anthrazyklin-induzierte Herzinsuffizienz hat im Vergleich zu anderen Herzinsuffizienzformen mit einer 2-Jahres-Mortalitätsrate von 60% die schlechtere Prognose. Cardinale et al. (2010) konnten zeigen, dass das Ansprechen auf eine moderne Herzinsuffizienztherapie entscheidend vom Intervall zwischen dem Auftreten einer Einschränkung der LVEF und dem Beginn der Behandlung abhängt. Dieses Intervall und die Ausprägung der Herzinsuffizienz nach der NYHA-Einteilung sind die maßgeblichen prognostischen Faktoren. So waren in einem Intervall von ein bis zwei Monaten 64%, von zwei bis vier Monaten 28% und von vier bis sechs Monaten 7% der Patienten als Responder (LVEF \geq 50%) zu bezeichnen (Cardinale et al., 2010). Unter den Respondern waren ca. 90% der Patienten innerhalb von zwei Jahren eventfrei (Herzinsuffizienz-assoziiertes Tod, akutes Lungenödem, Notwendigkeit der stationären Behandlung, Schrittmacherimplantation). Behandelt wurde mit einer Kombination aus ACE-Hemmern (Enalapril, Zieldosis 20 mg/Tag) und einem β -Rezeptorblocker (Carvediol, β 1- β 2- α -Blockade, antioxidativ, antiproliferativ, Stimulation der NO-Freisetzung, Zieldosis max. 50 mg/Tag) (Cardinale et al., 2010). Insgesamt waren 42% der Patienten Responder und weitere 13% zeigten eine Verbesserung der LVEF (+10%, jedoch $<$ 50%) nach sechs Monaten. Bei 45% der Patienten konnte die LVEF nicht um 10% gesteigert werden; diese waren zum Behandlungsbeginn in das NYHA Stadium III oder IV eingeordnet worden und die Symptomatik bestand seit mindestens vier Monaten (Cardinale et al., 2010). Die Behandlungsoptionen einer manifesten Anthrazyklin-induzierten Herzinsuffizienz im Stadium NYHA III und IV sind sehr beschränkt. Daher sollten ein möglichst engmaschiges Screening und eine frühzeitige Therapie erfolgen. Die letzte Behandlungsoption besteht in einer Herztransplantation. Ansonsten wird die Therapie gemäß der Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie (Leitlinien zur Therapie der chronischen Herzinsuffizienz) empfohlen (Hoppe et al., 2005).

2.2 HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren (Statine)

Statine sind kompetitive Inhibitoren der 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A- (HMG–CoA)-Reduktase, dem Schlüsselenzym in der Cholesterinbiosynthese, und blockieren so die endogene Cholesterinproduktion. Sie führen zu einem Abfall der Cholesterinplasmakonzentration und zu einer positiven Veränderung des Lipidprofils. Die Plasmakonzentration des low-density-lipoprotein (LDL) sinkt durch einen vermehrten Abbau und eine vermehrte Aufnahme in die Leber um ca. 30% (Violi et al., 2002). Die LDL-Rezeptordichte in der Leber steigt signifikant an. Unter der Statintherapie steigen sowohl die Expression der HMG-CoA-Reduktase als auch ihre Halbwertszeit deutlich an.

Durch die Hemmung der Cholesterinbiosynthese zu diesem frühen Zeitpunkt ergeben sich vielfältige potentiell erwünschte und unerwünschte Wirkungen. Ubichinon als Vorstufe des Coenzym Q, Häm, Dolichinon, Gallensäuren, fettlösliche Vitamine, Steroidhormone und Lipoproteine werden vermindert gebildet. Auch die Farnesylierung von Proteinen ist eingeschränkt. Die Farnesylierung beschreibt die posttranslationale Modifikation von Proteinen. Es werden Terpen-Reste (z. B. Farnesol, Geranylgeranylpyrophosphat) kovalent an die Cysteinreste der Proteine gebunden. Dadurch entstehen große hydrophobe Gruppen, die als Membrananker fungieren und obligat für die korrekte Lokalisierung und Funktion vieler Proteine sind. Dazu gehören ebenfalls kleine GTPasen, die an der Signaltransduktion beteiligt sind.

Neben der Senkung des Cholesterinspiegels werden sie aufgrund ihrer antiinflammatorischen, antiproliferativen und antithrombotischen Eigenschaften zur Therapie von kardiovaskulären Erkrankungen (KHK, Angina pectoris, Infarktprophylaxe) eingesetzt. Sie gehören weltweit zu den meist verschriebenen Medikamenten, ihr Nutzen in der Primär- und Sekundärprävention kardiovaskulärer Erkrankungen ist bewiesen (Violi et al., 2002). Statine sind in der Regel gut verträglich, ganz selten zwingen Nebenwirkungen - v. a. die Rhabdomyolyse - zum Abbruch der Therapie.

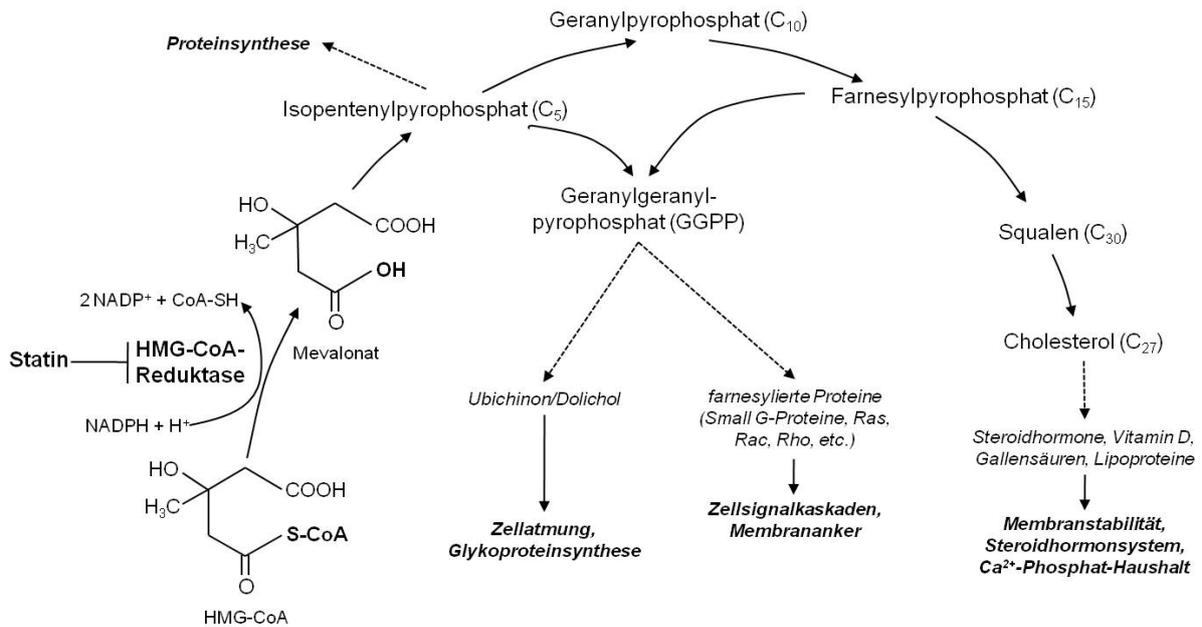


Abb. 2: Cholesterinbiosynthese und Wirkmechanismus der Statine

Abbildung 11 zeigt schematisch die Cholesterinbiosynthese sowie die Bedeutung der einzelnen Zwischenprodukte. Statine hemmen das Schlüsselenzym der Cholesterinbiosynthese, die HMG-CoA-Reduktase, und verhindern so die Umwandlung von HMG-CoA in Mevalonat.

2.2.1 Statine: Cholesterin-unabhängige Effekte

Die Reduktion der linksventrikulären Funktion ist bei der chronischen Herzinsuffizienz mit einem Anstieg des oxidativen Stresses assoziiert (Belch et al., 1991). Freie Sauerstoffradikale spielen eine wichtige Rolle bei der Entwicklung von Myokardhypertrophie, kontraktile Dysfunktion und Atherosklerose (Dhalla et al., 2000).

Als wichtige Quelle der ROS in Kardiomyozyten wurde die NADPH-Oxidase (phagocyte-type) identifiziert (Laufs et al., 2002). Sie katalysiert folgende chemische Reaktion: $2 \text{O}_2 + \text{NADPH} \rightarrow 2 \cdot \text{O}_2^- + \text{NADP}^+ + \text{H}^+$. O_2^- wird im Verlauf zu H_2O_2 und $\cdot\text{OH}$ umgewandelt. Es handelt sich um ein komplexes enzymatisches System, das aus dem membranbindenden Cytochrom b_{558} (Heterotrimer aus $\text{gp}91^{\text{phox}}$ und $\text{p}22^{\text{phox}}$), aus den zytosolischen Regulationseinheiten $\text{p}47^{\text{phox}}$ / $\text{p}67^{\text{phox}}$ und aus dem kleinen GTP-bindenden Protein $\text{rac}1$ besteht. Die Prenylierung von $\text{rac}1$ an seinem C-terminalen Ende ist Voraussetzung für die Translokation in die Plasmamembran

und katalysiert den Austausch von GDP durch GTP an der regulatorischen Domäne (Laufs et al., 2002, Pracyk et al., 1998).

Freie Sauerstoffradikale begünstigen die Entwicklung des Vorhofflimmerns und der Herzinsuffizienz. Sie aktivieren über die redoxsensitive Kinase ASK-1 (apoptosis-regulating kinase 1) die p38 MAPK (mitogen-activated protein kinase). Downstream werden dann über die Modulation von IL-1 β hypertrophe Adaptionsmechanismen in Gang gesetzt und über NF- κ B die Apoptose eingeleitet.

Eine Heraufregulierung der rac1-GTPase-Aktivität ist mit einem Anstieg der NADPH-Oxidase-Aktivität und der $\bullet\text{O}_2^-$ -Produktion vergesellschaftet (Diekmann et al., 1994). Die Hemmung von rac1 durch bakterielle Toxine oder negativ dominante Mutanten mindert die Ausbildung der Hypertrophie und die ROS-Bildung unter einer Stimulation der NADPH-Oxidase mit Angiotensin II (Laufs et al., 2002). Es konnte gezeigt werden, dass die Hemmung der Isoprenoidproduktion durch Statine die rac1-GTPase-Aktivität reduziert und so der NADPH-Oxidase-abhängigen ROS-Produktion entgegenwirkt (Maack et al., 2003).

2.2.2 Statine und Apoptose

Statine werden sowohl antiapoptotische als auch proapoptotische Eigenschaften zugesprochen. Antiapoptotische Effekte wie die MDM2-Phosphorylierung und p53-Hemmung, die Hemmung von Bax und Caspase 9 sind Folge der AKT-Phosphorylierung (Kim et al., 2006, Minotti et al., 2004). Auch die Reduktion von ROS durch die fehlende Prenylierung der rac1-GTPase und die damit verbundene Aktivitätsminderung der NADPH-Oxidase tragen zur Prävention der Apoptose bei. Abgerundet wird dies durch den GSK3-vermittelten Überlebens- bzw. Hypertrophiestimulus.

HMG-CoA-Reduktase-Hemmer reduzieren die antiapoptotischen Proteine Bcl-2 und Bcl-X_L (Blanco-Colio et al., 2003, Blanco-Colio et al., 2002, Demyanets et al., 2006) auf 34 % der Kontrollwerte (Kirshenbaum et al., 1997). Diese Herunterregulierung führt zu einem Übergewicht der proapoptotischen Faktoren (Bax, Bad), die über eine Ausschüttung von Kalzium, Apoptosis inducing factor und Cytochrom c aus den Mitochondrien die Apoptose induzieren. Unter der Statinexposition steigen die Histon-assoziierten DNA-Fragmente im Zytoplasma dosisabhängig bis auf das

Siebenfache an. Dieser Anstieg der DNA-Komplexe ist charakteristisch für apoptotische Veränderungen der Zelle und kann mit Mevalonat und Geranylgeranylpyrophosphat antagonisiert werden (Demyanets et al., 2006, Wyllie et al., 1980). Die gesteigerten Apoptoseraten wurden darüber hinaus mittels TUNEL-Färbung, Apoptosis laddering Kit (Ogata et al., 2002) und Cell death Assays (Muck et al., 2004) bestätigt. Die ausbleibende Prenylierung der Rho-GTPasen trägt zu der Herunterregulierung von Bcl-2 bei (Blanco-Colio et al., 2003) und führt zu einem Wegfall von Wachstums- und Differenzierungsstimuli (GATA4, Nkx-2.5, ERK, MAPK) in den Kardiomyozyten (Wei et al., 2002). Dies kann einerseits sinnvoll im Sinne eines Schutzes vor der maladaptiven Hypertrophie sein, andererseits können Statine unter Umständen die Apoptose begünstigen.

Statine können tumorspezifisch die Apoptose triggern. Sie arretieren den Zellzyklus im Übergang zwischen der G1- und S-Phase; dies wird experimentell genutzt, um die Zellen in ihrem Zyklus zu synchronisieren, da dieser Effekt mit Mevalonat antagonisierbar ist (Keyomarsi et al., 1991). Auf zellulärer Ebene ist dieser Mechanismus p5-abhängig und läuft über eine Herunterregulierung der Aktivität der Cyclin dependent Kinase 2 (CDK2) und einer damit vergesellschafteten Hochregulierung der CDK-Inhibitoren p21^{Cip1} und p27^{Cip1} (Lee et al., 1998). Zusätzlich scheint eine Hemmung der Proteasomenfunktion durch Statine eine Rolle zu spielen (Rao et al., 1999). Der genaue Mechanismus, über den der Effekt der Statin-induzierten Apoptose vermittelt wird, ist unklar. Experimentelle Versuche zeigten, dass sich die Zelle im Stadium der Proliferation befinden muss (Wang et al., 2002). Der molekulare Mechanismus zur Apoptoseinduktion läuft in Tumorzellen ebenfalls über eine transiente Herunterregulierung des Transkriptionsfaktors Bcl-2. Sie wird über den intrinsischen mitochondrialen Signaltransduktionsweg mit Cytochrom c-Efflux, Aktivierung von Caspase 3 und PARP(Poly-ADP-ribose-polymerase)-Spaltung vermittelt (Dimitroulakos et al., 2000). Die Apoptose konnte allein durch Substitution von Geranylgeranylpyrophosphat (GGPP) gehemmt werden und umgekehrt durch die Hemmung der Geranylgeranyl-Transferase mittels GGTI-298 induziert werden (Xia et al., 2001). Dieser Mechanismus ist daher abhängig von der Modulation von Zellsignaltransduktionswegen, vom Membranankern und von der Mitochondrienfunktion. Statine (Lovastatin) können die antineoplastische Wirkung von Doxorubicin in verschiedenen Tumorzellreihen (Kolonkarzinom, Astrozytom,

Melanom) potenzieren (Feleszko et al., 2000). Es werden verschiedene Mechanismen, die einerseits Wachstumsstimuli reduzieren und andererseits über die Hemmung von PI3K, MAPK und Proteasomen proapoptotisch wirken, diskutiert (Feleszko et al., 2000).

2.3 Fragestellung

Anthrazykline gehören zu den bedeutendsten Medikamenten in der Tumorthherapie. Ihre Nebenwirkungen - insbesondere die Herzinsuffizienz - können jedoch therapielimitierend sein. Ein Hauptmechanismus der Kardiotoxizität besteht in der Erhöhung der freien Sauerstoffradikale über verschiedene Wege.

Statine reduzieren freie Sauerstoffradikale im Herzen effektiv über die Herunterregulierung der NADPH-Oxidase-Aktivität. Sie erhöhen die antineoplastische Wirkung von Doxorubicin zumindest in einigen Tumoren.

Ziel der Arbeit ist es, den Einfluss von HMG-CoA-Reduktase-Hemmern bei der Anthrazyklin-induzierten Kardiomyopathie zu untersuchen. Folgenden Fragestellungen wird nachgegangen:

1. Wie wirkt sich der Effekt der Statine auf die Anthrazyklin-induzierte Modulation freier Sauerstoffradikale aus?

Wir untersuchen die Produktion freier Sauerstoffradikale sowohl in der Aorta als auch im Myokard unter der Behandlung mit Doxorubicin, Atorvastatin und der Kombination beider im Vergleich zur Kontrolle.

2. Können Signaltransduktionswege und die Apoptose durch Statine günstig beeinflusst werden?

In InVitro- und InVivo-Versuchen untersuchen wir Apoptoseraten (TUNEL-Färbung, Cell Death ELISA) und indirekte Indikatoren wie den Anteil der Fibrosierung im Myokard. Darüber hinaus betrachten wir den Einfluss der Behandlung auf wichtige Transkriptionsfaktoren wie Gata4/6 und Mef2c.

3. Welchen Einfluss haben Statine auf die Entwicklung der chronischen Herzinsuffizienz?

Die chronische Herzinsuffizienz ist in erster Linie durch eine Abnahme der systolischen Herzfunktion (linksventrikuläre Ejektionsfraktion, Verkürzungsfraktion) gekennzeichnet. Anhand von InVivo-Versuchen an C57/B16-Mäusen, die mit Doxorubicin, Atorvastatin und deren Kombination behandelt werden, messen wir mittels Echokardiographie die linksventrikuläre Funktion. Im Working Heart-Versuch bei gleichem Versuchsprotokoll untersuchen wir die systolische und diastolische Funktion der Herzen in Abhängigkeit von Vor- und Nachlast.

3. Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Versuchsmaterial

3.1.1.1 Neonatale Kardiomyozyten

Die neonatalen Kardiomyozyten wurden aus zwei bis vier Tage alten Ratten isoliert. Die Isolierung wurde unter einer Sterilbank durchgeführt. Die Ratten wurden dekapiert und die Herzen über einen sternalen Schnitt entnommen. Sie wurden in eiskaltem ADS-Puffer gesammelt, von den Gefäßstümpfen befreit und in frischen eiskalten ADS-Puffer überführt. Danach wurden sie in kleine Stücke (1 mm²) geschnitten und in 10 ml Enzympuffer (0,6 mg/ml Pankreatin und Kollagenase Typ 2) für 3 min. bei 37°C inkubiert. Der Überstand mit bereits gelösten Zellen wurde verworfen und erneut 10 ml Enzympuffer dazugegeben. Es wurden Inkubationszeiten von 20 min. - 25 min. - 25 min. -15 min. -10 min. bei 37°C streng eingehalten. Nach der jeweiligen Inkubationszeit wurde der Überstand (ca. 10 ml) in ein 50ml-Flacon überführt und die Enzymreaktion mit 2 ml NCS gestoppt. Dann wurde der Überstand für 5 min. bei RT und 700 rpm zentrifugiert und das verbliebene Zellpellet in 4 ml NCS gelöst und bei 37°C, 5% CO₂ bis zur letzten Inkubationszeit verwahrt. Nach dem letzten Inkubationsschritt wurden alle gelösten Pellets zusammengeführt und noch einmal 5 min. bei RT und 700 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 4 ml Kardiomyozytenmedium gelöst. Die Zellsuspension wurde steril filtriert (Falcon cell strainer, 70 µm), wobei je 1 ml Kardiomyozytenmedium vor- und nachgegeben wurde. Die so entstandenen 6ml-Zellsuspensionen wurde auf einer P6-Schale für mindestens 1 h Stunde bei 37°C inkubiert. Da Fibroblasten zuerst adhären, verbleiben nach einer Stunde fast ausschließlich Kardiomyozyten in Lösung. Nach der einstündigen Inkubation wurde das Medium mit den Kardiomyozyten abpipettiert und die Platte vorsichtig mit 2 ml Kardiomyozytenmedium gespült. Der Spülvorgang wurde wiederholt, wenn mikroskopisch noch viele schwimmende Kardiomyozyten zu beobachten waren. Aus den so gewonnenen 8- bzw. 10ml-Zellsuspensionen wurden 10 µl entnommen; diese wurden mit 10 µl Trypan blue versetzt und in einer Neubauer-Kammer die Zellen ausgezählt. Es wurden alle vier großen Quadrate gezählt und der Mittelwert

berechnet. Nach der Formel $2 \times \text{Mittelwert} \times 10.000 \times \text{Volumen der Zellsuspension}$ (8 bzw. 10 ml) wurde die Gesamtzahl der Kardiomyozyten errechnet. Nun wurden je ca. 2 Millionen Kardiomyozyten in je 3 ml Kardiomyozytenmedium in P6 Primerschalen ausgesät und bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert. Nach 48 h wurden die Zellen auf Dichte und Schlagverhalten beurteilt und das Medium durch serumfreies Kardiomyozytenmedium (Hungermedium) ersetzt. Nach weiteren 18 h wurden die Zellen stimuliert.

Alternativ wurden je 10.000 Kardiomyozyten pro Well auf 96-Well-Platten oder je 30.000 pro Chamber auf Chamber Slides (8 Chambers) kultiviert. Die Chamber Slides und 96-Well-Platten wurden vorher erst mit einprozentiger Gelatine für eine Minute und dann mit Laminin (20 µl/ml) für drei Stunden beschichtet. Die Inkubation erfolgte analog zu den P6-Schalen.

3.1.1.2 C57/B16-Mäuse

Für die InVivo-Versuche wurden sechs Wochen alte männliche C57/B16-Mäuse verwendet. Sie wurden in vier Gruppen unterteilt: eine Kontrollgruppe, eine Behandlungsgruppe mit Anthrazyklinen, eine Behandlungsgruppe mit Anthrazyklinen und Statinen sowie eine Gruppe, die mit Statinen allein behandelt wurde.

Der Kontrollgruppe wurde das entsprechende Volumen (100 µl) Lösungsmittel (DMSO) injiziert. Den Behandlungsgruppen wurde drei Tage vor Anthrazyklingabe das Lösungsmittel bzw. Statin appliziert. Doxorubicin wurde in einer standardisierten Dosis von 20 mg/kg Körpergewicht in zwei Einzelinjektionen zu je 19 mg/kg KG in einem Abstand von sieben Tagen verabreicht. Die Statine (Atorvastatin) wurden einmal täglich durch eine subkutane Injektion von 2 mg/kg Körpergewicht gegeben. Die subkutane Injektion wurde aufgrund der besseren Standardisierung der Dosen im Vergleich zur oralen Fütterung gewählt. Die Gesamtbeobachtungsdauer betrug maximal 28 Tage. Dieses Intervall konnte unter Umständen unterschritten werden, wenn der Gesundheitszustand der Tiere eine Fortführung des Versuchs nicht zuließ. Die Tiere wurden während der Behandlung unter Standardbedingungen gehalten und eine Mortalitätsstatistik geführt.

Dem Versuch vorangegangen war eine Beantragung der Versuche sowie deren Genehmigung durch das Veterinäramt des Saarpfalz-Kreises, die

Kreispolizeibehörde Homburg und die Tierschutzbeauftragte der Universität des Saarlandes.

3.1.2 Verwendete Substanzen

3.1.2.1 Antikörper

Tabelle 3: Antikörper

Produkt	Hersteller
GATA 4 (H-112)/(C20)	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
GAPDH (9 B3)	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
Cleaved Caspase 3 (H-227)	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
p-AKT (Ser 473)/(Thr 308)	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
Goat Anti-Rabbit IgG-Peroxidase	Sigma-Aldrich Chemie, München
Rabbit Anti-Goat IgG-Peroxidase	Sigma-Aldrich Chemie, München

3.1.2.2 PCR-Primer

Tabelle 4: PCR-Primer

Produkt	Hersteller
GATA 4	Sigma-Aldrich Chemie, München
GATA6	Sigma-Aldrich Chemie, München
GAPDH	Sigma-Aldrich Chemie, München
NKx 2.5	Sigma-Aldrich Chemie, München
MEF-2c	Sigma-Aldrich Chemie, München

3.1.2.3 Kits

Tabelle 5: Kits

Produkt	Hersteller
<i>In Situ</i> Cell Death Detection Kit, TMR red,	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Cell Death Detection ELISA plus	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
DC Protein Assay Reagent A	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
DC Protein Assay Reagent B	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Developer G 153 A Agfa	Mortsel, Belgien
Developer G 153 B Agfa	Mortsel, Belgien
ECL WB Detection Reagents	GE Healthcare, München
Kollagenase von <i>Clostridium histolyticum</i>	Worthington Biochemical, Lakewood, NJ, USA
Omniscript RT Kit 200	Qiagen, Hilden
Pankreatin	Sigma-Aldrich Chemie, München
Primer Random p(DN)s	Roche, Mannheim
RNAPure peqLab	Biotechnologie, Erlangen
RNAasin (RNAse Inhibitor) Promega	Madison, WI, USA

3.1.2.4 Geräte

Tabelle 6: Geräte

Produkt	Hersteller
ABI Prism 7700 Sequence Detection System	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Autoklaviergerät Tuttnauer 3850 EL	Tuttnauer Europe B.V., Breda, Niederlande
Eismaschine Scotsman Frimont MF 22	Scotsman Frimont, Milano, Italien
Entwicklungsautomat Curix 60	Agfa, Mortsel, Belgien
Metallblockthermostat HTMR-133	HLC Biotech, Bovenden
Mikroskope:	
Olympus CK 2 Inverted phase contrast	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg
Nikon SMZ 645	Nikon GmbH, Düsseldorf
mit Schott KL 1500 LCD Kaltlichtquelle	Schott AG, Mainz
Nikon Eclipse TS 100	Nikon GmbH, Düsseldorf
Millar-Tip-Katheter SPR-671	Millar Instruments, Houston, Texas USA
mit TF Verstärker	Hottinger Baldwin Messtechnik, Darmstadt
Mini Trans-Blot Cell	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA

Kap. 3. Material und Methoden

Mini-Protean Gelgießstand	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Mini Trans-Blot System	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Nagerbeatmungsgerät MiniVent Typ 845	Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten
pH-Meter 526	WTW GmbH, Weilheim
Spectrophotometer DU 730	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Pipettierhilfe Pipetus Akku	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Power Pac 200 Power Supply	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Röntgenkassette 24x30cm	Dr. Goos-Suprema, Heidelberg
Scanner CanonScan D1250 V2F	Canon Deutschland, Krefeld
Schüttel- und Mischgerät Polymax 1040	Heidolph Instruments, Schwabach
Schüttelwasserbad Typ 1086	Gesellschaft für Labortechnik, Burgwendel
Stickstofftank Apollo 50	Messer Griesheim, Krefeld
Stickstoffbehälter GT 140	Air Liquide, Düsseldorf
Vortexer VV3	VWR International, Darmstadt
Waagen:	
VIC-Series 0.01g Precision Balances	Acculab UK, Edgewood, NY
ALC-Series 0.0001g Analytical Balances	Acculab UK, Edgewood, NY
Überkopfschüttler REAX 2	Heidolph Instruments, Schwabach
Zellkulturgeräte:	
Heracell 150 Cell Culture Incubator	Heraeus Holding, Hanau
Sicherheitswerkbank Heraeus HS 12	Heraeus Holding, Hanau
Zentrifugen:	
Biofuge pico	Heidolph Instruments, Schwabach
Kühlzentrifuge 1 K 15	SIGMA Laborzentrifugen, Osterode am Harz
Megafuge 1,0	Heraeus Holding, Hanau
Ultrazentrifuge L7-55	Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA
mit Ultrazentrifugenrotor TFT 70.38	Kontron, Zürich, Schweiz
Apparatus ISOLATED PERFUSED HEART modell ICH-SR, Type 844, Version 1.5;	Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Deutschland

3.1.2.5 Medien, Lösungen, Puffer

Tabelle 7: Medien, Lösungen, Puffer

Medien, Lösungen, Puffer	Zusammensetzung
ADS Puffer	Aqua dest. 6,78 g/l NaCl 4,76 g/l HEPES 8 ml/l Na ₂ HPO ₄ 1 g/l Glukose 0,4 g/l KCl 8 ml/l MgSO ₄ x 7 H ₂ O
Enzym-Mix	ADS Puffer 0,6 mg/l Pankreatin 0,5 mg/l Kollagenase
Elektrophoresepuffer	Ampuwa 144 mg/ml Glycin 30,3 mg/ml Tris 10 mg/ml SDS
Ladepuffer	Ampuwa 5 ml 50% Glycerol 1,25 g 10% SDS 2,5 ml 0,625 M Tris 125 µl/ml 1 M DTT pH 7,6
5xTransferpuffer	Ampuwa 5,8 mg/ml Tris Base 290 mg/ml Glycin 10 mg/ml SDS
1xTransferpuffer	100 ml 5xTransferpuffer 300 ml Ampuwa 100 ml Methanol
F 10 Medium	F 10 Medium (Ham+Glutamin) Horse Serum (10% [v/v]) FKS (5%[v/v]) Penicillin/Streptomycin (1% [v/v])
F 10 Medium (Hungermedium)	F 10 Medium (Ham+Glutamin) Penicillin/Streptomycin (1% [v/v])
Lysepuffer	4,8 ml 1 M Tris pH 7,4 2,4 ml 500 mM EDTA 24 ml 100 mM Na ₄ P ₂ O ₇ 120 ml 200 mM NaF 4,8 ml 100 mM Na ₃ VO ₄ 24 ml NP-40 (10%) 160 µl Aprotinin (10 mg/ml) 160 µl Leupeptin (10 mg/ml) 2,4 ml 100 mM PMSF 57,28 ml H ₂ O
PBS (1x)	Aqua dest. 80 g/l NaCl 2 g/l KCl 14,4 g/l Na ₂ HPO ₄ 2,4 g/l KH ₂ PO ₄ pH 7,4
PBS-Tween (1x)	Aqua dest. 80 g/l NaCl 2 g/l KCl 14,4 g/l Na ₂ HPO ₄ 2,4 g/l KH ₂ PO ₄ 10 ml/l Tween 20 pH 7,4
Ponceau-S-Lösung	0,2% in 3% TCA

3.1.2.6 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 8: Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller
Falcon Cell Strainer (70 µm)	Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA
High Performance autoradiography film	GE Healthcare, München
PROTAN Nitrozellulosemembran (0,2 µm)	BD Biosciences, New York, USA
Glasobjektträger	VWR International, Darmstadt
Kyroröhrchen Cyro.S	Greiner-bio.one, Frickenhausen
Mini-Trans-Blot Filterpapier	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Präzisionswischtücher	Kimberly-Clark, Koblenz
Pipettenspitzen (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Greiner-bio.one, Frickenhausen
PP-Test-tubes (15 ml, 50 ml)	Greiner-bio.one, Frickenhausen
Thermanox Plastic Coverslips	Nunc, Rochester, NY, USA
Zellkulturschale (100 mm x 20 mm)	TPP, Trasadingen, Schweiz
Zellkulturschale TC-plate 6-Well	Greiner-bio.one, Frickenhausen
Zellkulturschale P6 Primera	Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA

3.1.2.7 Chemikalien

Tabelle 9: Chemikalien

Produkt	Hersteller
Acrylamid Electrophoresis Purity Reag.	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Ammoniumpersulfat	SERVA Electrophoresis, Heidelberg
Aprotinin	Sigma-Aldrich Chemie, München
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Chemie, München
Chloroform	Sigma-Aldrich Chemie, München
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich Chemie, München
Dimethyl Sulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie, München
di-Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Dithiothritol	Sigma-Aldrich Chemie, München
Dodecylsulfat Natriumsalz (SDS)	VWR International, Darmstadt
Ethylendiamintetracetat (EDTA)	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
Ethanol	Merck, Darmstadt
Essigsäure	Merck, Darmstadt

Kap. 3. Material und Methoden

F 10 Medium	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
Fetales Kälberserum (FKS)	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
Formalin	VWR International, Darmstadt
Gentamycinsulfat	Merck, Darmstadt
Glukose	Sigma-Aldrich Chemie, München
Glycerol	Sigma-Aldrich Chemie, München
Glycin	VWR International, Darmstadt
HEPES	Sigma-Aldrich Chemie, München
Horse Serum	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumphosphat	Sigma-Aldrich Chemie, München
Ketamin (Ketavet)	Pfizer, Karlsruhe
Leupeptin	Sigma-Aldrich Chemie, München
Methanol	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe
Natrium-pyrophosphat	Sigma-Aldrich Chemie, München
Natrium-orthovanadat	Sigma-Aldrich Chemie, München
Neonatal Calf Serum (NCS)	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
Phenylmethansulfonylfluorid	Sigma-Aldrich Chemie, München
Polyoxyethylen-Sorbitan-Monolaurat 10%	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Ponceau-S-Lösung	SERVA Electrophoresis, Heidelberg
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich Chemie, München
Tris-hydroxymethyl-aminomethan	VWR International, Darmstadt
Trypanblaulösung	Sigma-Aldrich Chemie, München
Trypsin-EDTA	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
Tween 20	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Xylazin (Rompun)	Bayer, Leverkusen

3.2 Methoden

3.2.1 InVitro-Methoden

3.2.1.1 Proteinisolation und Proteinbestimmung

Die Proteinisolation erfolgte zum einen aus den kultivierten Kardiomyozyten und zum anderen aus in Tierversuchen gewonnenen Herzen. Die Schalen wurden zweimal mit kaltem PBS gewaschen, die Zellen dann mit einem Scraper und 150 µl Lysepuffer (20 mmol/l HEPES pH=7,4, 2 mmol/l EGTA, 1 mmol/l DTT, 1 mmol/l Na₃VO₄ pH=7,4, 1% Tritan X-100, 10% Glycerol, 0,4mmol/l PMSF, 2 µmol/l Leupeptin, 10 mg/l Aprotinin, 4 mg/l E 64, 2 µmol/l Microcystin, 50 mmol/l β-Glycerolphosphat, Ampuwa) abgelöst. Das Lysat wurde für 15 min. auf Eis inkubiert und im Anschluss 15 min. bei 4°C und 14.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und bei -80°C gelagert. Die Herzen wurden nach Arretierung in der Diastole durch kardioplege Lösung entnommen, von Gefäßresten befreit und in kleine Stücke geschnitten. Danach erfolgte die Homogenisierung im Lysepuffer durch einen Teflonpotter.

Die kalorimetrische Proteinbestimmung nach Lowry (Lowry et al., 1951) erfolgte mit Hilfe des BIO-RAD DC Protein Assay Kit (Bio-Rad Laboratories, Philadelphia, USA, Nr. 500-0120) in Dreifachbestimmung nach den Produktanweisungen. Bei der Methode nach Lowry wird in alkalischer Lösung ein Kupfer-Protein-Komplex gebildet, der ein zweites Reagenz (Folin-Ciocateau-Phenol-Reagens) reduziert. Der so entstandene Farbumschlag nach blau wird bei 595 nm photometrisch gemessen. Zur Erstellung der Standardkurve diente Rinderserumalbumin in einem Konzentrationsbereich von 100-1000 µg/ml.

3.2.1.2 Western Blot

Der Western Blot ist ein elektrophoretischer Transfer von Proteinen auf eine Trägermembran, die dann meist immunologisch nachgewiesen werden. Für die Elektrophorese wurden 1,5 mm dicke Acrylamidgele verwendet (Laufgel: 5 ml 30% Monomer, 2,6 ml Tris/HCl pH=8,8, 100 µl 10% SDS, 3 ml Aqua dest., 100 µl APS, 10 µl TEMED; Sammelgel: 330µl 30% Monomer, 250 µl Tris/HCl pH=6,8, 20 µl 10% SDS, 2,8 ml Aqua dest., 20 µl APS, 5 µl TEMED).

Die Proteine (zwischen 25 und 100 μg je nach nachzuweisendem Protein) wurden zur Vorbereitung mit 2x- bzw. 5x-SDS-Probenpuffer (Marc Wolff Probenpuffer: 2 bzw. 5 ml 10% SDS, 3 ml Ampuwa, 2 ml Glycerol, Bromphenol blue, 2,5 ml Stack. Gel Buffer: 3,03 g Tris in 2 ml 10% SDS pH=6,8, 50 μl Mercapto-EtOH/1ml Puffer) versehen. Danach wurden die Proben für 5 min. auf 95°C erhitzt und anschließend kurz zentrifugiert. Die Lösung der Proteine in dem SDS-Probenpuffer kaschiert deren Eigenladung durch anionische Mizellenbildung und spaltet die Disulfidbrücken durch Reduktion. So ist eine strenge Auftrennung nach ihrer Masse möglich.

Die in SDS-Probenpuffer gelösten Proteine wurden in die Ladeslots des Acrylamidgels pipettiert und in der Elektrophoresekammer, die mit Elektrophoresepuffer (151,1 g Tris, 720 g Glycin, 50 g SDS auf 5 l Aqua dest., vor Gebrauch 1:10 verdünnt) gefüllt war, über 1,5 h mit 20 mA aufgetrennt. Parallel zu den Proben liefen Molekulargewicht-Standards mit (Molekulargewichtsbereich von 6 bis 66 kDa). Im Anschluss wurde das Sammelgel abgetrennt und die Proteine des Laufgels auf eine Nitrozellulosemembran (0,2 μm ; Protan Bio Sciences) geblottet. Abb. 3 zeigt den schematischen Aufbau des Elektrotransfers.

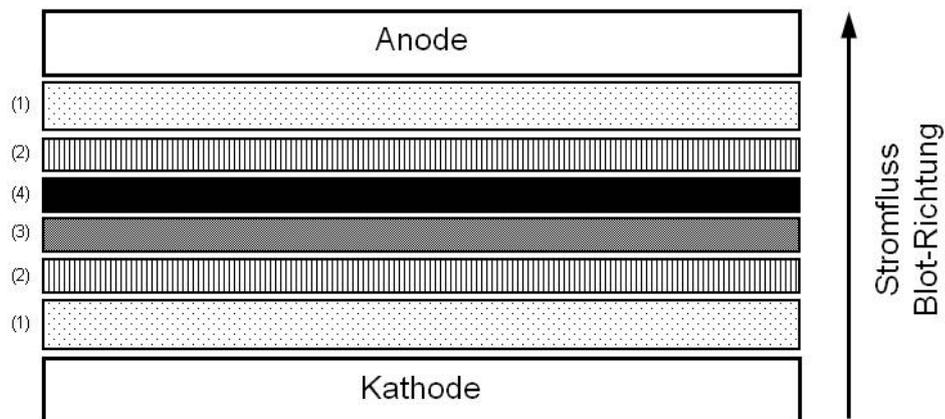


Abb. 3: Western Blot-Aufbau

In der Abbildung ist der Aufbau eines Western Blots dargestellt. Auf die Kathode wird ein in Transferpuffer getränktes Filterkissen (1) gelegt, darauf ein Filterpapier (2). Auf das Filterpapier wird das Polyacrylamidgel mit den aufgetrennten Proteinen gelegt (3) und mit der Nitrozellulosemembran bedeckt (4). Dann folgt wieder ein Filterpapier (2) und ein Filterkissen (1). Der Pfeil kennzeichnet den Stromfluss. Somit werden die Proteine vom Gel auf die Nitrozellulosemembran übertragen.

Nun wurde der Western Blot-Aufbau mit Transferpuffer (25 mmol/l Tris, 192 mmol/l Glyzine, 20% v/v Methanol, pH=8.3) getränkt, in die Gelhalterkassette eingespannt, mit einem Kühlpack in der Blotkammer platziert und für 1 h bei 300 mA geblottet.

Danach wurde die Nitrozellulosemembran mit Ponceau S-Lösung gefärbt, um die Beladung zu dokumentieren (Bild) und die Markerbanden einzuzeichnen. Die Membran wurde dann für mindestens eine Stunde bei RT auf dem Schüttler mit fünfprozentiger Blocking Solution (2,5 g Milchpulver in 45 ml PBS gelöst) inkubiert. Nach dieser Stunde wurde die Membran dreimal für je 10 min. mit PBS/Tween gewaschen.

Der erste Antikörper (vgl.

Tabelle 10) wurde in fünfprozentiger Blocking Solution mit einer Verdünnung von 1:500 angesetzt und die Membran damit mindestens 12 h bei 4°C auf dem Schüttler inkubiert. Danach wurde die Membran wieder dreimal für je 10 min. mit PBS/Tween gewaschen.

Der zweite Antikörper wurde in einprozentiger Blocking Solution mit einer Verdünnung von 1:5000 angesetzt und die Membran damit 1 h bei RT auf dem Schüttler inkubiert. Danach wurde die Membran wieder dreimal für je 10 min. mit PBS/Tween gewaschen.

Tabelle 10: Western Blot-Antikörper

1. Antikörper: Antigen	Größe des nachzuweisenden Proteins (kDa)	hergestellt in	2. Antikörper
Cleaved Caspase 3	17-19 kDa	rabbit	goat-anti-rabbit
Caspase 3	32 kDa	rabbit	goat-anti-rabbit
GATA4	45 kDa	rabbit	anti-rabbit IgG
p-Akt (Ser473)	60 kDa	rabbit	goat-anti-rabbit
p-Akt (Thr308)	60 kDa	rabbit	goat-anti-rabbit

Die Membran wurde für ca. 90 Sekunden mit ECI inkubiert; damit wurde in der Dunkelkammer ein Film belichtet (1, 5, 15, 30, 60 min., je nach Bildqualität und Signalstärke). Die Auswertung erfolgte nach Einscannen mit dem Programm LabWorks Analysis Software (LabWorks Analysis Software, UVP, Upland, USA).

3.2.1.3 RNA-Isolation

Die RNA-Isolation erfolgte aus den kultivierten Kardiomyozyten analog zum Protokoll von Chomczynski (Chomczynski et al., 1987) mit peqGOLD RNA Pure nach den Herstellerangaben. Anschließend wurde der RNA-Gehalt mittels UV-Absorption bestimmt. Der Quotient der optischen Dichte (OD) bei 260 nm und 280 nm lag bei allen Proben zwischen 1,8 und 2,0. Die Proben wurden bei -80°C gelagert.

3.2.1.4 Reverse Transkription (RT)

Die reverse Transkription zur Herstellung der cDNA wurde mit 2 µg RNA in einem 20 µl Ansatz mit dem Omniscript RT Kit, Qiagen, durchgeführt. Der Ansatz enthielt pro Probe 10 mmol/l Tris-HCl (pH 8,4), 50 mmol/l KCl, 5 mmol/l Mg₂Cl, 1 mmol/l Oligo-dT primer, je 0,5 mmol/l dATP, dTTP, dCTP und dGTP, 10 U/µl RNase-Inhibitor und 3,3 U/µl reverse Transkriptase. Die Inkubationszeit betrug eine Stunde bei 37°C. Anschließend wurde die Reaktion durch Erhitzen auf 65°C für 5 min. gestoppt. Die erhaltene cDNA wurde bei -80°C gelagert.

3.2.1.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine Methode zum Nachweis gering exprimierter mRNA- und DNA-Spezies. Hierzu verwendet man spezifische Oligonukleotide, die als Primer im Überschuss in eine Polymerase-DNA-Synthesereaktion eingesetzt werden. Das relevante RNA-/DNA-Fragment dient als Matrize für die Primer.

Durch zyklisches Erhitzen und Abkühlen der Reaktion wiederholt sich dieser Vorgang und produziert exponentiell neue DNA-Fragmente. Die Quantität der aus der PCR resultierenden cDNA ist von verschiedenen Faktoren abhängig. Dazu zählen die eingesetzte Menge an RNA, die Zyklenzahl, die jeweiligen Bedingungen in jedem Reaktionsgefäß und die festgelegten Temperaturen. Die Expression der RNA stellt ebenfalls einen relevanten Faktor für die Ergebnisqualität dar. Daher müssen sämtliche Bedingungen konstant gehalten werden, um verschiedene Proben vergleichen und Rückschlüsse auf die Expression ziehen zu können. Dies wird zusätzlich durch einen externen Standard kontrolliert. Der externe Standard ist ein Gen, welches unter Standardbedingungen in den jeweiligen Zellen nicht reguliert

wird. Das Gen der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) ist in neonatalen und reifen Kardiomyozyten hierfür prädestiniert.

Ein Aliquot der Reversen Transkriptase-Reaktion (1µl) wurde in die PCR eingesetzt. Weiterhin bestand der Reaktionsansatz aus 1,5 U Taq DNA Polymerase, 10 mM Tris, 50 mM KCl pH 8.8, DMSO (5% Endkonzentration), je 200 µM dATP, dCTP, dGTP und dTTP und 0.4 µM der verwendeten Oligonukleotid-Primer (vgl. Tabelle 11). Der Ansatz wurde mit RNAase-freiem Wasser auf ein Endvolumen von 50 µl aufgefüllt. Da die Reaktion in einem Thermozykler mit Heizdeckel (Px2 Thermal Cycler, Thermo Electron Corporation) durchgeführt wurde, konnte auf eine Ölschicht verzichtet werden. Die Initialisierung erfolgte bei 95° C für 5 min. und die Endphase bei 72° C für 10 min. Denaturierung, Annealing und Elongation wurden für den jeweiligen Oligonukleotid-Primer mit der in Tabelle 11 angegebenen Zyklenzahl, Temperatur und Zeitdauer durchgeführt. Für die Primer der mRNA von GATA4, GATA6 und Mef2c dauerten Denaturierungs-, Annealing- und Anheftungsperiode jeweils 40 Sekunden. Die PCR-Zyklenzahl wurde so gewählt, dass sich die Reaktion im exponentiellen Bereich befand. Um eine mögliche Kontamination der RNA mit genomischer DNA festzustellen, wurden jeweils RNA-Proben ohne Reverse Transkription als Negativkontrolle in der PCR mitgeführt (Saiki et al., 1985).

Tabelle 11: PCR-Primer

Primer-Sequenz	Denaturierungs- -phase	Anheftungs- -phase	Primer- extension	Zyklenzahl
GAPDH 5'-CGG TGC TGT ATT TCC TTA CGA GGC GAA GAA GG-3' 5'-GGT GCT ACT TGT TAG GAG GTC AAG TAA AGG GC-3'	94°C 30 sec.	60°C 60 sec.	72°C 60 sec.	24
GATA4* 5'-ATT TGG CTT TGT GGC CTT CTT-3' 5'-CCC ATA GCA TCC GCA ACA TA-3'	95°C 40 sec.	54°C 40 sec.	72°C 40 sec.	26
GATA6* 5'-GTA AGA TGA ACG GCC TCA GC-3' 5'-GTC GCA CCG AGG ATG TAA CT-3'	95°C 40 sec.	56°C 40 sec.	72°C 40 sec.	25
Mef2c* 5'-CAG CCC TAA TGC TTT GTC GT-3' 5'-GAG GCA AGC TTG GAG TTG TC-3'	95°C 40 sec.	54°C 40 sec.	72°C 40 sec.	25
Nkx 2.5 5'-CGA CGG AAG CCA CGC GTG CT-3' 5'-CCG CTG TCG CTT GCA CTT G-3'	94°C 45 sec.	58°C 45 sec.	72°C 60 sec.	26

*0,5 µl DMSO

3.2.1.6 Gelelektrophorese der DNA

Jeweils 16 µl der PCR-Produkte wurden mit 4 µl DNA-Gel-Ladepuffer versetzt und in einem 1 % Ethidiumbromid-haltigen (0.5 µg/ml) Agarosegel aufgetrennt. Das Agarosegel wurde mit einem Tris-Acetat-Elektrophoresepuffer (TAE) (0.04 M Tris-Acetat, 0.001 M EDTA (pH 8.0)) angesetzt, welcher sich ebenfalls in der Gelelektrophoresekammer befand. Die Auftrennung erfolgte bei einer konstanten Spannung von 70 V. Pro Slot wurden 20 µl PCR-Produkt-Ladepuffer-Gemisch eingesetzt. Der DNA Ladder (100-850 bp, Invitrogen) wurde entsprechend der Herstellerangaben verwendet und in einem Volumen von 7 µl pro Slot aufgetragen.

3.2.1.7 Densitometrie und Fotografie

Die Photographien der Agarosegele wurden mit Hilfe des UVP ImageStore 7500-Systems (Sony) erstellt. Die Ethidiumbromid-gefärbten Agarosegele wurden über UV-Durchlicht mit der Videokamera des Systems fotografiert und die Fotos als TIFF-Dateien auf Diskette gespeichert. Die Fotos wurden mit dem Programm UVP Labworks Analysis Software ausgewertet.

Bei den gezeigten Fotos erfolgte eine Bildbearbeitung mit dem Programm Corel Photo-Paint 12, die sich auf die Auswahl und Ausrichtung des Bildausschnitts beschränkte. Andere Manipulationen wurden an den Bildern nicht vorgenommen.

3.2.1.8 Real-Time Quantitative Polymerase-Kettenreaktion

Die Idee der quantitativen Real-Time PCR ist es, die Kopienzunahme pro Zyklus quantitativ zu bestimmen. Wir nutzten die Detektion mit Farbstoffen an DNA-Sonden (5'-Nuclease-Assay, Taq PCR Master Mix Kit, Qiagen GmbH, Germany). Bei diesem Ansatz wird die 5'-Nuclease-Aktivität der Taq-Polymerase genutzt. Es werden sowohl spezifische Primer als auch Sonden benötigt. Am 5'-Ende der Sonde wird ein fluoreszierender Farbstoff (Donor-Fluorochrom) mit Quencher (Akzeptor-Fluorochrom) angehängt. Der Quencher verhindert über Energie-Transfer-Prozesse, die die fotoangeregten Zustände anderer Moleküle abfangen, das Fluoreszieren der Sonde, solange sie sich in einer definierten Nähe zum Quencher befindet. Das 3'-Ende dieser Sonde muss blockiert sein, um nicht selbst als Primer fungieren zu können. Während der PCR-Amplifikation wird die Sonde durch die Taq-Polymerase abgebaut, der Farbstoff wird freigesetzt und kann fluoreszieren. Dies wird dann

quantitativ gemessen. Unspezifische Amplifikationen werden so herausgefiltert; das resultierende Signal ist der Kopienzahl quantitativ zuzuordnen. Es wurde das Protokoll der Firma Qiagen zur Taq PCR/QuantiTech Probe Kit verwendet (Bustin, 2000, Freeman et al., 1999, Lee et al., 1993, Livak et al., 1995).

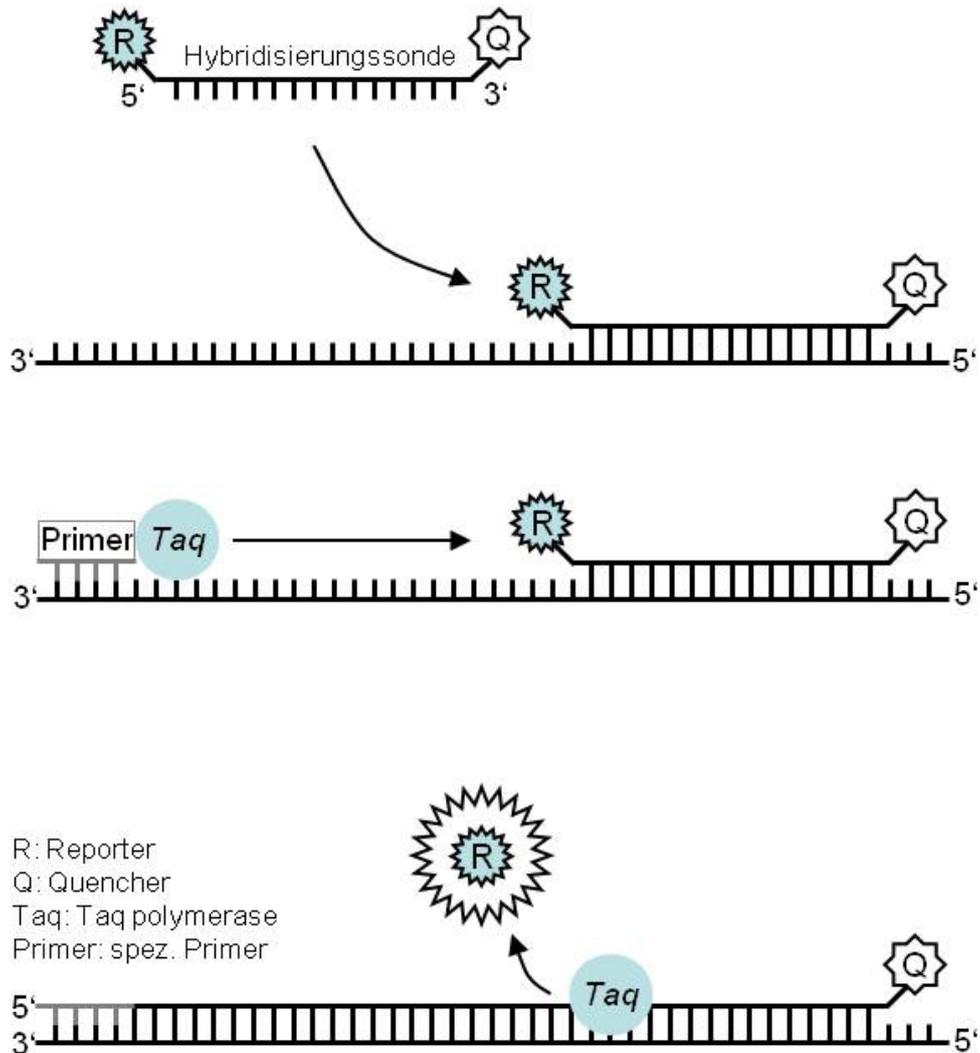


Abb. 4: Real-Time PCR (TaqMan-Sonde)

Im PCR-Zyklus hybridisiert die Sonde, die einen Quencher am 3'- und einen Reporter am 5'-Ende trägt, mit dem kompletten DNA-Strang. Die Reporterfluoreszenz wird durch die räumliche Nähe zum Quencher unterdrückt. Die Taq-Polymerase baut aufgrund ihrer 5'-3'-Exonucleaseaktivität das 5'-Ende der Sonde während der Zyklen ab. Nun kann die Fluoreszenz während der einzelnen Zyklen gemessen werden und so eine Aussage zur amplifizierten DNA gemacht werden. Q=Quencher (Akzeptor-Fluorochrom), R=Reporter (Donor-Fluorochrom), Taq=Taq Polymerase

3.2.1.9. Cell Death Detection ELISA plus

Diese Nachweismethode der Apoptose basiert auf dem Enzyme-linked Immunosorbent Assay. Dabei werden die nachzuweisenden Strukturen an spezifische Antikörper gebunden, die an einem Reaktionsgefäß sitzen. Dann werden diese Strukturen mit einem zweiten Antikörper markiert, der enzymatische Eigenschaften hat und mittels eines Substrates eine z.B. photometrisch nachweisbare Reaktion bewirkt.

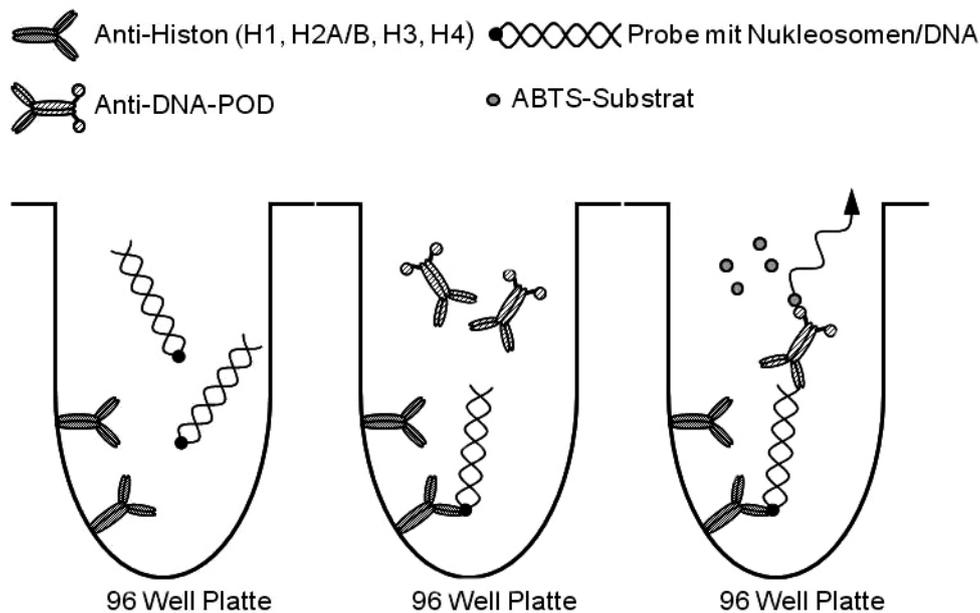


Abb. 5: Schema des ELISA (Cell Death Detection ELISA)

In einem Reaktionsgefäß befinden sich, an dessen Wand gebunden, spezifische coating-Antikörper für die gesuchte Struktur (in diesem Fall: Anti-Histon). Das Reaktionsgefäß wird mit der Untersuchungsprobe inkubiert und nach einiger Zeit gespült. So werden die ungebundenen Anteile entfernt und es verbleibt lediglich das gebundene Antigen. Dann wird ein detection-Antikörper hinzugegeben (Anti-DNA-POD) und eine Peroxidase, die eine Fluoreszenzreaktion katalysiert. Die nicht gebundenen Antikörper werden ausgewaschen und das passende Substrat zur Fluoreszenzreaktion hinzugegeben. Die Fluoreszenz wird mittels Spektroskopie registriert.

Es wurde das Standardprotokoll von *Roche Applied Science, Cell Death Detection ELISA^{PLUS}* verwendet, wie von Wyllie (Wyllie et al., 1980) und Darzynkiewicz (Darzynkiewicz et al., 1992) vorbeschrieben.

3.2.1.10 *In Situ* Cell Death Detection Kit, TMR red

Der *In Situ* Cell Death Detection Kit basiert auf der TdT-mediated dUTP Nick-End Labeling (TUNEL)-Färbung. Sie ist eine Standardmethode zur Darstellung von fragmentierter DNA, wie sie in apoptotischen Zellen vorkommt. Das Enzym TdT (terminal deoxynucleotidyl transferase), eine Polymerase, hängt an das 3'-OH-Ende von DNA-Strängen mit TMR red konjugiertes UTP (Uridin). Dieses TMR red konjugierte UTP kann mittels Fluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht und quantifiziert werden.

Es wurde das Standardprotokoll aus dem *In Situ* Cell Death Detection Kit, TMR red der Firma Roche diagnostics GmbH, Mannheim verwendet. Die Versuche wurden mit auf Chamber Slides fixierten Kardiomyozyten durchgeführt. Die Chambers wurden mit eiskaltem PBS gewaschen, die Zellen anschließend mit 4% Formalin (in PBS) für 30 min. bei 4°C fixiert und mit PBS gewaschen. Die Kardiomyozyten wurden für 2 min. bei 4°C mit Permeabilisationslösung (0,1% Triton, 0,1% Na-Citrat in PBS) behandelt und anschließend zweimal mit PBS gewaschen. Dann wurden die Zellen in abgedunkelter Umgebung mit TUNEL reaction mixture (45 µl Label Solution und 5 µl Enzym Solution aus dem *In Situ* Cell Death Detection Kit pro Chamber) für 1 h bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Die Zellen wurden zweimal mit Blocking Puffer (0,1% Triton und 0,5% BSA in PBS) und einmalig mit PBS für jeweils 10 min. gewaschen. Der Chamber-Aufsatz wurde vom Objektträger entfernt und dieser trocknen gelassen. Die Kardiomyozyten wurden mit DAPI Mounting Medium (1:1) eingedeckt, das Deckglas mit Klarlack versiegelt und bei 4°C im Dunkeln gelagert.

Die Auswertung erfolgte unter dem Fluoreszenzmikroskop, wobei die Zellen blau (DAPI Mounting Medium) und die fragmentierte DNA rot fluoreszierten. Digital wurde im Auswertungsprogramm die rot fluoreszierende fragmentierte DNA mit gelber Farbe gekennzeichnet. Die computergestützte Auswertung erfolgte mit dem Programm Lucia G, Laboratory Imaging, Prag.

3.2.1.11 Morphologische und histologische Untersuchung der Mäuseherzen

Nach den InVivo-Versuchen bzw. nach Ablauf des Beobachtungszeitraumes wurden die Tiere durch eine Überdosis der Narkosemedikation getötet. Die Herzen wurden entnommen, die Vorhöfe entfernt, das Herzgewicht gemessen und zum Körpergewicht und der Tibialänge ins Verhältnis gesetzt. Anschließend wurden

Lunge, Leber, Milz und Nieren entnommen und deren Feucht- und Trockengewichte bestimmt, um eventuelle Stauungen diagnostizieren zu können. Die Herzen wurden in eiskaltem PBS gewaschen und jeweils anteilig für biochemische und molekularbiologische Charakterisierungen bei -80°C eingefroren oder nach Arretierung in der Diastole durch kardioplege Lösung in 4% Paraformaldehyd fixiert (vgl. 3.2.1).

3.2.1.12 Hämatoxilin-Eosin-Färbung

Prinzip: Bei dieser Färbung wurden die Zellkerne mit einem basischen Farbstoff (Aluminium- oder Eisen-Hämatoxilin) blau gefärbt, die Rotfärbung des Zytoplasmas erfolgte mit einem sauren Farbstoff (Eosin). Dadurch ließen sich die Kardiomyozytengröße und eine etwaige Hypertrophie beurteilen.

Lösungen: 70%-iges Ethanol, 90%-iges Ethanol, abs. Alkohol, Aceton, Xylol, Meyers Hämalaunlösung 21, 1%-ige Eosinlösung, angesäuerte Ethanol-Eosinlösung: 178 ml abs. Alkohol, 2 ml Eisessig, 20 ml 1%-ige Eosinlösung

Färbung: Für die Kernfärbung wurden die Schnitte 5 min. in Meyers Hämalaunlösung (filtriert) gelegt und anschließend unter fließendem Leitungswasser gebläut. Nach Entwässern mit 70%-igem und 90%-igem Ethanol erfolgte für 5 min. die Plasmafärbung in der ebenfalls filtrierten angesäuerten Ethanol/Eosinlösung. Zum endgültigen Entwässern wurden die Schnitte mit abs. Ethanol, Aceton und Xylol behandelt. Zum Schluss erfolgte das luftfreie Eindecken mit einem Tropfen Corbitbalsam unter einem Deckglas.

3.2.1.13 Trichom-Färbung nach Masson Goldner

Prinzip: Bei dieser Färbung stellen sich die Kerne braunschwarz, Zytoplasma schwachorange bis rot, Erythrozyten leuchtend rot, Bindegewebe und Schleim grün, Muskelgewebe blassrot dar. Diese Färbung wurde zur Beurteilung des Fibrosegrades der Herzen herangezogen.

Lösungen: Masson-Lösung: 0.2 g Ponceau de Xylidine, 0.1 g Säurefuchsin in 300 ml Aqua dest. kurz kochen, dann 0.6 ml Eisessig zugeben und filtrieren. Azophloxin-Lösg.: 0.5 g Azophloxin werden in 100 ml Aqua dest., das mit 0.2 ml Eisessig versetzt wurde, gelöst. Ponceau-Säurefuchsin-Azophloxin: 88 ml 0.2%ige Essigsäure

mit 7 ml Masson-Lösung und 2 ml Azophloxinlösung versetzen. Molybdatophosphorsäure-Orange: 3-5 g Molybdatophosphorsäure und 2 g Orange G in 100 ml Aqua dest. lösen. Wolframatophosphorsäure-Orange: 3-5 g Wolframatophosphorsäure und 2 g Orange G in 100 ml Aqua dest. lösen. Lichtgrün: 0.1-0.2 g Lichtgrün SF in 100 ml Aqua dest., das mit 0.2 ml Eisessig versetzt wurde, lösen. Statt Lichtgrün kann auch Anilinblau verwendet werden.

Färbung: zuerst wurden die Schnitte in Weigert's Eisenhämatoxylin für 1-2 min. gefärbt und im Anschluss bei fließendem Wasser 10-15 min. gewaschen. Im nächsten Schritt wurde für 5-7 min. mit Ponceau-Säurefuchsin-Azophloxin gefärbt und mit einprozentiger Essigsäure abgespült. Die Differenzierung erfolgte in Molybdatophosphorsäure-Orange oder Wolframatophosphorsäure-Orange bis zur vollständigen Entfärbung des Bindegewebes. Anschließend wurde mit einprozentiger Essigsäure gespült. Die Gegenfärbung erfolgte mit Lichtgrün bzw. Anilinblau für 5 min. und raschem Entwässern in Alkohol. Der Einschluss wurde mit Xylol und Einschlussharz realisiert.

3.2.1.14 NADPH Oxidase Aktivitäts Assay

Die Bestimmung der NADPH-Oxidase-Aktivität wurde durch einen Lucigenin-verstärkten Chemilumineszenz-Assay untersucht (Maack et al., 2003). Die aus den Tierversuchen gewonnenen Herzen wurden in eiskaltem Puffer B (50 mM Phosphat, 1 mM EGTA, cOmplete Protease Inhibitoren, Roche) in einer Glasküvette mit einem Teflonpotter lysiert. Im Anschluss erfolgte die Zentrifugation mit 14.000 rpm bei 4°C über 15 min. Das Pellet wurde verworfen und die Proteinkonzentration im Überstand nach Lowry bestimmt. Die Proteinmenge wurde auf 1 mg/ml normiert. Hundertmilliliter-Aliquots wurden mit 150 mM Saccharose und 0,005 mM Lucigenin sowie 0,1 mM NADPD als Substrat inkubiert und der Umsatz im Szintillationszähler (Lumat LB 9501, Berthold, Germany) wurde minütlich über 10 min. in Vierfachbestimmung gemessen.

3.2.1.15 Messung freier Sauerstoffradikale in Gefäßmuskelzellen

Die Superoxidfreisetzung aus der Aorta wurde in einer Chemilumineszenzreaktion mit L-012 (8-amino-5-chloro-7-phenylpyridol[3,4-d]pyridazine-1,4(2H,3H)dione; Wako Pure Chemicals, USA) untersucht (Wassmann et al., 2004). L-012 ist ein Luminol-

Derivat mit deutlich gesteigerter Sensitivität und fehlender Redox-Aktivität. Die Aorta wurde vorsichtig aus dem Thorax entnommen und in eine modifizierte Krebs-HEPES-Lösung (pH 7.4; 99,01 mM NaCl, 4,69 mM KCl, 1,87 mM CaCl₂, 1,2 mM MgSO₄, 20 mM Na HEPES, 1,03 mM K₂HPO₄, 25 mM NaHCO₃, 11,1 mM D(+)-glucose) überführt. Gewebereste wurden entfernt und die Aorta in 2 mm lange Stücke geschnitten. Die Freisetzung der ROS aus den Aortensegmenten wurde in Szintillationsgefäßen mit Krebs-HEPES-Lösung und 100 µM L-012 über eine Minute im Szintillationszähler (Lumat LB 9501, Berthold, Germany) gemessen. Im Anschluss wurden die Aortensegmente getrocknet und gewogen.

Die Superoxidfreisetzung wurde als relatives Signal der Chemilumineszenz pro Milligramm Aortengewebe bestimmt.

3.2.2 InVivo-Methoden

3.2.2.1 Narkose der Mäuse

Sowohl zur Narkose als auch zur Tötung der Mäuse wurde eine Kombination aus Ketamin (100 mg/ml, Parke-Davis, Freiburg, Deutschland) und Rompun 2% (20 mg Xylazin-HCl/ml, Bayer, Leverkusen, Deutschland) verwendet. Die Applikation erfolgte intraperitoneal. Zur Tötung wurde eine Konzentration von 400 mg/kg KG Ketamin und 50 mg/kg KG Rompun appliziert. Die Konzentrationen zur echokardiographischen Untersuchung betragen 15 mg/kg KG Ketamin und 2 mg/kg KG Xylazin (Erhaltung der Spontanatmung und Vermeidung einer Bradykardie).

3.2.2.2 Echokardiographie der Mäuse

Die Tiere wurden mit einer niedrigen Dosierung von Ketamin und Xylasin sediert. Es wurden die posteriore und septale Wanddicke mit einem speziellen 13 MHz-Schallkopf sowie die linksventrikulären enddiastolischen und endsystolischen Durchmesser bestimmt und daraus die Verkürzungsfraction (FS in %) berechnet (Haq et al., 2003). Sie ist ein Maß für die myokardiale Funktion und wird echokardiographisch über die prozentuale Änderung des Ventrikeldurchmessers an der Basis während der Diastole und Systole bestimmt. So lässt sich vor allem bei der Maus die Ventrikelfunktion besser charakterisieren als durch die Ejektionsfraction (EF). Bei der Berechnung wird vorausgesetzt, dass es keine regionalen Unterschiede im

Kontraktionsmuster der Wandabschnitte des linken Ventrikels gibt. Die Berechnung der FS erfolgt mit folgender Formel:

$$\mathbf{FS} = \frac{LVEDD - LVESD}{LVESD} \times 100\%$$

3.2.2.3 Working Heart

Das Modell des Working Heart gehört zu den aussagekräftigsten Methoden zur Beurteilung der systolischen und diastolischen Funktion von Herzen in Tierversuchen. Die Präparation erfolgte nach dem von Neely bereits 1974 beschriebenen Modell (Neely et al., 1974). Die Mäuse wurden durch Überdosis aus Ketamin und Rompun getötet und die Herzen sogleich über einen parasternalen Schnitt entnommen. Die Herzen verblieben in eiskaltem Krebs-Henseleit-Bikarbonat-Puffer (KHB) und das umgebende Gewebe (Perikard, Lunge, Trachea) wurde entfernt. Die Aorta wurde mittels einer 18G-Kunststoffkanüle (1,5 cm Länge, 0,95 mm ID, 1,3 mm AD) intubiert und das Herz durch retrograde Langendorf-Perfusion (60 mmHg Perfusionsdruck) mit ca. 28°C warmem KHB perfundiert. Als nächstes wurde die Koronarversorgung sichergestellt. Dazu wurde der linke Vorhof über die Lungenvenen mit einer 16G-Stahl-Kanüle (3 cm Länge, 1,14 mm ID, 1,52 mm AD) kanüliert und über ein vorgespültes (38°C) Schlauchsystem mit der Vorlastanlage (Abb. 7 (26)) verbunden. Um das Herz in den Working Heart-Modus umzuschalten, wurde das Herz lediglich aus der Vorlastanlage mit modifiziertem KHB (mKHB) perfundiert. Die Kontraktion des linken Ventrikels beförderte den Puffer durch die Aorta in die Nachlastanlage. Die Windkesselfunktion der Aorta wurde simuliert (Abb. 7 (26)). Initial wurde die Vorlast auf 10 mmHg und die Nachlast auf 50 mmHg festgelegt. Zur Messung des Druckes im Ventrikel wurde ein 4F Millar Mikro Tip Katheter (Millar Instruments Houston, Texas, USA) verwendet, der in den linken Ventrikel eingebracht wurde (Larsen et al., 1999).

Das Herz-Zeit-Volumen kann durch Addition von Aortenfluss und Koronarfluss in Abhängigkeit von der Vorlast bestimmt werden. Die zusätzliche Implantation eines Druckkatheters über den Apex des linken Ventrikels ermöglicht die Aufzeichnung von Druckänderungen in jedem Herzzyklus (LVESP, LVEDP, $\pm dp/dt$) sowie die Bestimmung der Relaxationsgeschwindigkeit als Maß für die diastolische Funktion (Grupp et al., 1993). Darüber hinaus kann über die Differenz der Sauerstoffsättigung des Perfusates vor und nach Passage des Herzens der myokardiale

Sauerstoffverbrauch berechnet werden. Durch Zugabe von Isoprenalin zum Perfusat wird zudem das inotrope Ansprechen in den Behandlungsgruppen bestimmt. Darüber hinaus wird über Minielektroden ein kontinuierliches EKG abgeleitet und bei Bedarf ein stabiler Schrittmacherrhythmus etabliert.

Von besonderer Bedeutung sind drei Parameter: das endsystolische Druck-Volumen-Verhältnis (ESPVR), das enddiastolische Druck-Volumen-Verhältnis (EDPVR) und die linksventrikuläre Ejektionsfraktion. Das ESPVR beschreibt den maximalen Druck, den der Ventrikel bei einem linksventrikulärem Füllungsvolumen aufbauen kann. Dies ist ein zuverlässiges Maß für die Inotropie (Kontraktilität) des Ventrikels:

$$ESPVR: P(V) = E_{es} \times V + P_0$$

Das EDPVR beschreibt die passive Füllung des linken Ventrikels in der Diastole. Dessen Kehrwert ist ein Maß für die linksventrikuläre Compliance:

$$EDPVR: P(V) = K \times e^{-\beta \times V}$$

Die linksventrikuläre Ejektionsfraktion (LVEF [%]) errechnet sich aus dem Schlagvolumen (SV [ml]), dividiert durch das enddiastolische Volumen des linken Ventrikels (EDV [ml]). Sie ist ebenfalls ein Maß für die Kontraktionskraft des linken Ventrikels:

$$EF (\%) = \frac{SV}{EDV} = \frac{EDV - ESV}{EDV}$$

Wir benutzen die Anlage ISOLATED PERFUSED HEART model IH-SR, Type 844 der Firma Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Deutschland. Es wurde die dazugehörige Software HSE-HA ISOHEART, ebenfalls von Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Deutschland, verwendet.

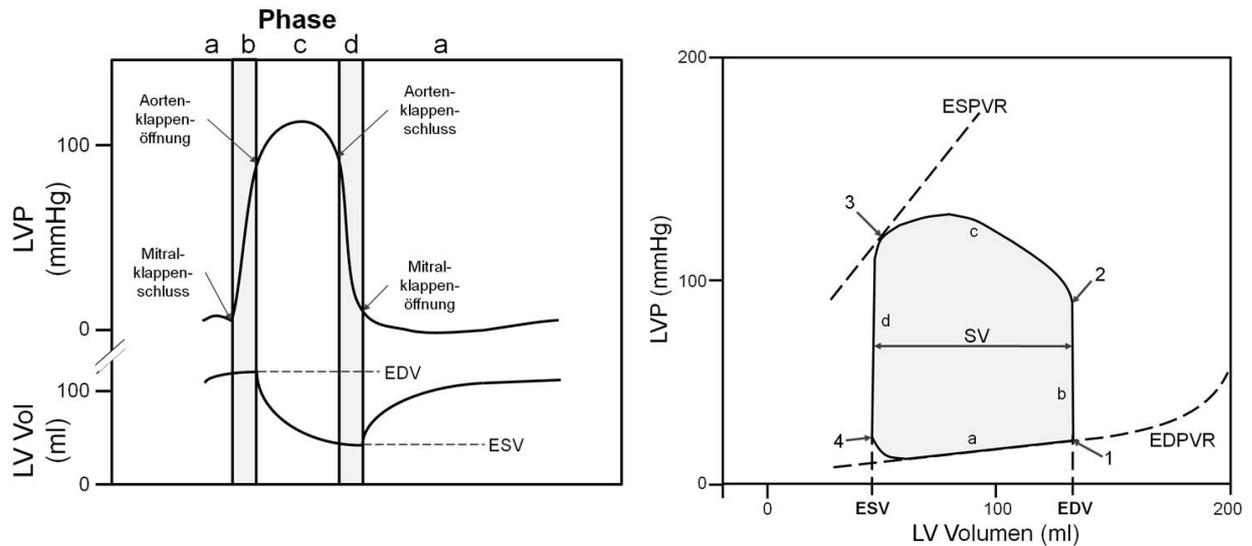


Abb. 6: Druck-Volumen-Beziehungen des Herzens nach Frank Starling

Die Druck-Volumen-Beziehung kann in vier verschiedene Phasen unterteilt werden: die ventrikuläre Füllung (a, Diastole) und die Systole, bestehend aus der isovolumetrischen Kontraktion (b), dem Auswurf (c) und der isovolumetrischen Erschlaffung (d). Punkt 1 im LV Loop ist die Druck-Volumen-Beziehung am Ende der ventrikulären Füllung (EDV). Im Anschluss folgt die isovolumetrische Kontraktion mit Anstieg des linksventrikulären Druckes (LVP), bis dieser am Punkt 2 den diastolischen Aortendruck übersteigt und die Öffnung der Aortenklappe beschreibt. Nun wird das linksventrikuläre Volumen ausgetrieben und der LVP steigt auf ein Maximum an. Am Punkt 3 unterschreitet der LVP den Aortendruck und die Aortenklappe schließt sich. Der LVP fällt weiter, bis er am Punkt 4 den Druck des linken Vorhofes unterschreitet, die Mitralklappe geöffnet wird und die Füllung des Ventrikels beginnt. Die Breite des Loops wird durch den Unterschied zwischen EDV und ESV, dem Schlagvolumen (SV), definiert. Die Fläche unter dem Loop entspricht der linksventrikulären Herzarbeit pro Herzschlag.

Messbare Parameter im Working Heart

Tabelle 12: Bezeichnungen, Formelzeichen und Einheiten der gemessenen Werte in der Versuchsanordnung WORKING HEART

Bezeichnung	Zeichen	Einheit
Linksventrikulärer systolischer Druck	LVSP	mmHg
Maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit des linken Ventrikels (Maß für die Kontraktilität)	$dLVPdt_{max}$	mmHg/s
Maximale Druckabfallgeschwindigkeit des linken Ventrikels	$dLVP/dt_{min}$	mmHg/s
Linksventrikulärer enddiastolischer Druck	LVEDP	mmHg
Mittlere Vorlast (preload pressure, mean)	PLP_{mean}	mmHg
Mittlere Nachlast (afterload pressure, mean)	ALP_{mean}	mmHg
Aortenfluss	AF	ml/min
Koronarfluss	CF	ml/min
Sauerstoffpartialdruck (afferent/efferent)	$pO_{2\ a/e}$	mmHg
Herzfrequenz	HF	/min
Auswurfzeit	ET	ms
Elektrokardiogramm	EKG	mV/min
pH	pH	/
Wanddicke bzw. Durchmesser des linken Ventrikels	WT	mm

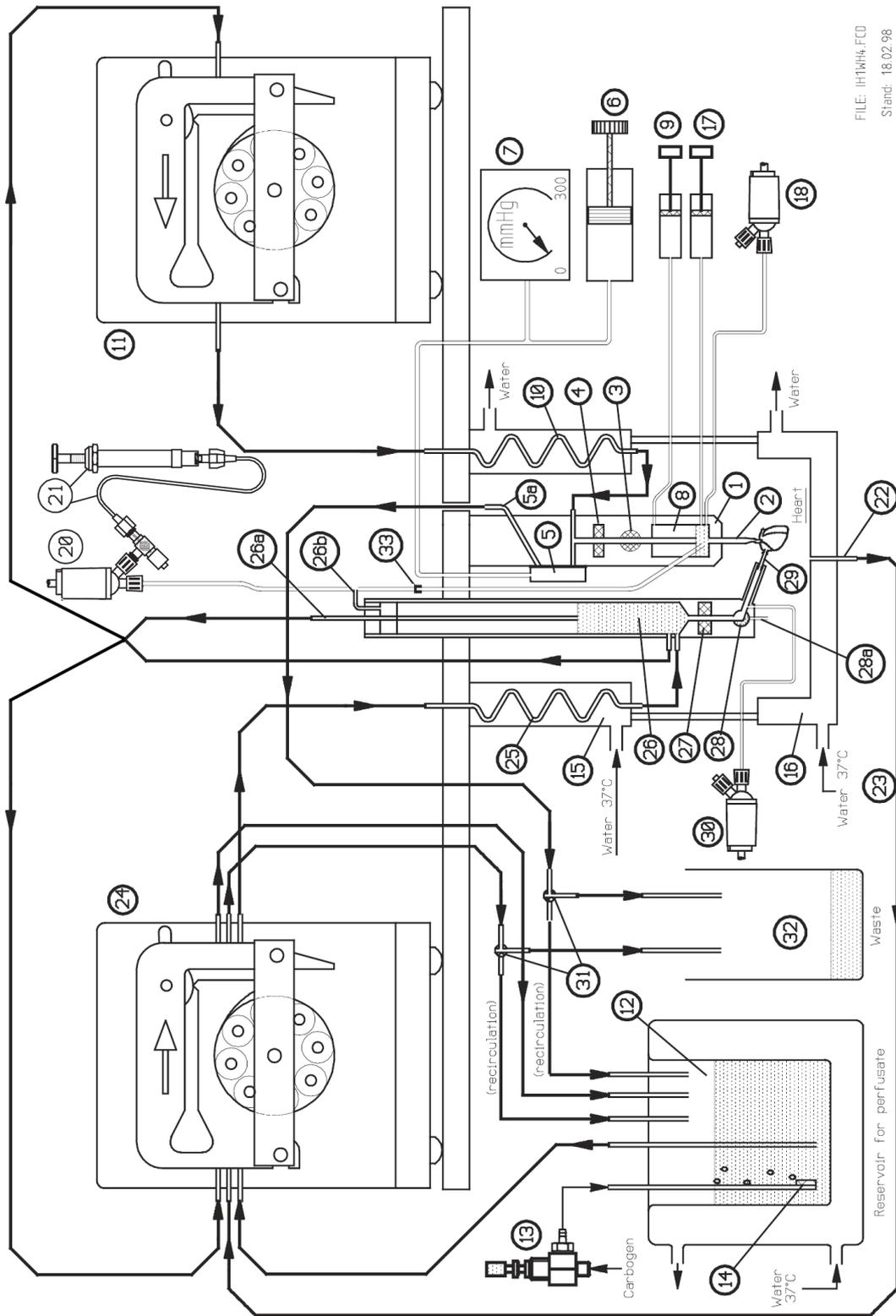
Berechnete Parameter im Working Heart

Tabelle 13: Bezeichnungen, Formelzeichen und Einheiten der berechneten Parameter aus der Versuchsanordnung WORKING HEART.

Bezeichnung	Berechnung	Zeichen	Einheit
Herzminutenvolumen	= AF + CF	HMV	ml/min
Schlagvolumen	= $10^3 \times (AF + CF) / HF$	SV	μ l/min
Herzarbeit	= $133,3 \times (ALP_{mean} - PLP_{mean}) \times SV + 0,5 \times 1,004 \times SV \times (SV / \pi \times r^2 \times ET)^2$	HW	mJ
Herzleistung	= HW x HF	HP	mW
Myokardialer Sauerstoffverbrauch	= $(0,0227 \times (pO_{2\ art} - pO_{2\ ven}) / 760 / 0,0224) \times CF$	MVO_2	μ mol/s
Effizienz	= $HP \times 100 / (MVO_2 \times 0,441)$	E	%

Abb. 7: Working Heart, modifiziert nach Hugo Sachs (Operating Manual for the Apparatus ISOLATED PERFUSED HEART modell ICH-SR, Type 844, Version 1.5; Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Deutschland)

Working Heart-Anlage nach Hugo Sachs: 1=Aortenblock, 2=Aortenkanüle, 3=Absperrhahn, 4=Flussmesser, 5=Strömungswiderstandsmessung (Nachlast), 6=Einstellung des Strömungswiderstandes, 7=Manometer, um den Strömungswiderstand zu regeln, 8=Druckmesser zur Überwachung des Strömungswiderstandes, 9=Spritze zum Anpassen des Luftvolumens in der Blasenfalle, 10=Wärmetauscher, 11=Rollenpumpe (ca. 25 ml/min), 12=Perfusatvorrat stabil temperiert, 13=Druckreduzierer zur Anpassung des Carbogen-Flows, 14=Glasfritte zur Belüftung des Perfusats, 15=Oberer Teil der „Herzkammer“, thermostabil, 16= Unterer Teil der „Herzkammer“, thermostabil, herunterklappbar, 17=Spritze zur Bolusinjektion eines Wirkstoffes oder zur Probenentnahme, 18=Druckmesser (LH-Mode: Perfusionsdruck, WH-Mode: Aortendruck), 19=Miller-Katheter zur Druckmessung im linken Ventrikel, 20=Druckaufnehmer zur isovolumetrischen Messung, 21=Spritze zur Druckfeineinstellung in der Diastole (z.B. 10 mmHg), 22=Rohrsystem zur Ableitung des aus dem Herzen austretenden Volumens, 23=Rohrsystem zum Absaugen des Volumens aus (22), 24=Rollenpumpe ca. 25 ml/min, 25=Wärmetauscher, 26=Vorlastanlage, 26a=Saugrohr zur Konstanthaltung der eingestellten Flüssigkeitssäule, 26b=Ventilationsrohr, 27=Flussmesser zur Bestimmung des Zustromvolumens zum linken Vorhof (Cardiac Output; CO), 28=Umstellhahn, 28a=Vorhofentlastungstubus im LH-Modus, 29=Vorhofkanüle mit Adapter, 30=Druckmesser für die Vorlast, 31=Drei-Wege-Hahn zur Lenkung des Perfusatflusses, 32=Becherglas zum Auffangen des Perfusates, 33=Arbeitsgang zum Einführen des Druckkatheters in den linken Ventrikel.



FILE: ICHWHK.FCD
Stand: 18.02.98

Abb. 7: Working Heart, modifiziert nach Hugo Sachs (Operating Manual for the Apparatus ISOLATED PERFUSED HEART modell ICH-SR, Type 844, Version 1.5; Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Deutschland)

3.3 Statistische Auswertung

Alle Auswertungs- und Statistikprogramme wurden mit dem Betriebssystem Microsoft Windows XP/Vista ausgeführt. Dabei diente Microsoft Excel 2003/2007, Graph Pad Prism 4.0 und SPSS 17 (SPSS GmbH Software, München, Deutschland) der Statistikerhebung und Diagrammerstellung. Daneben wurden spezielle Programme wie UVP Labworks zur Messung der Densitometrie der Western Blot-Analysen oder Lucia G Version 4.60 (LUCIA G, laboratory Imaging, Prag, CZ) zur Aufnahme und Auswertung der histologischen Färbungen verwendet.

Die angegebenen Daten wurden als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Die statistische Signifikanz wurde mit dem Student's t-Test für unverbundene Stichproben bestimmt. Sie wurde für $p < 0,05$ festgelegt. Sollten abweichende Testverfahren für spezielle Fragestellungen verwendet werden, so wird dies im Text vermerkt.

4. Ergebnisse

4.1 InVitro-Untersuchungen

4.1.1 Apoptose

Anthrazykline induzieren die Apoptose nicht selektiv in Tumorzellen, sondern auch in funktionellem Gewebe wie dem Myokard. Der Untergang von Kardiomyozyten durch die Anthrazyklin-induzierte Apoptose stellt einen Hauptmechanismus der Entwicklung der Herzinsuffizienz dar.

Wir untersuchten kultivierte neonatale Kardiomyozyten im Hinblick auf die Apoptoseraten unter den verschiedenen Bedingungen (Doxorubicin, Doxorubicin+Atorvastatin, Atorvastatin und Kontrolle). Dazu wurden die kultivierten neonatalen Kardiomyozyten mit 1 $\mu\text{mol/l}$ Doxorubicin über 18 Stunden behandelt. Eine Konzentration von 3 $\mu\text{mol/l}$ Atorvastatin wurde 6 Stunden vorher hinzugegeben. Nach insgesamt 24 Stunden Einwirkzeit wurden die Zellen zum Nachweis apoptotischer Kardiomyozyten mit der TUNEL-Methode gefärbt. Es wurden zu jeder Bedingung 32 Versuche durchgeführt und die Kardiomyozyten insgesamt sowie die TUNEL-positiven Zellen ausgewertet. Dazu wurden pro Bedingung zehn Bilder aufgenommen und der Mittelwert der Apoptoseraten errechnet. In Abb. 8 sind die Apoptoseraten graphisch und an exemplarischen Bildern gezeigt.

Unter einer Behandlung mit Doxorubicin ($n=32$) zeigte sich eine Apoptoserate von $68,73 \pm 8,86$ Prozent. Diese ist signifikant höher als die Apoptoseraten der Kontrollen ($n=32$) mit $9,39 \pm 2,69$ Prozent und der Atorvastatin-Gruppe ($n=32$) mit $10,83 \pm 3,97$ Prozent ($p < 0.001$). Eine Kombinationsbehandlung mit Doxorubicin und Atorvastatin ($n=32$) erhöhte die Apoptoseraten im Vergleich zur Doxorubicin-Gruppe auf $74,75 \pm 8,36$ Prozent signifikant ($p < 0.01$). Somit reduziert Atorvastatin die Anthrazyklin-induzierte Apoptose in unserer Versuchsanordnung nicht, sondern führt nochmal zu einem Anstieg der Apoptoseraten um 6 Prozent. Atorvastatin allein hatte keinen Effekt auf die Apoptoseraten.

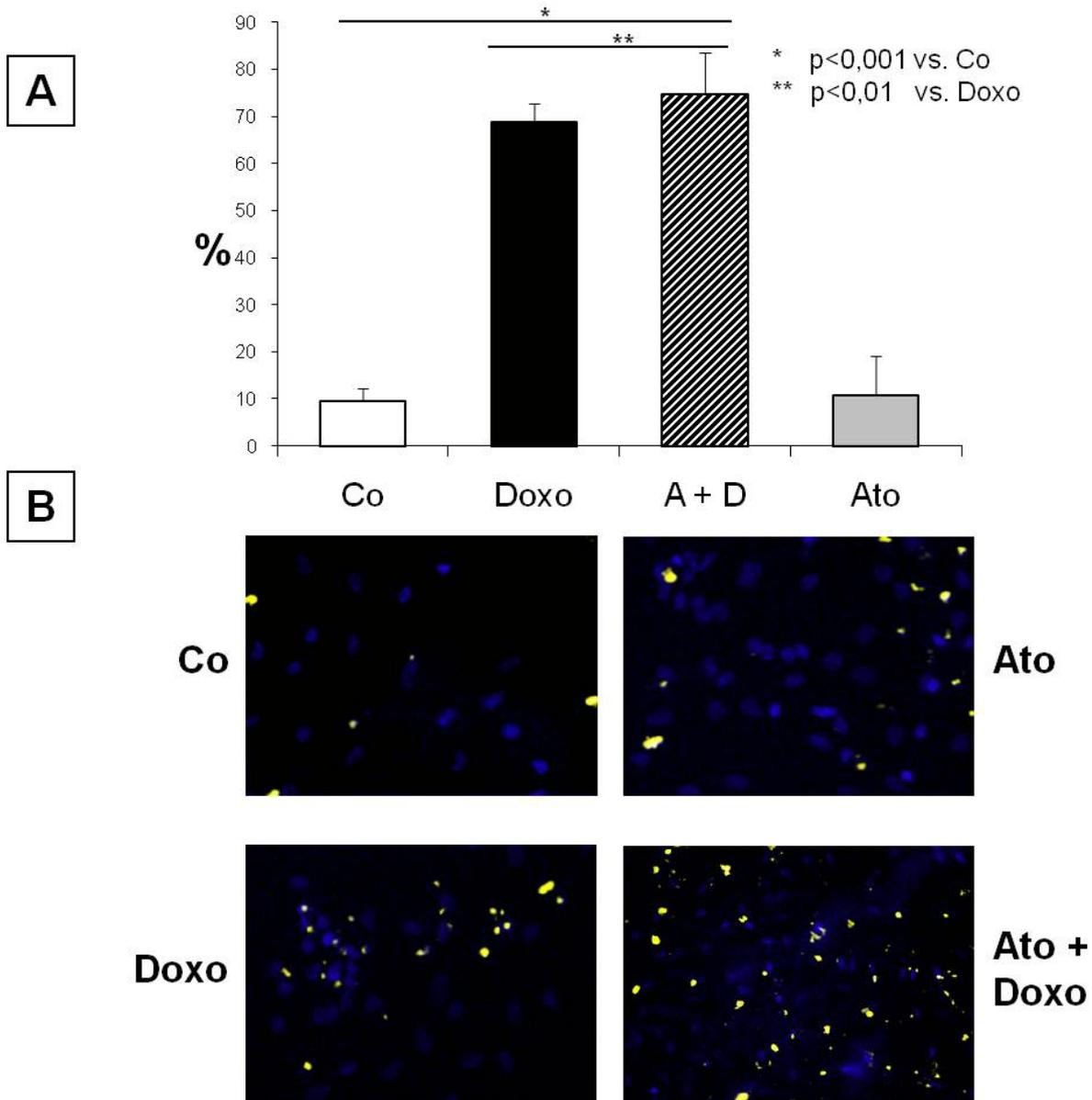


Abb. 8: Apoptoseraten in Prozent unter Doxo/Atorva in der TUNEL-Färbung (n=32/Bedingung)

A: Doxorubicin (n=32) erhöhte die Apoptoserate im Vergleich zur Kontrolle (n=32) signifikant ($p=0,001$). Die Kombination von Doxorubicin und Atorvastatin (n=32) erhöhte das Apoptosesignal im Vergleich zur Kontrolle ($p<0,001$) und zur Doxorubicin-Gruppe ($p<0,01$) signifikant. Die alleinige Behandlung mit Atorvastatin (n=32) hatte keinen Effekt auf die Apoptoserate. B: Beispielbilder zu den verschiedenen Bedingungen (Co = Kontrolle, Ato = Atorvastatin, Doxo = Doxorubicin, Ato + Doxo = Atorvastatin + Doxorubicin)

Um unsere Ergebnisse zu bestätigen, wählten wir mit dem CellDeath ELISA eine zweite Methode zum Nachweis der Apoptose aus. Die Versuchsbedingungen wurden weitestgehend beibehalten, jedoch reduzierten wir die Konzentration von Atorvastatin auf 1 $\mu\text{mol/l}$, um eventuellen ungünstigen Effekten auf die Apoptoserate entgegenzuwirken. Die Ergebnisse und die Anzahl der Versuche sind in Abb. 9 dargestellt.

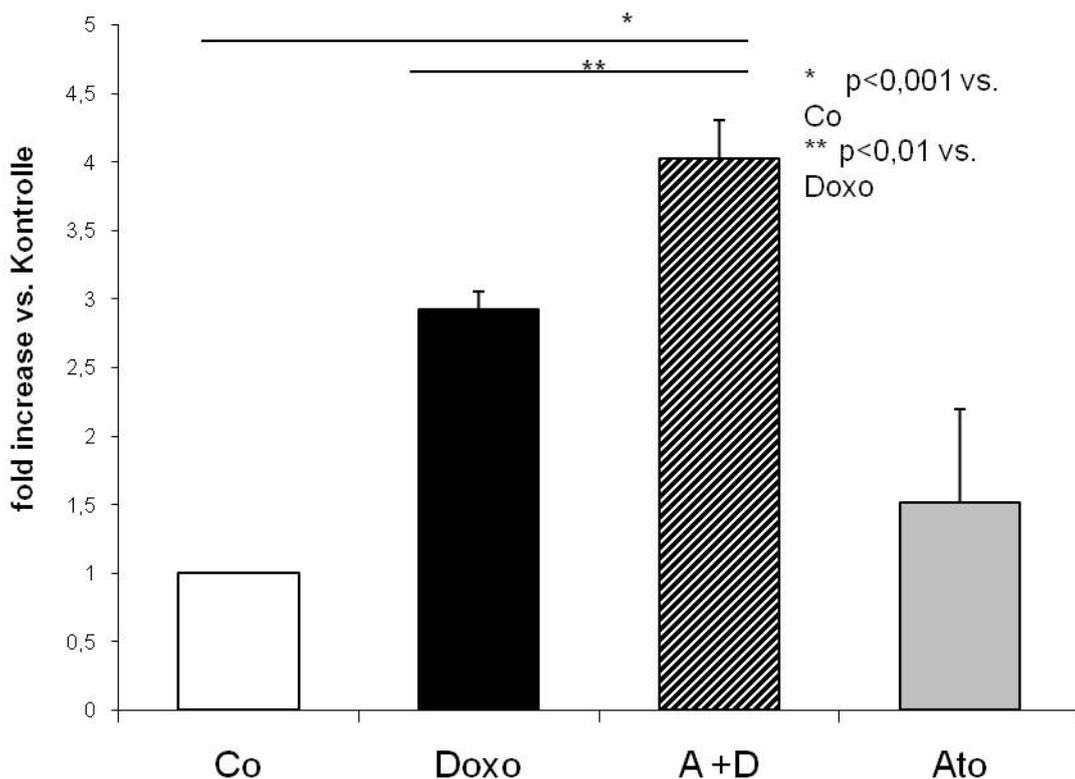


Abb. 9: Apoptoseraten, gemessen mit dem Celldeath Elisa Kit (n=5/Bedingung)

Doxorubicin (n=5) erhöhte die Apoptoserate im Vergleich zur Kontrolle (n=7) signifikant (p=0,001). Die Kombination von Doxorubicin und Atorvastatin (n=8) erhöhte das Apoptosesignal im Vergleich zur Kontrolle (p<0,001) und zur Doxorubicin-Gruppe (p<0,01) signifikant. Die alleinige Behandlung mit Atorvastatin (n=9) hatte keinen Effekt auf die Apoptoserate.

Auch bei dieser Methode zeigte sich eine signifikante Erhöhung des Apoptosesignals um den Faktor $2,93 \pm 0,13$ unter Doxorubicin (n=5) im Vergleich zur Kontrolle (n=7) (p<0.001). Die Kombination aus Doxorubicin und Atorvastatin (n=8) zeigte eine Erhöhung um den Faktor $4,02 \pm 0,28$ im Vergleich zur Kontrolle (p<0.001). Atorvastatin allein (n=9) hatte keinen signifikanten Effekt auf die Apoptose.

Wir konnten mit einer zweiten Nachweismethode die Erhöhung der Apoptoseraten unter der Kombinationsbehandlung mit Doxorubicin und Atorvastatin im Vergleich zur Doxorubicin-Monotherapie bestätigen ($p < 0.01$).

4.1.2 Untersuchungen zu den Effekten auf Apoptosepathways

Die Mechanismen der Anthrazyklin-induzierten Apoptose sind vielfältig. Einer der wichtigsten ist die p53- und mitochondrial initiierte Apoptose, in die die Bcl-2-Proteinfamilie involviert ist. Anthrazykline verändern das Verhältnis zwischen dem antiapoptotischen Protein Bcl-2 und dem proapoptotischen Protein Bax. Eine Erhöhung der Bax-Konzentration im Zytosol führt zur Mitochondrienschädigung und Cytochrom c-Ausschüttung. Letzteres aktiviert das Caspasensystem (inkl. Cleaved Caspase 3), welches die Apoptose bedingt.

Um die Einflüsse der Kombination von Doxorubicin und Atorvastatin zu untersuchen, behandelten wir kultivierte neonatale Kardiomyozyten analog zu den Untersuchungen zur Apoptose. Die Kardiomyozyten wurden für 18 Stunden mit Doxorubicin und 4 Stunden früher mit Atorvastatin behandelt. Die Proteine wurden mittels Western Blot aufgetrennt und über Antikörperreaktionen bestimmt.

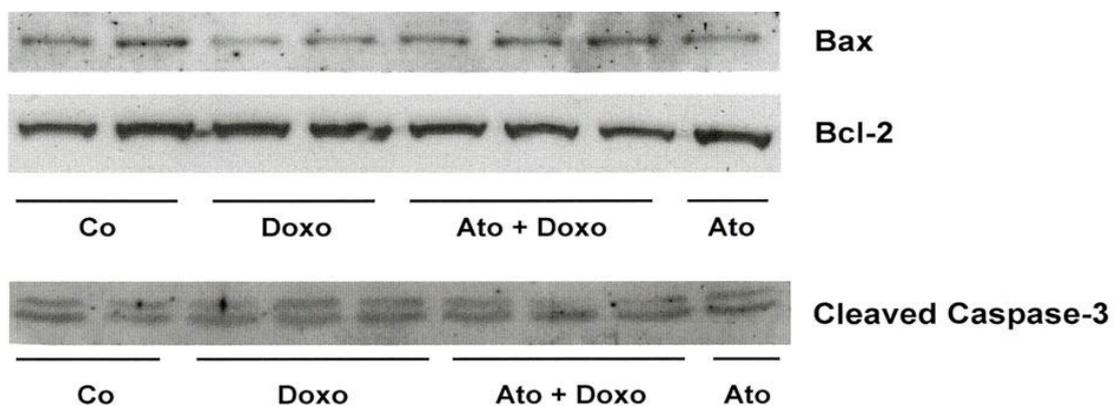


Abb. 10 Bax, Bcl-2 und Cleaved Caspase-3 unter Doxo/Atorva (Western Blot)

Die Abbildung zeigt repräsentative Western Blots zu ausgewählten Proteinen, die in die Anthrazyklin-induzierte Apoptose involviert sind. Weder Doxorubicin, Atorvastatin noch die Kombination beider hatte einen signifikanten Effekt auf die Upregulation von Bax und der Cleaved Caspase-3 oder die Downregulation von Bcl-2 als Ausdruck der Apoptose.

Wir konnten in unseren Versuchen keine Erniedrigung der Konzentration von Bcl-2 oder Erhöhung von Bax und Cleaved Caspase 3 im Sinne einer apoptotischen

Reaktion der Kardiomyozyten unter Doxorubicin beobachten. Auch die zusätzliche Behandlung mit Atorvastatin ergab keine Änderung der Proteinkonzentration. Wir sahen keine Änderungen der oben genannten Proteine zu diesem Beobachtungszeitpunkt.

4.1.3 Untersuchungen zu den Effekten auf Survivalpathways

Neben der direkten Aktivierung von Apoptosepathways reduzieren Anthrazykline wichtige, als Survivalfaktoren dienende Proteine. GATA4 - zur Gruppe der Zink-Finger-Transkriptionsfaktoren gehörend - ist nicht nur in der Embryogenese und myokardialen Differenzierung ein wichtiger Faktor, sondern reguliert auch wichtige funktionelle Gene in den Kardiomyozyten und ist ein wichtiger Survivalfaktor. Anthrazykline senken sowohl die Expression als auch die Translation von GATA4. In Versuchen konnte die Wirkung der Anthrazykline durch eine GATA4-Überexpression reduziert werden. Die Downregulation durch Anthrazykline funktioniert wahrscheinlich auf Expressionsebene und wird weniger durch freie Sauerstoffradikale vermittelt. GATA6 zeigte in den Kardiomyozyten einen analogen Effekt. Der Myocyte enhancer factor 2c (MEF2c) ist ein Transkriptionsfaktor, der die Differenzierung von Kardiomyozyten reguliert und die Transkription wichtiger kardialer Proteine bestimmt. GATA4 und MEF2c wirken synergistisch als Survivalfaktoren in Kardiomyozyten.

Es wurden kultivierte neonatale Kardiomyozyten in vier Bedingungen (Doxorubicin, Doxorubicin+Atorvastatin, Atorvastatin und Kontrolle) behandelt. Die Doxorubicinkonzentration lag bei 1 µmol/l über 12 Stunden. Es wurden zur Erstellung einer Konzentrations-Wirkungs-Beziehung verschiedene Konzentrationen von Atorvastatin eingesetzt (0,01 - 0,1 - 1 - 10 µmol/l). Die Behandlungszeit betrug 16 Stunden und wurde 4 Stunden vor Doxorubicinbehandlung begonnen. Zu jeder Bedingung wurden drei Versuche durchgeführt und die Ergebnisse bezüglich der Expression von GATA4, GATA6 und MEF2c in der RealTime PCR untersucht.

Doxorubicin reduzierte die Expression von GATA4, GATA6 und MEF2c deutlich. Wir konnten damit Ergebnisse aus Vorpublikationen bestätigen (Minotti et al., 2004). Die Reduktion war für GATA4 am geringsten und für MEF2c am stärksten ausgeprägt, wobei sich keine statistisch signifikanten Unterschiede ergaben. Eine Behandlung mit

Atorvastatin erhöhte die Expression von GATA4 mit steigenden Konzentrationen von 0,01 bis 1 $\mu\text{mol/l}$ ohne statistische Signifikanz. Unter einer Konzentration von 10 $\mu\text{mol/l}$ Atorvastatin zeigte sich dann jedoch ein nicht signifikanter Abfall der GATA4-Expression unter den Wert für die alleinige Doxorubicinbehandlung. Die dosisabhängige Heraufregulierung für GATA4 konnte bei den beiden anderen Transkriptionsfaktoren GATA6 und MEF2c nicht beobachtet werden. Sie wurden von den niedrigeren Atorvastatinkonzentrationen (0,01 - 1 $\mu\text{mol/l}$) nicht beeinflusst. Eine Konzentration von 10 $\mu\text{mol/l}$ Atorvastatin zeigte aber auch hier einen Abfall der Expressionen.

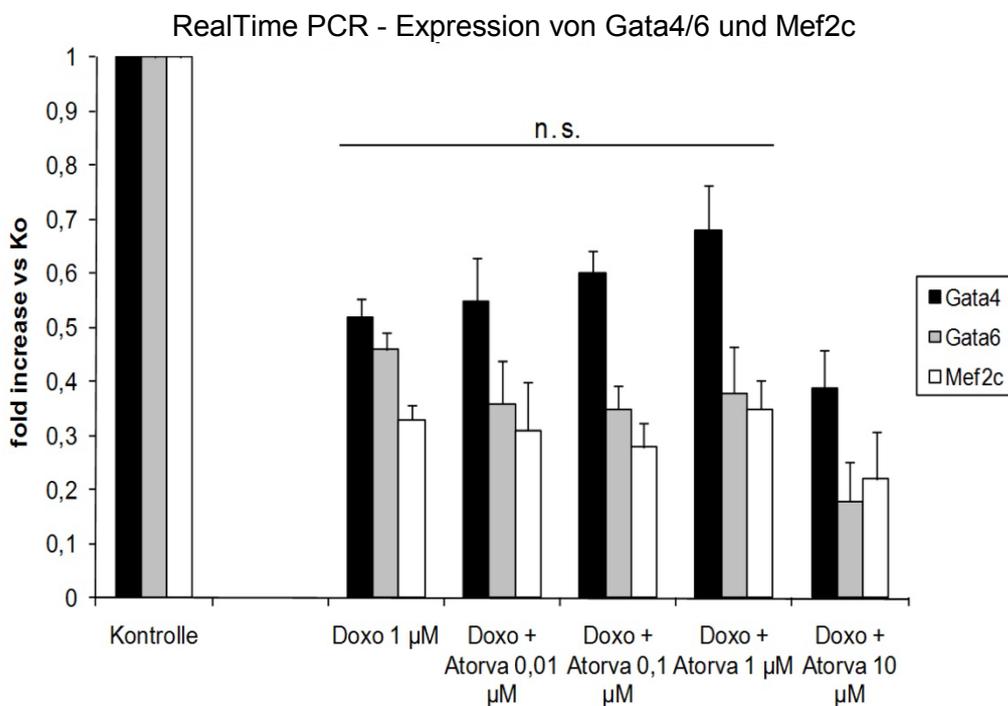


Abb. 11: Gata4-, Gata6- und Mef2c-Expression und -Konzentration unter Doxo/Atorva im Modell der akuten Myokardschädigung (n=3)

In der Real Time PCR zeigte sich im Vergleich zur Kontrolle eine deutliche Downregulation von GATA4, GATA6 und Mef2c unter 1 μM Doxorubicin (n=1). Die Hinzugabe und Dosissteigerung von Atorvastatin zeigte eine nicht signifikante Zunahme der Expression von GATA4 in den Dosierungen von 0,01 bis 1 μM (je n=3). Unter der Kombination aus 1 μM Doxorubicin und 10 μM Atorvastatin (n=3) kam es zur einer in unserem Versuch maximalen Reduktion der Expression von GATA4. Die GATA6- und Mef2c-Expression wurde unter der Kombination von Doxorubicin 1 μM und 0,01-1 μM Atorvastatin nicht beeinflusst. Atorvastatin scheint dosisabhängig Einflüsse auf die Doxorubicin-induzierte Suppression von GATA4 zu haben. Diese scheinen bei Dosiseskalerung in einen adversen Effekt umzuschlagen. In unseren Versuchen ist dies nur als Trend ohne statistische Signifikanz zu zeigen.

4.2 InVivo-Untersuchungen

In den InVitro-Untersuchungen zeigte sich, dass Atorvastatin der Doxorubicin-induzierten Apoptose und der Herunterregulierung von Survivalpathways nicht entgegenwirken kann. Es ergaben sich trotz der Einschränkungen, die mit InVitro-Experimenten verbunden sind, Hinweise für einen negativen Effekt von Atorvastatin in Kombination mit Doxorubicin.

Um die Effekte von Doxorubicin und Atorvastatin in vivo zu untersuchen und zu charakterisieren, wählten wir ein Mausmodell. Wir behandelten männliche C57/b16-Mäuse in verschiedenen Gruppen unter Berücksichtigung der Tierschutzrichtlinien unter standardisierten Bedingungen mit einem 12-Stunden-Tag-Nacht-Rhythmus. Doxorubicin wurde in zwei Einzeldosen mit sechs Tagen Abstand und in einer Gesamtdosis von 20 mg Doxorubicin pro kg Körpergewicht subkutan injiziert. Die Wirkung von Atorvastatin wurde allein und zusätzlich in einer Gruppe mit Doxorubicin untersucht. Die Behandlung erfolgte mit 2 mg Atorvastatin pro kg Körpergewicht mit täglicher Injektion, wobei diese drei Tage vor der Doxorubicinbehandlung begonnen wurde. Der Beobachtungszeitraum nach der letzten Doxorubicinapplikation betrug 21 Tage.

4.2.1 Überlebensraten und morphologische Charakterisierung der Versuchstiere

Das Überleben der Versuchstiere kann als Anhaltspunkt für die Effekte von Doxorubicin und Atorvastatin auf die Herzen herangezogen werden. Die Mortalitätsrate ist vom Ausmaß der kardialen Schädigung abhängig.

Täglich wurde das Überleben der Mäuse registriert. Wir behandelten 45 Tiere mit Doxorubicin und 45 Tiere mit der Kombination aus Doxorubicin und Atorvastatin (n=45). Unter der Doxorubicinbehandlung verstarben innerhalb von 21 Tagen 31 Tiere, die Überlebensrate lag bei 3%. Ebenso viele Tiere verstarben unter der Kombination von Doxorubicin und Atorvastatin. Es starben unter diesen beiden Bedingungen signifikant mehr Tiere als in der Kontrollgruppe (n=18) ($p < 0,05$), da hier alle Tiere bis zum Versuchsende überlebten. Atorvastatin (n=18) allein hatte keinen Einfluss auf das Überleben der Tiere.

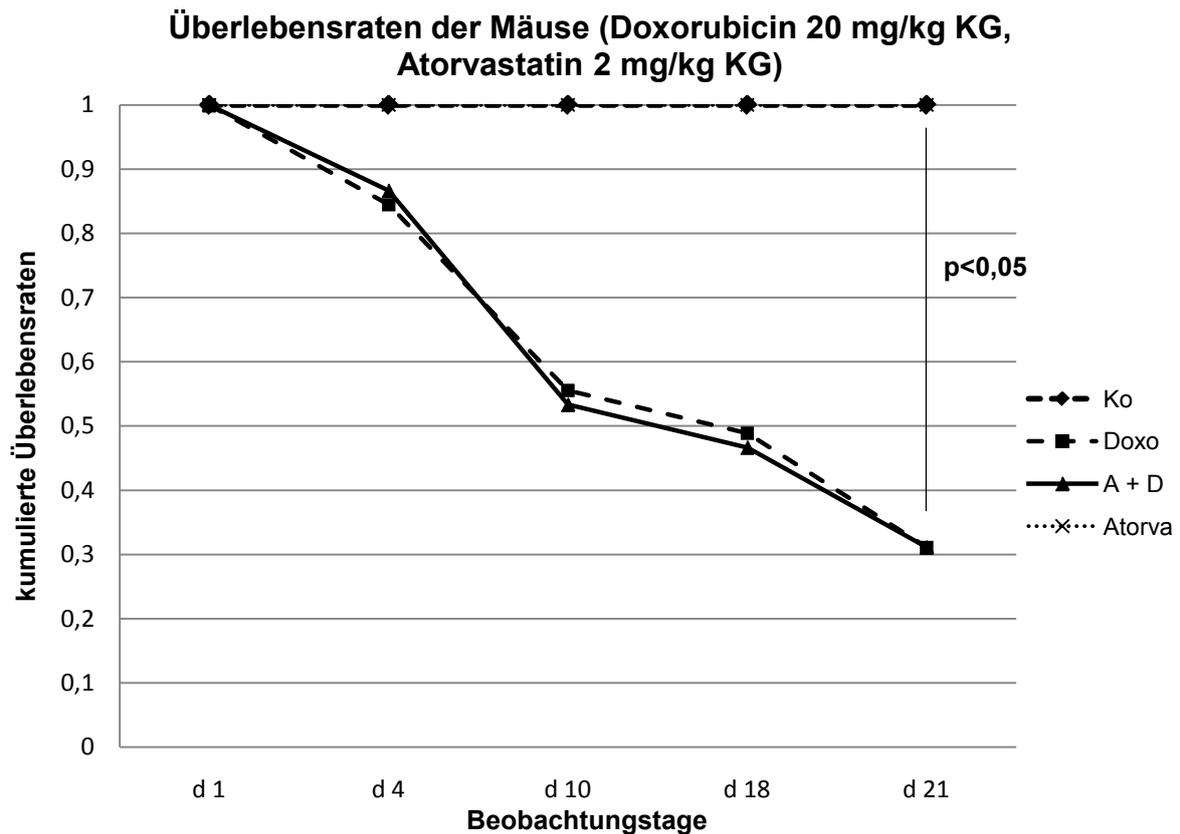


Abb. 12: Überlebensraten der behandelten Mäuse

Die Abbildung zeigt die Überlebensraten in einem Beobachtungszeitraum von 21 Tagen nach der letzten Doxorubicinapplikation. Unter Doxorubicin verstarben 31 Tiere ($n=45$) und damit signifikant mehr als in der Kontrollgruppe ($n=18$), die Überlebensrate lag bei 31%. Die Kombination von Doxorubicin und Atorvastatin ($n=48$) zeigte vergleichbare Überlebensraten. Atorvastatin allein ($n=18$) hatte keinen Effekt auf das Überleben.

Die Charakterisierung der Versuchstiere gibt Aufschluss über den Ernährungszustand; durch eine etwaige Abnahme der Organgewichte durch die Chemotherapie und indirekt durch den Vergleich der Feucht- und Trockengewichte lassen sich Rückschlüsse auf eine Ödembildung durch Herzinsuffizienz ziehen.

Die Versuchstiere wurden tief anästhesiert und mit kardiopleger Lösung (bei 4°C) getötet. Herz, Lunge und Leber wurden durch Eröffnung des Thorax und des Abdomens entnommen, in eiskaltem PBS gewaschen und gewogen. Nach Gefriertrocknung erfolgte eine erneute Messung des Gewichts. Die Gewichtsangaben der trockenen und feuchten Organe wurden in Relation zum Körpergewicht gesetzt.

Doxorubicin (n=10) bewirkte eine Abnahme des Körpergewichts um 15% auf 21,4±0,66 g und die Kombination mit Atorvastatin (n=6) auf 22,2±0,77 g. Dies sind signifikante Körpergewichtsabnahmen im Vergleich zur Kontrolle (n=4) mit durchschnittlich 26,2±0,48 g (p<0,05). Es zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der Kombination aus Doxorubicin und Atorvastatin sowie Doxorubicin allein. Atorvastatin allein (n=4) hatte keinen Effekt auf das Körpergewicht (KG: 25,9±1,0 g). Analoge Ergebnisse fanden sich beim Herzgewicht. Doxorubicin allein reduzierte das Herzgewicht auf 126,6 mg (p<0,05 vs. Kontrolle), die Kombination mit Atorvastatin auf 135 mg (p<0,05 vs. Kontrolle) (vgl. Tabelle 14).

Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede für die Gewichtsangaben von Herz, Lunge und Leber in Relation zum Körpergewicht über alle Gruppen. Die Analyse der Feucht- und Trockengewichte kam zum gleichen Ergebnis (vgl. Tabelle 14).

Tabelle 14: Morphologische Charakterisierung der Versuchstiere

	Körpergewicht g	Herzgewicht mg	Herzgewicht/ Körpergewicht mg/g x 10 ⁻³	Lungen-/ Körpergewicht mg/g x 10 ⁻³ Feuchtgewichte/(Trockengewichte)	Lebergewicht/ Körpergewicht mg/g x 10 ⁻²
Kontrollen (n=4)					
MW	26,2	162,3	6,2	6,0 (1,2)	5,0 (1,7)
SEM	0,5	5,9	0,2	0,8 (0,1)	0,2 (0,1)
Doxorubicin (n=10)					
MW	21,4*	126,6*	5,9	6,2 (1,2)	4,5 (1,4)
SEM	0,66	3,4	0,2	0,4 (0,1)	0,2 (0,1)
Doxo+Atorva (n=6)					
MW	22,2*	135,0*	6,1	6,4 (1,4)	4,7 (1,2)
SEM	0,8	5,9	0,2	0,3 (0,1)	0,1 (0,2)
Atorvastatin (n=4)					
MW	25,9	152,8	5,9	6,2 (1,2)	4,7 (1,6)
SEM	1,0	4,3	0,1	0,4 (0,1)	0,3 (0,1)
* p<0,05 vs. Kontrolle					

4.2.2 Myokardiale Apoptose

Die Apoptose ist ein zentraler Mechanismus der Anthrazyklin-induzierten Kardiotoxizität. Wir konnten dies bereits in den InVitro-Untersuchungen zeigen. Atorvastatin konnte zu diesem Beobachtungszeitpunkt die Effekte der Anthrazykline auf die Apoptose in den InVitro-Versuchen nicht positiv beeinflussen.

Zur Klärung der Effekte im InVivo-Modell wurden die Versuchstiere, wie unter Punkt 4.2 beschrieben, in vier Gruppen behandelt. Es wurden am Ende des Finalversuchs die Herzen von je fünf Tieren entnommen und in kardiopleger Lösung in der Diastole arretiert. Danach wurden die Herzen in einer vierprozentigen Paraformaldehydlösung fixiert und anschließend in einem Paraffinblock gegossen. Es wurden transversale 6 µm dicke Schnitte aus der mittleren Ventrikel Ebene angefertigt. Die Schnitte wurden mit dem ApopTag Peroxidase In Situ Oligo Ligation Kit (Chemicon International, Millipore, Billerica, Massachusetts) nach der Herstelleranweisung behandelt. Der In Situ Oligo Ligation Assay weist spezifisch die Apoptose über DNA-Doppelstrangbrüche nach. Die Detektierung der Zellen erfolgte in der Lichtmikroskopie unter Verwendung der 3-3'-Diaminobenzidine-Färbung des Kits. Es wurden insgesamt zu jeder Bedingung 2000 Zellen aus je fünf Herzen ausgewertet.

Doxorubicin erhöhte die Apoptoseraten im Vergleich zur Kontrolle auf $16,2 \pm 0,9\%$ signifikant ($p < 0,05$). Die Apoptoserate war unter der Kombination von Doxorubicin und Atorvastatin mit $14,3 \pm 4,5\%$ etwas niedriger ausgeprägt, jedoch im Vergleich zur Kontrolle ebenfalls signifikant erhöht ($p < 0,05$). Atorvastatin allein hatte keinen Effekt auf die Apoptose.

Doxorubicin zeigte wie in den InVitro-Ergebnissen einen signifikanten Anstieg der Apoptoseraten im Vergleich zur Kontrolle. Die Kombination mit Atorvastatin führte zu diesem Beobachtungszeitpunkt im Gegensatz zu den InVitro-Versuchen zu keiner weiteren Erhöhung der Apoptoseraten. Sie waren prozentual, aber nicht statistisch signifikant und niedriger als unter der Behandlung mit Doxorubicin allein.

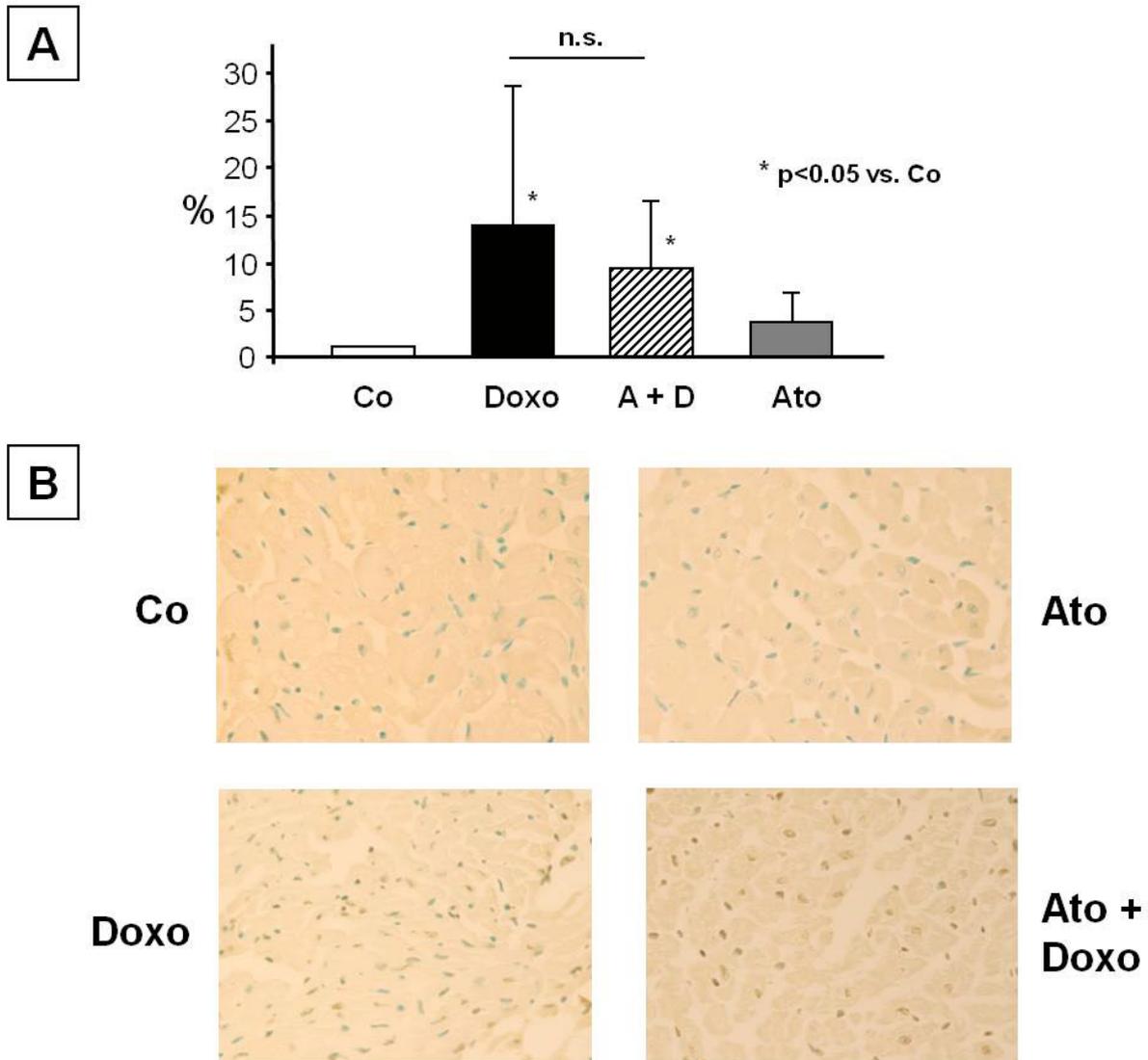


Abb. 13: Apoptoseraten der Herzen behandelter Versuchstiere

A: Prozentuale Darstellung der Apoptoseraten, die mittels ApoptTag Peroxidase In Situ Oligo Ligation Kit registriert wurden. Pro Gruppe wurden von fünf Versuchstieren die Herzen verwendet und in 6 μ m dicken Schnitten insgesamt je 2000 Zellen ausgewertet. Doxorubicin erhöhte die Apoptoseraten im Vergleich zur Kontrolle auf $16,2 \pm 0,9\%$ signifikant ($p < 0,05$). Die Apoptoserate war unter der Kombination von Doxorubicin und Atorvastatin mit $14,3 \pm 4,5\%$ etwas niedriger ausgeprägt, jedoch im Vergleich zur Kontrolle weiterhin signifikant erhöht ($p < 0,05$). Atorvastatin allein hatte keinen Effekt. B: Repräsentative Beispielbilder des Peroxidase insitu Assays der verschiedenen Bedingungen (Co = Kontrolle, Ato = Atorvastatin, Doxo = Doxorubicin, Ato + Doxo = Atorvastatin + Doxorubicin)

GATA4 wurde als relevanter Survivalfaktor bei der Doxorubicin-induzierten Kardiotoxizität identifiziert (Kim et al., 2002, Kim et al., 2003). Doxorubicin regulierte diesen auf Expressionsebene signifikant herunter, was wir im InVitro-Versuch ebenfalls zeigen konnten. Es zeigte sich in diesen Versuchen eine dosisabhängige

Reduktion dieses toxischen Effektes (0,01 - 1 $\mu\text{mol/l}$ Atorvastatin) bzw. eine Eskalation unter 10 $\mu\text{mol/l}$ Atorvastatin. Diese Effekte waren jedoch nicht statistisch signifikant.

Zur Untersuchung der Einflüsseffekte im InVivo-Modell wurden die Herzen der Versuchstiere am Ende des Finalversuchs entnommen und von Bindegewebs- und Gefäßresten gesäubert. Das Myokard wurde homogenisiert und für PCR und Western Blot-Untersuchungen aufgearbeitet.

Wir sahen keinen signifikanten Effekt von Doxorubicin auf die Protein(n=2)- und die mRNA(n=3)- Expression von GATA4 im Vergleich zur Kontrolle. Atorvastatin hatte keinen weiteren Einfluss auf den Effekt von Doxorubicin (Westernblot pro Bedingung n=2, PCR pro Bedingung n=3).

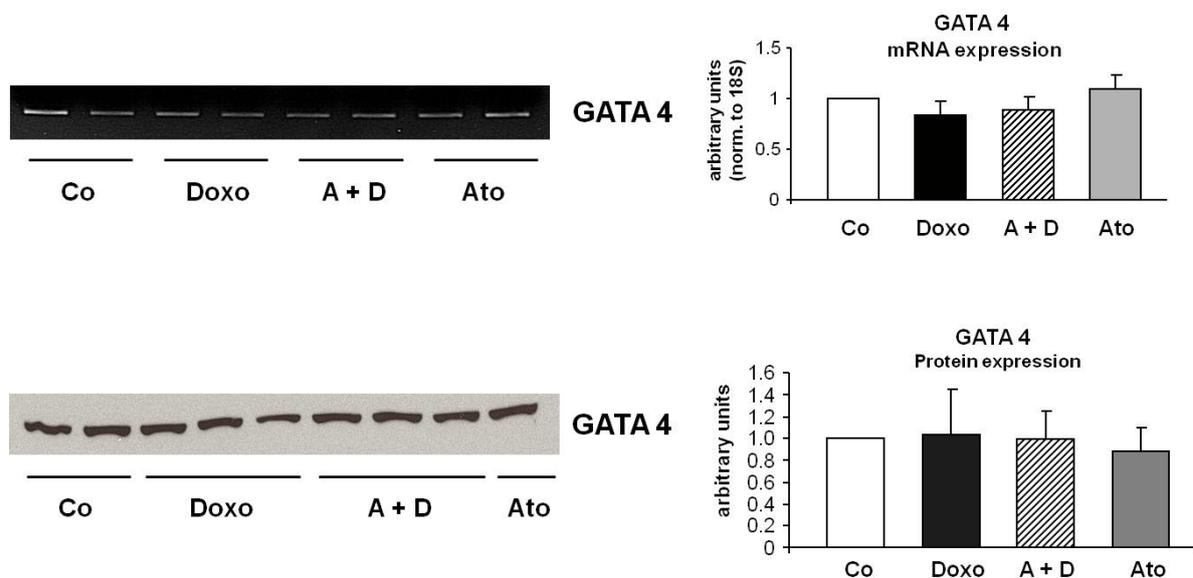


Abb. 14: Myokardiale Expression von GATA4 auf Protein- und mRNA-Ebene

Expression von GATA4 auf Protein- und mRNA-Ebene. Pro Bedingung wurden je zwei Versuche durch Western Blot und je drei Versuche durch PCR durchgeführt. Es zeigte sich keine signifikante Beeinflussung der Expression durch Doxorubicin (Doxo), durch Kombination mit Atorvastatin (A + D) oder durch Atorvastatin (Ato) allein im Vergleich zur Kontrolle (Co).

4.2.3 Einfluss freier Sauerstoffradikale

Freie Sauerstoffradikale spielen in der Vermittlung der Apoptose und bei der Einschränkung wichtiger Zellfunktionen eine entscheidende Rolle. Anthrazykline

begünstigen und eskalieren über verschiedene Wege die Erhöhung freier Sauerstoffradikale (ROS). Statine reduzieren über die Aktivitätsminderung der NADPH-Oxidase in Gefäßmuskelzellen effektiv die Konzentrationen freier Sauerstoffradikale. Um auszuschließen, dass die Konzentration von 2 mg Atorvastatin pro kg Körpergewicht nicht ausreicht, um ROS zu reduzieren, wurde die Freisetzung freier Sauerstoffradikale im Myokard und in der Aorta gemessen.

Es wurden männliche C57/b16-Mäuse mit einer Gesamtdosis von 20 mg Doxorubicin pro kg Körpergewicht, aufgeteilt in zwei Injektionen mit sechs Tagen Abstand, behandelt. Die Applikation von 2 mg Atorvastatin pro kg Körpergewicht und Tag wurde drei Tage früher begonnen. In einem Finalversuch wurden die Aorten und Herzen der Tiere nach vier Wochen asserviert. In der Kontrollgruppe und der Atorvastatingruppe wurden jeweils sieben Tiere behandelt. Mit Doxorubicin und der Kombination aus Doxorubicin und Atorvastatin wurden zehn Tiere behandelt.

Zur Bestimmung der NADPH-Oxidase-Aktivität im Myokard und somit der Freisetzung freier Sauerstoffradikale wurden die linken Ventrikel der gewonnenen Herzen in eisgekühltem Lucigenin-verstärkten Chemilumineszenz-Puffer homogenisiert. Nach der von Maack et al. (2003) beschriebenen Methode wurde der NADPH-Umsatz in einem Szintillationszähler registriert und auf die Kontrolle normiert.

Doxorubicin (n=10) erhöhte die NADPH-Oxidase-Aktivität im Vergleich zur Kontrolle (n=7) signifikant ($p < 0,05$). Atorvastatin hatte weder auf die Doxorubicin-induzierte Aktivitätserhöhung (n=10) noch auf die basale NADPH-Oxidase-Aktivität (n=7) einen signifikanten Einfluss. Atorvastatin konnte die durch Doxorubicin-induzierte ROS-Produktion im Myokard nicht beeinflussen.

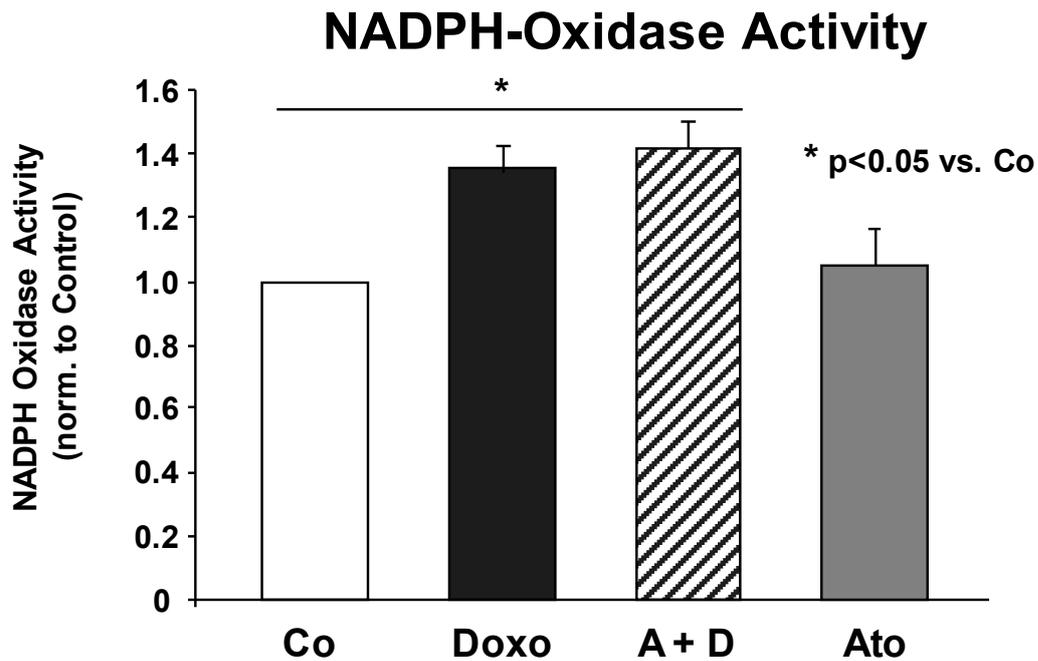


Abb. 15: Myokardiale ROS-Produktion

Doxorubicin (n=10) und die Kombination mit Atorvastatin (n=10) erhöhten die NADPH-Oxidase-Aktivität als Ausdruck der myokardialen ROS-Produktion im Vergleich zur Kontrolle (n=7) signifikant ($p < 0,05$). Atorvastatin allein (n=7) zeigte keine signifikante Beeinflussung der NADPH-Oxidase.

Ergänzend untersuchten wir die Freisetzung freier Sauerstoffradikale in den Gefäßmuskelzellen der Aorta. Die explantierten Aorten wurden in einer modifizierten Krebs-HEPES Pufferlösung von Bindegewebe gesäubert. In einer Chemilumineszenzreaktion (L-012 Chemilumineszenzassay: LUMAT LB 9501, Berthold, Germany) wurde die Freisetzung der Sauerstoffradikale zeitabhängig pro mg Aortengewebe gemessen und auf die Kontrolle normiert.

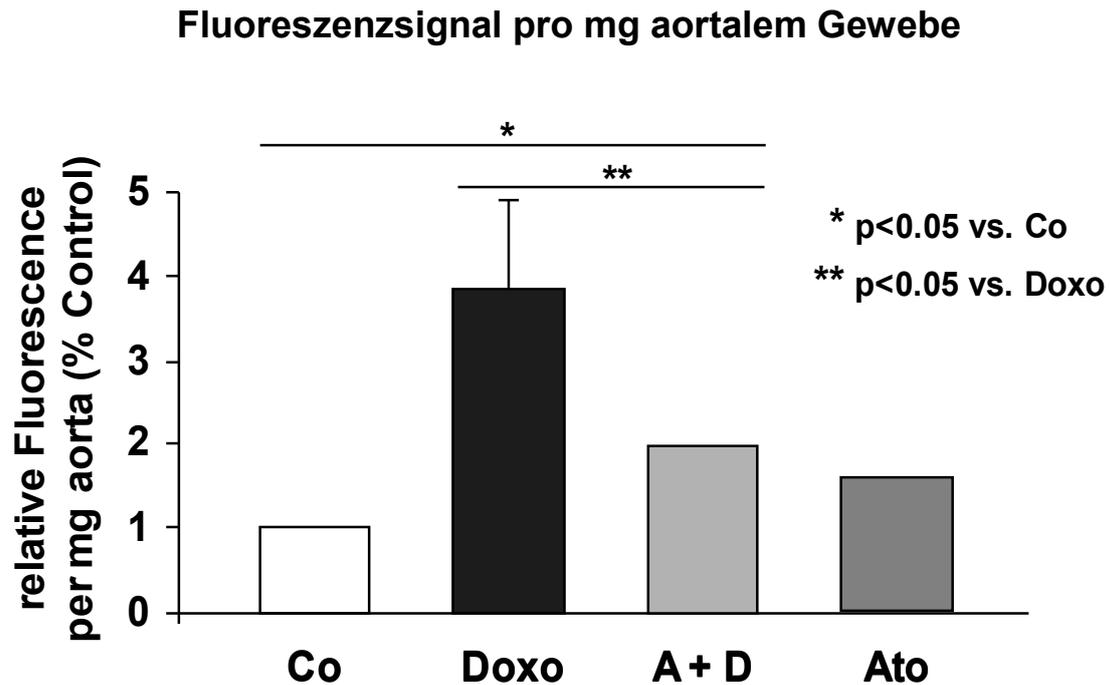


Abb. 16: Aortale ROS-Produktion

Doxorubicin (n=7) erhöhte die Freisetzung freier Sauerstoffradikale im aortalen Gewebe im Vergleich zur Kontrolle (n=7) signifikant ($p < 0,05$). Dieser Effekt konnte in der Aorta durch Atorvastatin (n=7) inhibiert werden ($p < 0,05$), lag jedoch immer noch signifikant über dem Niveau der Kontrolle ($p < 0,05$). Atorvastatin allein (n=7) hatte keinen signifikanten Effekt.

Doxorubicin (n=7) bewirkte eine signifikante Erhöhung ($p < 0,05$) der ROS-Freisetzung aus den Gefäßmuskelzellen der Aorta im Vergleich zur Kontrollgruppe (n=7). Atorvastatin konnte die Doxorubicin-induzierte ROS-Freisetzung suffizient und signifikant ($p < 0,05$) in Gefäßmuskelzellen reduzieren. Es zeigte sich unter der Kombination von Doxorubicin und Atorvastatin (n=10) im Vergleich zur Kontrolle eine zwar deutlich niedrigere, aber noch signifikante Erhöhung ($p < 0,05$) der freien Sauerstoffradikale. Atorvastatin (n=7) allein veränderte im Vergleich zur Kontrolle die ROS-Produktion nicht signifikant.

Atorvastatin reduzierte die Doxorubicin-induzierte Produktion freier Sauerstoffradikale signifikant in der Aorta ($p < 0,05$), nicht jedoch im Myokard.

4.2.4. Kardiale Fibrosierung

Die kardiale Fibrose ist ein Adaptationsmechanismus für kardialen Stress, insbesondere nach Myokardinfarkt, bei prolongiertem Bluthochdruck oder nach einer Chemotherapie mit Anthrazyklinen. Eine progrediente Fibroseentwicklung führt beim Menschen zu Arrhythmieeigung und zunehmender erst diastolischen, im Verlauf auch systolischen kardialen Dysfunktion.

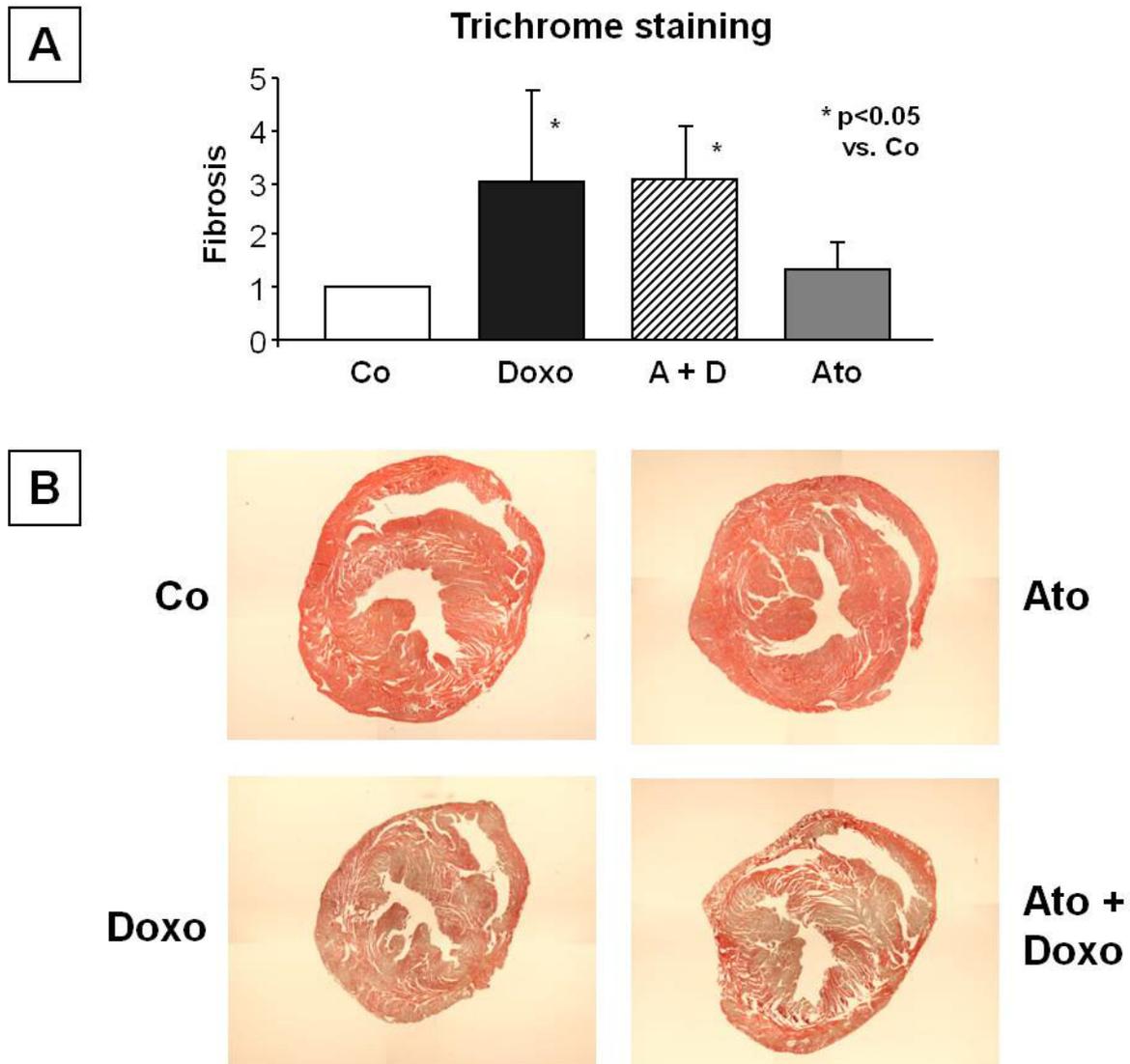


Abb. 17: Fibrosedarstellung durch Trichromfärbung

A: Darstellung der kardialen Fibrose durch Trichromfärbung. Doxorubicin (n=10) induzierte im Vergleich zur Kontrolle (n=10) signifikant ($p<0,05$) die kardiale Fibrose. Die Kombination mit Atorvastatin (n=10) hatte keinen Einfluss auf diesen Effekt, zeigte aber ebenfalls die signifikante Erhöhung im Vergleich zur Kontrolle ($p<0,05$). Atorvastatin (n=10) allein hatte keinen Effekt auf die kardiale Fibrose. B: Repräsentative Beispielbilder der verschiedenen Bedingungen (Co = Kontrolle, Ato = Atorvastatin, Doxo = Doxorubicin, Ato + Doxo = Atorvastatin + Doxorubicin)

Zur Untersuchung der Effekte von Doxorubicin und Atorvastatin wurden die Versuchstiere, wie eingangs beschrieben, behandelt. Die Herzen wurden nach Entnahme durch kardioplege Lösung in der Diastole arretiert und anschließend in vierprozentigem Paraformaldehyd fixiert. Es wurden 6 µm dicke Schnitte durch den Ventrikel angefertigt und mit Trichom-Färbung nach Masson Goldner zum Nachweis der Fibrose gefärbt.

Doxorubicin (n=10) führte zu einer signifikanten Zunahme der Fibrose im Myokard um den Faktor 3 im Vergleich zur Kontrolle (n=10) ($p < 0,05$). Atorvastatin (n=10) hatte keinen Effekt auf die Doxorubicin-induzierte Fibrose, welche ebenfalls um den Faktor 3 erhöht war ($p < 0,05$ vs. Kontrolle). Atorvastatin allein hatte keinen Effekt auf die Fibrosierung des Myokards im Vergleich zur Kontrolle (vgl. Abb. 17). Atorvastatin war nicht in der Lage, die Doxorubicin-induzierte Fibrose zu beeinflussen.

4.2.6 Echokardiographische Charakterisierung

Anthrazykline führen nicht selten zu einer klinisch relevanten Herzinsuffizienz, die beim Menschen echokardiographisch nachgewiesen werden kann. Die bisherigen Ergebnisse zeigten, dass Atorvastatin nicht in der Lage ist, die Doxorubicin-induzierte Apoptose, Fibrosierung und Radikalfreisetzung im Myokard zu reduzieren. Um die Effekte von Doxorubicin und Atorvastatin auf die systolische Funktion des linken Ventrikels (beschrieben durch die Verkürzungs- und Ejektionsfraktion) zu beschreiben, führten wir echokardiographische Untersuchungen an den Versuchstieren durch. Die Behandlung erfolgte nach eingangs beschriebenem Schema (vgl. 4.2).

Die Versuchstiere wurden zur Echokardiographie sediert (15 mg/kg KG Ketamin / 2 mg/kg KG Xylazin), um ausreichend gute Schallbedingungen sicherzustellen, jedoch nicht so tief, dass es zu einer relevanten Abnahme der Herzfrequenz kam. Die Sonographie erfolgte mit einem 13MHz-Schallkopf, mit dem die Verkürzungsfraktion (FS) und die linksventrikuläre Ejektionsfraktion (EF) als Maß für die systolische Funktion des Ventrikels bestimmt werden konnten. Die Versuchstiere wurden vor Behandlungsbeginn und am Beobachtungsende echokardiographisch untersucht.

Vor Versuchsbeginn zeigte sich kein Unterschied in der systolischen Funktion (weder bei der FS noch bei der EF) bei den Versuchstieren (n=32). So konnte eine, von den Versuchsbedingungen unabhängig bestehende, Herzinsuffizienz weitestgehend ausgeschlossen werden. Doxorubicin (n=8) reduzierte signifikant (p<0,05) die Verkürzungsfraction auf 20,1% und die Ejektionsfraction auf 41,3% im Vergleich zur Kontrolle (FS=26,8%, EF=53,1%) (n=8) und zu den Ausgangswerten der Versuchstiere. Atorvastatin (n=8) hatte keinen Einfluss auf die Doxorubicin-induzierte systolische Ventrikeleinschränkung (FS=26,8%). Unter der Kombination von Doxorubicin und Atorvastatin wurde die Verkürzungsfraction auf 20,4% und die Ejektionsfraction auf 41,5% im Vergleich zur Kontrolle und zu den Ausgangswerten der Versuchstiere signifikant (p<0,05) reduziert. Atorvastatin allein (n=8) hatte keinen Einfluss auf die systolische Ventrikelfunktion. Tabelle 15 zeigt die Ergebnisse der echokardiographischen Untersuchung.

Doxorubicin reduzierte die systolische Ventrikelfunktion signifikant. Dieser Effekt konnte durch Atorvastatin nicht beeinflusst werden.

Tabelle 15: Kardial funktionelle Charakterisierung der Versuchstiere (Echokardiographie)

	FS (%)		EF (%)	LVID,d (mm)	LVID,s (mm)	HR (1/min)
	Verkürzungsfraction					
	Vor Behandlung	Nach Behandlung	Ejektions- fraction	Links- ventrikulärer Innendurch- messer, diastolisch	Links- ventrikulärer Innendurch- messer, systolisch	Herzfrequenz
Kontrollen (n=8)						
MW	27,54	27,07	53,07	4,06	2,97	394
SEM	1,70	1,24	1,97	0,07	0,10	9,70
Doxorubicin (n=8)						
MW	27,91	20,08***	41,28***	4,25	3,39	390
SEM	1,94	1,21	2,14	0,04	0,06	23,27
Doxo+Atorva (n=8)						
MW	27,41	20,40***	41,44***	4,05	3,20	379
SEM	1,44	0,65	1,00	0,13	0,13	5,49
Atorvastatin (n=8)						
MW	25,67	26,79	52,59	4,08	2,99	385
SEM	1,31	1,28	2,00	0,07	0,09	8,83

* p<0,05 vs. Kontrolle, ** p<0,05 Nach vs. vor der Behandlung (EF_{vor Behandlung} hier nicht gezeigt)

4.2.7 Untersuchungen zur systolischen und diastolischen Ventrikelfunktion im Working Heart-Modell

Wir konnten bereits in der Echokardiographie die Doxorubicin-induzierte linksventrikuläre systolische Dysfunktion zeigen. Jedoch können diese Ergebnisse durch die Narkose und neurohumorale Einflüsse beeinflusst werden. Durch hämodynamische Messungen an isolierten Herzen durch das Working Heart-Modell können diese Einflüsseffekte ausgeschaltet und die Herzfunktion in Abhängigkeit von der Ventrikelfüllung charakterisiert werden. Das Working Heart-Modell stellt den Goldstandard zur Bestimmung der kardialen Leistungsfähigkeit im Rahmen von Tierversuchen dar. Die Tiere wurden nach dem Protokoll unter 4.2 behandelt und die Herzen nach dem Working Heart-Modell präpariert. Die Parameter wurden auf 10 mmHg für die Vorlast, 60 mmHg für die Nachlast und auf eine Herzfrequenz von 400/min. festgelegt. Über einen Katheter im linken Ventrikel wurde die Druck-Volumen-Beziehung abgeleitet. Von besonderer Bedeutung für die systolische Funktion sind folgende drei Parameter: das endsystolische Druck-Volumen-Verhältnis (ESPVR, Steigung Ees), das enddiastolische Druck-Volumen-Verhältnis (EDPVR, Steifigkeitskonstante β) und die linksventrikuläre Ejektionsfraktion. Diese wurden durch schrittweise Reduktion der Vorlast von 10 auf 0 mmHg oder alternativ durch Verschluss der Aorta untersucht. Darüber hinaus wurden die Ejektionsfraktion (EF), der kardiale Auswurf und die Relaxationskonstante tau (τ) als Maß für die diastolische Funktion bestimmt. Doxorubicin (n=6) führte zu einem signifikanten Anstieg der Steifigkeitskonstante auf $0,15 \pm 0,02$ mmHg/ml ($p < 0,05$). Sie betrug $0,08 \pm 0,01$ mmHg/ml bei der Kontrolle (n=5). Atorvastatin in Kombination mit Doxorubicin (n=5) reduzierte die Steifigkeitskonstante ebenfalls signifikant auf $0,13 \pm 0,02$ mmHg/ml ($p < 0,05$). Die Steigung Ees als Ausdruck der Änderung des endsystolischen Druck-Volumen-Verhältnisses bei Aortenokklusion fiel signifikant von $4,62 \pm 0,38$ mmHg/ μ l bei den Kontrollen auf $3,4 \pm 0,2$ mmHg/ μ l ($p < 0,05$). Atorvastatin und Doxorubicin (n=5) senkten diese auf $2,34 \pm 0,25$ mmHg/ μ l. Dies ist einerseits ein signifikanter Unterschied zur Kontrolle ($p < 0,01$), andererseits eine nochmals signifikante Verschlechterung zur alleinigen Doxorubicinbehandlung (vgl. Abb. 18).

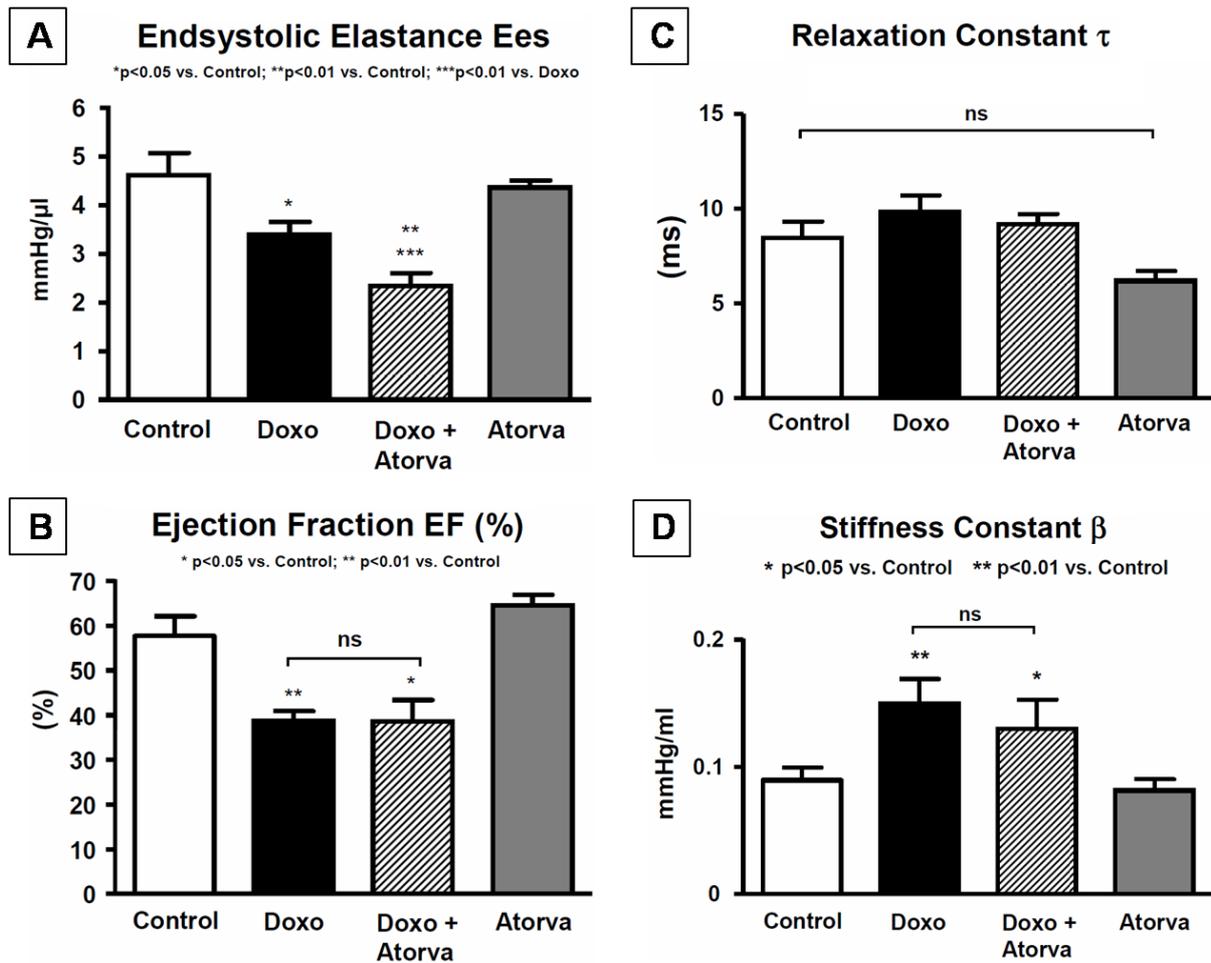


Abb. 18: Ergebnisübersicht der Working Heart-Versuche

A: Die endsystolische Druck-Volumen-Beziehung, beschrieben durch die Steigung Ees, wurde signifikant durch eine Behandlung mit Doxorubicin (n=6) im Vergleich zur Kontrolle (n=5) reduziert ($p < 0,05$). Atorvastatin allein (n=5) zeigte keinen signifikanten Effekt, in der Kombinationsbehandlung (n=5) mit Doxorubicin wurde die Ees signifikant zur Kontrolle und zur Doxorubicinbehandlung reduziert ($p < 0,01$).

B: Die linksventrikuläre Pumpfunktion (Ejektionsfraktion, EF) wurde durch Doxorubicin (n=5) signifikant gegenüber der Kontrolle (n=5) reduziert ($p < 0,05$). Atorvastatin (n=5) hatte keinen weiteren Einfluss auf die Ejektionsfraktion.

C: Die linksventrikuläre Relaxation (τ) wurde weder durch Doxorubicin (n=6), Atorvastatin (n=5) noch deren Kombination (n=5) signifikant beeinflusst.

D: Die enddiastolische Druck-Volumen-Beziehung (β) wurde durch Doxorubicin (n=6) gegenüber der Kontrolle (n=5) signifikant erhöht ($p < 0,05$). Atorvastatin (n=5) hatte auf diesen durch Doxorubicin hervorgerufenen Effekt keinen Einfluss.

Diese beiden Parameter waren eng mit der systolischen Funktion des Ventrikels assoziiert. Daher zeigte sich auch unter Doxorubicin (n=6) eine Reduktion der Ejektionsfraktion auf 38,7±1,45% (60,1±4,07% Kontrolle) (p<0,01). Die Kombination von Doxorubicin und Atorvastatin (n=5) reduzierte die Ejektionsfraktion ebenfalls signifikant auf 41,1±4,26% (p<0,01). Einen signifikanten Unterschied für die Ejektionsfraktion zwischen Doxorubicin allein und der Kombination mit Atorvastatin sahen wir nicht. Die Relaxationskonstante tau änderte sich unter Doxorubicin (9,84±1,35 ms) und der Kombination mit Atorvastatin (9,19±1,35 ms) im Vergleich zur Kontrolle (8,20±1,40 ms) nicht signifikant.

Atorvastatin allein (n=5) hatte weder auf die Steifigkeitskonstante, das endsystolische Druck-Volumenverhältnis (Ees) noch auf die Ejektionsfraktion und die Relaxationskonstante tau einen Effekt. Keine der Bedingungen (Doxorubicin, Doxorubicin + Atorvastatin, Atorvastatin) hatte im Vergleich zur Kontrolle einen signifikanten Effekt auf die maximalen und minimalen Druckänderungen über die Zeit (vgl. Tabelle 16).

Doxorubicin reduzierte die systolische Funktion signifikant. Atorvastatin konnte diesen Effekt nicht aufheben, sondern verschlechterte ihn gar partiell (Ees).

Tabelle 16: Ergebnisse im Working Heart-Modell

	HF	EDPVR	ESPVR	Tau	dp/dt	dp/dt	CO	EF
	1/min	β	Ees	ms	max.	min.	ml/min	%
	Herzfrequenz	enddiastolische Druck-Volumen- Beziehung β	endsystolische Druck-Volumen- Beziehung Ees	Zeitkonstante der Ventrikel- relaxation	Maximale Druckänderung über die Zeit	Minimale Druckänderung über die Zeit	Kardialer Auswurf	Ejektionsfraktion
Kontrollen								
MW	436	0,08	4,62	8,20	4609	-3346	9,44	60,1
SEM	1,2	0,01	0,38	1,40	516	212	0,85	4,07
Doxorubicin								
MW	424	0,15**	3,40*	9,84	4208	-3230	7,85	38,7**
SEM	18,6	0,02	0,20	1,35	520	241	0,59	1,45
Doxo+Atorva								
MW	407	0,13*	2,34 *****	9,19	4031	-3211	7,57	41,1**
SEM	42,0	0,02	0,25	0,59	395	149	0,44	4,26

* p<0,05 vs. Kontrolle, ** p<0,01 vs. Kontrolle, *** p<0,01 vs. Doxorubicin

$$\text{ESPVR } P(V) = E_{es} \times V + P_0$$

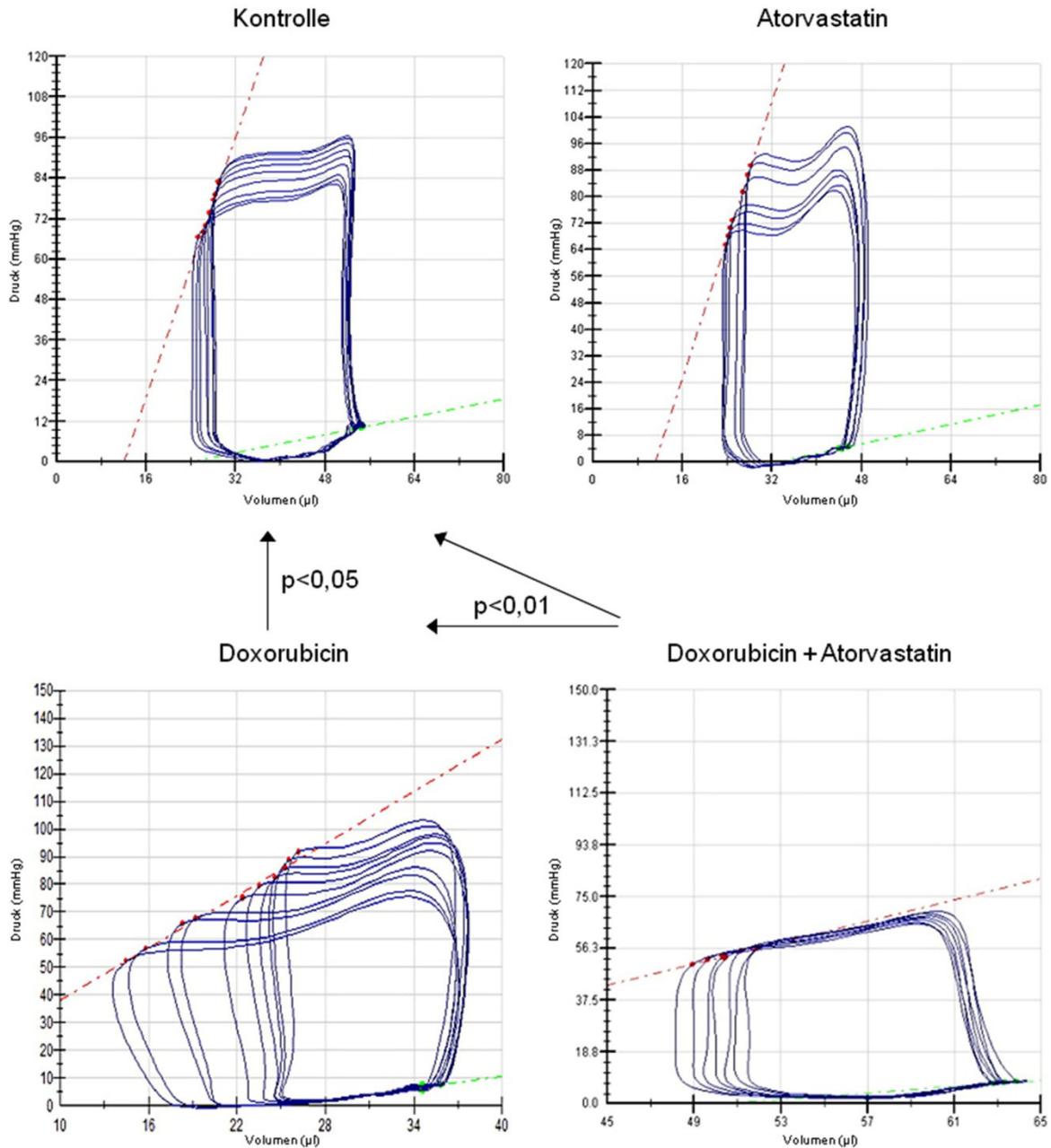


Abb. 19: Aorten-Okklusionsversuche im Working Heart-Modell

Die Abbildung zeigt die endsystolische Druck-Volumen-Beziehung, die als Steigung E_{es} berechnet wurde, als Maß für die systolische Ventrikelfunktion. Doxorubicin ($n=6$) führte im Vergleich zur Kontrolle ($n=5$) zu einer signifikanten Abnahme der Steigung ($p < 0,05$). Die Kombination von Doxorubicin und Atorvastatin ($n=5$) bedingte eine signifikante Abnahme im Vergleich zur Kontrolle ($p < 0,01$) und zur alleinigen Doxorubicinbehandlung ($p < 0,01$). Atorvastatin allein hatte keinen Effekt auf die Steigung E_{es} .

4.3 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die wesentlichen Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sind:

1) InVitro-Modell:

- Doxorubicin erhöhte die Apoptoseraten signifikant, die Kombination mit Atorvastatin verstärkte diesen Effekt in den Zellkulturversuchen nochmals signifikant.
- Pro- und Antiapoptotische Proteine (Bax, Bcl-2 und Cleaved-Caspase 3) wurden über unseren Beobachtungszeitraum nicht beeinflusst.
- Die Survivalfaktoren GATA4, GATA6 und Mef2c wurden durch Doxorubicin herunterreguliert.
- Atorvastatin konnte die Herunterregulation dosisabhängig teilweise beeinflussen, wobei steigende Konzentrationen über μM wieder zu einer Abnahme von GATA4 führten.

2) InVivo-Modell:

- Doxorubicin führte zu einer signifikanten Zunahme der Mortalität der Versuchstiere, die durch Atorvastatin nicht beeinflusst wurde.
- Sowohl Doxorubicin als auch die Kombination mit Atorvastatin führte zu einer signifikanten Zunahme der Apoptose und Fibrose im Myokard.
- Die Anthrazyklin-induzierte Erhöhung freier Sauerstoffradikale konnte in der Aorta signifikant reduziert werden, nicht jedoch im Myokard selbst.
- Doxorubicin und die Kombination mit Atorvastatin reduzierten die Verkürzungsfraction und die Ejektionsfraction (Echokardiographie) signifikant.
- Doxorubicin reduzierte im Working Heart die kardiale Kontraktilität (ESPVR Ees) signifikant.
- Die Kombination von Doxorubicin und Atorvastatin führte zu einer weiteren signifikanten Verschlechterung der kardialen Kontraktilität (ESPVR Ees).

5. Diskussion

Anthrazykline gehören zu den effektivsten verfügbaren Chemotherapeutika in der Behandlung hämatopoetischer und solider Tumoren. Ihre Einsatzmöglichkeit wird durch die Entwicklung einer durch sie induzierten Kardiomyopathie beschränkt. Die Mechanismen der antineoplastischen Wirkung über freie Sauerstoffradikale, DNA-Interkalierung/-Strangbrüche und vielfältige Aktivierungen von Apoptosewegen sind gut beschrieben (Minotti et al., 2004). Die NADPH-Oxidase und ihre gp91-Untereinheit bewirken die Freisetzung freier Sauerstoffradikale und sind so maßgeblich an der Entstehung der Anthrazyklin-induzierten Kardiomyopathie beteiligt (Wojnowski et al., 2005).

5.1 Bedeutung der Kombinationsbehandlung mit Doxorubicin und Atorvastatin im InVitro-Modell

5.1.1 Apoptose im InVitro-Modell

Doxorubicin ist ein starker Induktor der Apoptose in Kardiomyozyten. Wir konnten in unseren Versuchen, wie vorbeschrieben, eine signifikante Zunahme der Apoptoseraten in der TUNEL-Färbung (vgl. Abb. 8) und freier Histonmoleküle (vgl. Abb. 9) sehen (Minotti et al., 2004). Die Kombination mit Atorvastatin erhöhte die Apoptoseraten nochmals signifikant im Vergleich zur Monotherapie. Diese Ergebnisse konnten bei verschiedenen Atorvastatinkonzentrationen mit 3 μM Atorvastatin (vgl. Abb. 8) und 1 μM Atorvastatin (vgl. Abb. 9) gezeigt werden. Im Gegensatz dazu sahen wir im InVivo-Modell (2 mg/kg KG Atorvastatin) nach einer Behandlungszeit von 28 Tagen keine Unterschiede in den, im Vergleich zur Kontrolle, signifikant erhöhten Apoptoseraten unter Doxorubicin und der Kombination mit Atorvastatin (vgl. Abb. 13). Es kam zu diesem Zeitpunkt zu einer nicht signifikanten Abnahme der Apoptose unter der Kombinationsbehandlung im InVivo-Versuch.

Die Interpretation dieser Ergebnisse ist nicht unproblematisch. Unklar bleibt, ob die Konzentrationen, die im InVitro- und im InVivo-Modell effektiv in Kardiomyozyten erreicht werden, vergleichbar sind. Darüber hinaus handelt es sich um zwei unterschiedliche Beobachtungszeitpunkte, die Momentaufnahmen der aktuell in

Apoptose befindlichen Kardiomyozyten zeigen. So könnte Atorvastatin in der Kombination mit Doxorubicin die Apoptoseraten zu Beginn der Behandlung signifikant erhöhen, im Verlauf ohne direkten Einfluss des Doxorubicins diese jedoch reduzieren. Wir können jedoch keine eindeutige Reduktion der Apoptoseraten der Kardiomyozyten durch die Kombinationsbehandlung zeigen.

5.1.2 Bedeutung intrinsischer Apoptosepathways

Doxorubicin vermittelt über multiple Wege die Kardiotoxizität. Die Induktion von p53 durch freie Sauerstoffradikale und die daraus folgende vermehrte Transkription von Bax führt letztlich über das Caspase-System zur Apoptose (Minotti et al., 2004). Die Inhibierung von Bad durch Phosphorylierung kann die Apoptoseinduktion erfolgreich reduzieren (Negoro et al., 2001, Wu et al., 2000). Wir sehen unter Doxorubicin und der Kombination mit Atorvastatin nach 24 Stunden (18 Stunden Doxo) keine Beeinflussung der Bax-, Bcl-2 und Cleaved Caspase 3-Konzentrationen (vgl. Abb. 10). In der Literatur finden sich unterschiedliche Behandlungsregime, so wurde bei Negoro et al. (Negoro et al., 2001) für 16 Stunden mit 0,5µM Doxorubicin (nach 12 Stunden im Hungermedium) und bei Wu et al. (Wu et al., 2000) mit 0,4 µM Doxorubicin über 6 Stunden behandelt. Wir behandelten über 18 Stunden mit 1µM Doxorubicin, nachdem die Zellen 18 Stunden im Hungermedium inkubiert worden waren. Negoro et al. (Negoro et al., 2001) zeigten, wie wir auch, eine unbeeinflusste Expression von Bcl-2 unter Doxorubicin. Die Herunterregulierung von Bcl-xL war mit einer Aktivierung des Caspase-Systems vergesellschaftet. Die Unterschiede in den Inkubationszeiten und Doxorubicinkonzentrationen sowie die Betrachtung von Bcl-xL einerseits und Bax andererseits könnten die Unterschiede der Ergebnisse erklären.

5.1.3 Bedeutung von Survivalpathways

Gata4 und Gata6 sind entscheidende Transkriptionsfaktoren der Kardiomyozyten und aktivieren synergistisch herzspezifische Gene. Ihre immense Bedeutung für die kardiomyozytäre Differenzierung (Merika et al., 1993) und als Survivalfaktoren (Kobayashi et al., 2006, Wright et al., 2008) wurde in mehreren Studien gezeigt. Doxorubicin führt über eine vermehrte Degradation der Gata4-mRNA durch eine Erhöhung der freien Sauerstoffradikale zu dessen Reduktion und trägt so zur

Apoptoseinduktion bei (Kim et al., 2003). Eine Überexpression von Gata4 oder Gata6 konnte in Versuchen die kardiotoxischen Effekte von Doxorubicin abschwächen (Aries et al., 2004).

Der Myocyte enhancer factor 2 (Mef2c) wirkt synergistisch zu Gata4 und Gata6 auf die Genexpression und Differenzierung in Kardiomyozyten. Zielgene sind α MHC, ANF, Troponine und Desmin. Der Synergismus wird durch eine Interaktion zwischen der DNA-Bindungsdomäne von MEF2, der Zinkfinger-Domäne von Gata4 und den aktivierenden Domänen beider erklärt (Morin et al., 2000).

In unseren Versuchen wurde die Expression von Gata4/6 und Mef2c in Abhängigkeit von Doxorubicin und unterschiedlicher Atorvastatinkonzentrationen in der RealTime PCR untersucht. Es zeigte sich unter Doxorubicin die erwartete Reduktion aller drei Proteine nach zwölf Stunden Behandlung. Atorvastatin hatte keinen Einfluss auf Gata6 und MEF2c. Unter einer steigenden Konzentration von 0,01 bis 1 μ mol/l Atorvastatin kam es zu einem nicht signifikanten Anstieg der Expression von Gata4. Bei einer Konzentration von 10 μ mol/l Atorvastatin kehrte sich dieser Effekt jedoch um und es kam zu einem Abfall der Gata4-Konzentration.

Planavila et al. (Planavila et al., 2008) konnten zeigen, dass eine Konzentration von 5 μ mol/l Atorvastatin vor TNF α -induziertem Hypertrophiestimulus in neonatalen Kardiomyozyten die Phosphorylierung von AKT/GSK-3 β verhindert. Die Hemmung der GSK-3 β durch TNF α führt zu einem Anstieg der Gata4 -Expression. Atorvastatin verhindert die Hemmung der GSK-3 β und eine folgende Erhöhung der Gata4-Expression. Im Modell der maladaptiven Hypertrophie ist dies ein gewünschter Effekt. In unserem Modell könnte so der Abfall der Gata4-Expression unter 10 μ mol/l Atorvastatin erklärt werden. Hohe Atorvastatinkonzentrationen könnten adaptive Prozesse und Survivalstrategien der Kardiomyozyten verhindern. Niedrigere Dosierungen von Atorvastatin haben unter Umständen keinen Einfluss auf die Hemmung der GSK-3 β , sondern könnten über eine Modulation der freien Sauerstoffradikale die leichte Expressionszunahme vermitteln.

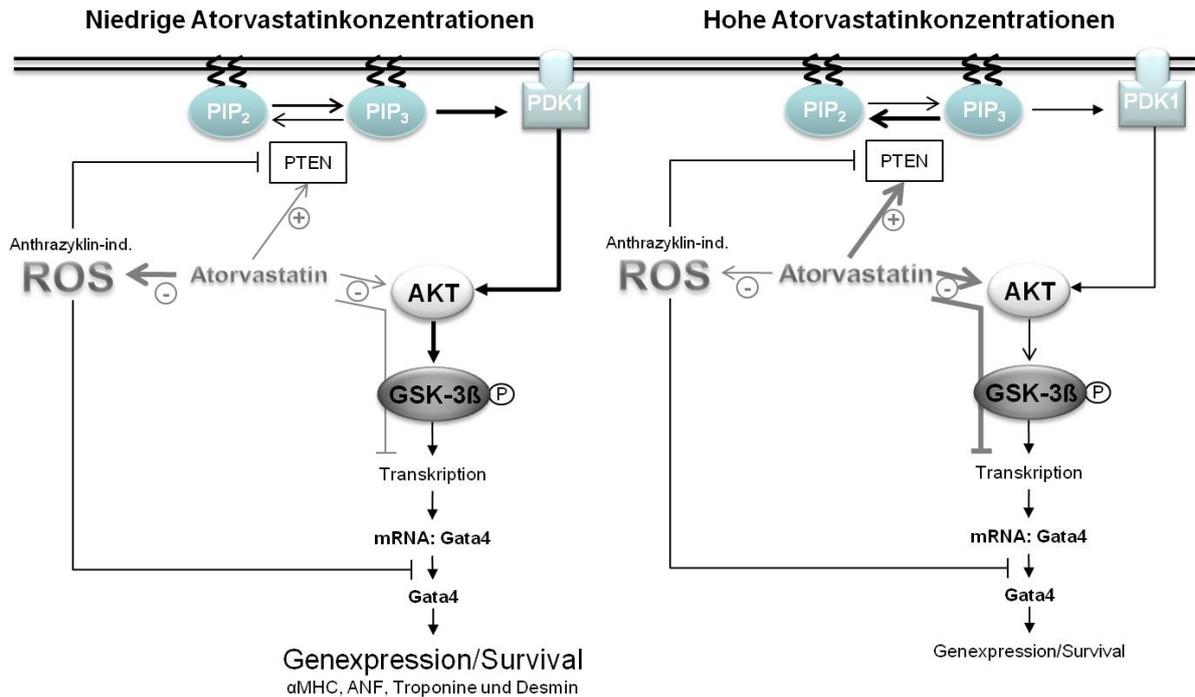


Abb. 20: Einfluss der Statine auf die Survivalpathways

Die Abbildung gibt einen schematischen Überblick über die biochemischen Pathways in Bezug auf die Survivalfaktoren und die folgende Genexpression. Das Verhältnis zwischen PIP₂ und PIP₃ ist abhängig von der PI3K und PTEN. Über die PI3K werden Signale über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren wie den TNF α -Rezeptor vermittelt. Sie bewirken eine Verschiebung zu Gunsten von PIP₃ und führen über die PDK1 zur Aktivierung der AKT. AKT hemmt durch Phosphorylierung an Ser9 die GSK-3 β . So entfällt die Hemmung wichtiger Transkriptionsfaktoren wie Gata4. PTEN reguliert den PI3K/Akt-Pathway herunter, kann jedoch durch oxidativen Stress (z. B. Anthrazyklin-induziert) inaktiviert werden. Atorvastatin schützt PTEN vor der Deaktivierung durch ROS, führt jedoch bei chronischer Exposition mit freien Sauerstoffradikalen zur Konzentrationserhöhung von PTEN.

In niedrigen Dosierungen könnte die Hemmung der Transkription über den PI3K/Akt-Pathway weniger ausgeprägt sein, die Reduktion der ROS den Anstieg der Gata4-Konzentrationen erklären. In höheren Atorvastatinkonzentrationen überwiegt die Hemmung der Transkription über den PI3K/Akt-Pathway gegenüber der ROS-Reduktion; Survivalfaktoren wie Gata4 werden reduziert.

Akt = protein kinase B, GSK-3 β = glycogen synthase kinase-3 β , PDK1 = 3-phosphoinositide-dependent protein kinase, ANF = atrial natriuretic peptide, α MHC = alpha-myosin heavy chain, PIP₂ = Phosphatidylinositol bisphosphate, PIP₃ = Phosphatidylinositol triphosphate, ROS = reactive oxygen species, PI3K = phosphoinositide-3 kinase.

5.2 Bedeutung der Kombinationsbehandlung mit Doxorubicin und Atorvastatin im InVivo-Modell

Doxorubicin und die Kombination mit Atorvastatin reduziert die Überlebensraten (vgl. Abb. 13) und das Herzgewicht (vgl. Tabelle 14) der Mäuse signifikant im Vergleich zur Kontrolle. Weder die Apoptoseraten (vgl. Abb. 13) noch die Myokardfibrosierung (vgl. Abb. 17) können durch die Kombination aus Doxorubicin und Atorvastatin im Vergleich zur Doxorubicinmonotherapie reduziert werden. Erklärungsmodelle können die Effekte der freien Sauerstoffradikale und die Abnahme der systolischen Funktion liefern.

5.2.1 Bedeutung der freien Sauerstoffradikale

Zu Beginn formulierten wir die Hypothese, Statine könnten die Doxorubicin-induzierte Produktion freier Sauerstoffradikale über die Blockierung der NADPH-Oxidase reduzieren. Die gp91-Untereinheit ist für die Funktion des Enzymkomplexes in der Zellmembran von entscheidender Rolle. C57/Bl6-Knock-out-Mäuse für das Gen der gp91-Untereinheit waren gegenüber der Anthrazyklin-induzierten Kardiomyopathie resistent und zeigten keine Einschränkung der Ventrikelfunktion im Vergleich zu den Kontrolltieren (Wojnowski et al., 2005). Die Aktivität der NADPH-Oxidase in einer Zelle und die damit verbundene Radikalbildung sind direkt proportional zur Expression der gp91-Untereinheit. Angiotensin II erhöht die Expression von gp91 und das Risiko einer Herzinsuffizienz (Cifuentes et al., 2000). So wurden die NADPH-Oxidase und ihre korrekte Lokalisation als wichtiger Effektor der Anthrazyklin-induzierten Kardiomyopathie identifiziert.

Statine verhindern die Geranyl-Geranylisierung der GTPase Rac1, welches obligat für die korrekte Anlagerung der aktivierenden Untereinheiten p47phox und p67phox an den Enzymkomplex der NADPH-Oxidase in der Plasmamembran ist. Dies führt im Tiermodell zu einer Reduktion der Entwicklung einer Herzinsuffizienz.

Doxorubicin steigert die NADPH-Oxidase-Aktivität. Atorvastatin konnte diese Aktivität, wie in anderen Modellen gezeigt (Maack et al., 2003), nicht reduzieren (vgl. Abb. 15). Es ist nicht auszuschließen, dass die relativ niedrige Konzentration von Atorvastatin nicht ausreicht, um einen entsprechenden Effekt im Myokard zu

generieren. Jedoch unterstellt die effektive Hemmung der Freisetzung freier Sauerstoffradikale durch Atorvastatin in der gleichen Spezies im aortalen Gewebe eine effektive Konzentration des Pharmakons (vgl. Abb. 16).

Daher müssen alternative Mechanismen oder andere Grundvoraussetzungen zur Radikalbildung im Herzmuskel und den Gefäßen vorliegen. Doxorubicin könnte über andere Oxidations-/Reduktionssysteme (Xanthin-Dehydrogenasen, endotheliale Stickstoffoxid-Synthetasen) (Kim et al., 2002, Minotti et al., 1999, Minotti et al., 2004) oder durch Herabregulierung antioxidativer Enzyme in Myozyten (Minotti et al., 2004) die Eskalation freier Sauerstoffradikale vermitteln.

Die NADPH-Oxidase ist ein wichtiges Enzym zur Vermittlung der Anthrazyklin-vermittelten ROS-Produktion, jedoch könnten unter der Kombinationsbehandlung mit Statinen alternative Wege der Radikalbildung und andere Radikal-unabhängige Effekte überwiegen.

5.2.2 Bedeutung der Kombinationsbehandlung für die Myokardfunktion

Die Compliance und die linksventrikuläre systolische Pumpfunktion der Herzen verschlechterten sich bei den mit Doxorubicin behandelten Mäusen signifikant. Unsere Hypothese, dass Atorvastatin diese unerwünschten kardialen Wirkungen antagonisieren könnte, konnten wir jedoch ebenfalls nicht bestätigen.

Doxorubicin-behandelte Mäuse zeigten eine deutliche Abnahme der kardialen systolischen und diastolischen Funktion im Vergleich zu den Kontrolltieren in der echokardiographischen Untersuchung. So wurde die Verkürzungsfraction von 29,07% bei den Kontrollen um ca. 7% auf 20,08% unter Doxorubicin und 20,4% unter Doxorubicin/Atorvastatin signifikant reduziert ($p < 0,05$; vgl. Tabelle 15).

Mit einer zweiten Methode zur Messung der systolischen Funktion - dem Working Heart - konnten diese Ergebnisse bestätigt werden. Die endsystolische Druckvolumenbeziehung, charakterisiert durch die Steigung Ees (Maß für die kardiale Kontraktilität), sank signifikant ($p < 0,05$) von 4,62 mmHg/ μ l bei den Kontrolltieren auf 3,40 mmHg/ μ l unter Doxorubicin. Die Kombination von Doxorubicin und Atorvastatin (2,34 mmHg/ μ l) führte zu einer signifikanten Reduktion gegenüber der Kontrolle ($p < 0,01$) und gegenüber der Doxorubicinbehandlung ($p < 0,01$). Die endsystolische Druck-Volumen-Beziehung ist aktueller Goldstandard zur

Charakterisierung der systolischen Funktion der Herzen und impliziert somit eine klinische Relevanz der Ergebnisse. Die linksventrikuläre Compliance, charakterisiert durch die Steifigkeitskonstante β , verschlechterte sich ebenfalls signifikant gegenüber der Kontrolle (vgl. Tabelle 16).

Eine Hauptidee dieser Arbeit ist die Feststellung, dass Atorvastatin der Verschlechterung der Pumpfunktion des Herzens unter Anthrazyklinen nicht entgegenwirken kann. Die Kombinationsbehandlung verschlechtert die systolische Funktion sogar noch einmal signifikant im Vergleich zur Doxorubicin-Monotherapie in den Working Heart-Versuchen. Maladaptive Prozesse unter einer Statinbehandlung im Myokard könnten diese Ergebnisse erklären.

5.3 Maladaptive Prozesse im Myokard als Erklärungsmodell für die Verschlechterung der systolischen Funktion unter der Kombinationsbehandlung

Es existieren verschiedene Hinweise auf eine mögliche Vermittlung maladaptiver Prozesse durch Statine. Statine hemmen die Biosynthese von Coenzym Q₁₀, welches in der Elektronentransportkette eingebunden ist. Diese kann effektiv vor oxidativem Stress durch freie Radikale schützen und führt Tocopherol (Vitamin E) und Ascorbinsäure (Vitamin C) in ihre aktiven Formen zurück (Marcoff et al., 2007). Statine blockieren die Produktion von Farnesylpyrophosphat, einem wichtigen Zwischenprodukt in der Synthese von Coenzym Q₁₀. Es ist beschrieben, dass Chemotherapeutika in Tumorzelllinien eine deutliche Erhöhung von Coenzym Q₁₀ induzieren, um dem oxidativen Stress durch freie Sauerstoffradikale entgegenzuwirken (Brea-Calvo et al., 2006). Darüber hinaus wird die wichtige Rolle dieses Coenzym in der mitochondrialen Energiegewinnung und der Muskelfunktion als Auslöser der Statin-induzierten Myopathie diskutiert (Littarru et al., 2007). Die Kombination aus der Statin-abhängigen Hemmung der Coenzym Q₁₀-Synthese und der Doxorubicin-vermittelten Produktion freier Sauerstoffradikale könnte den ungünstigen Effekt auf die myokardiale Funktion erklären.

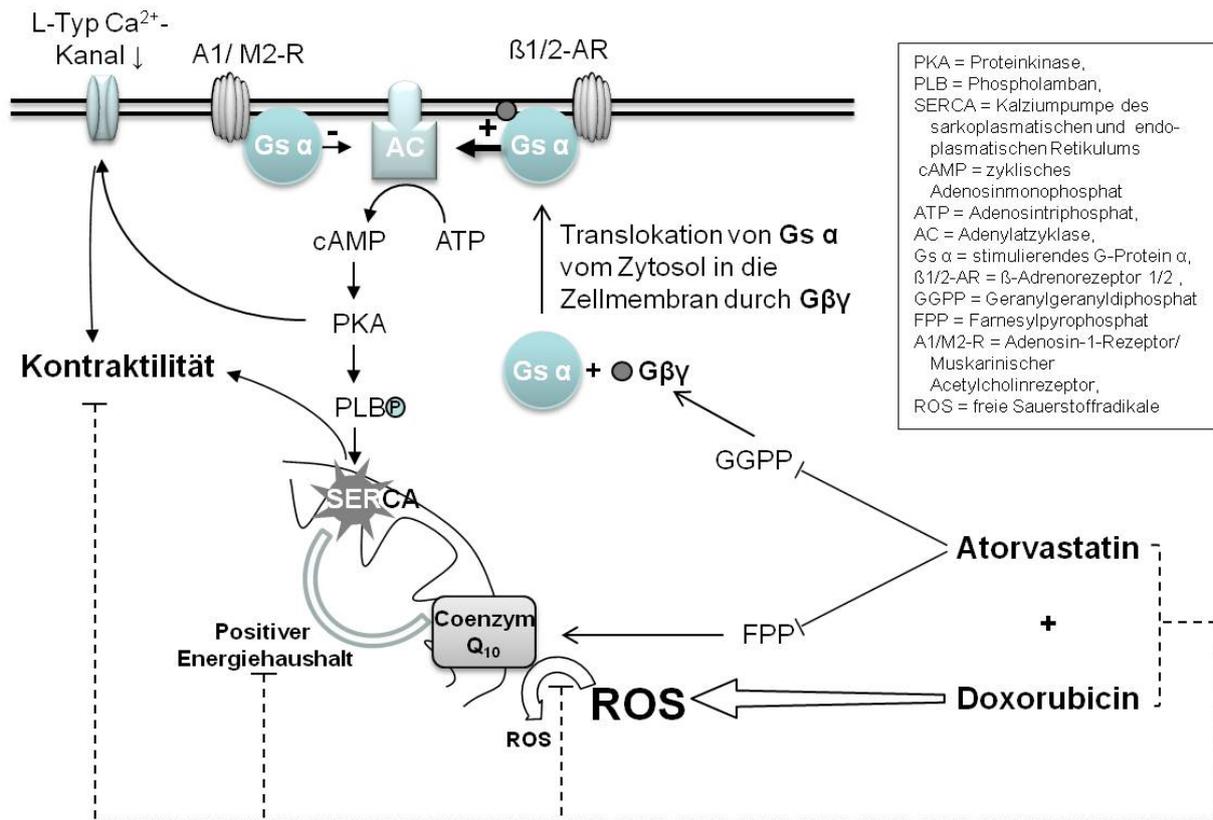


Abb. 21: Einfluss der Statine über $\text{Gs } \alpha$ auf die myokardiale Kontraktilität

Abb. 21 zeigt eine schematische Darstellung der theoretischen Überlegungen zu den Effekten, die unter der Kombinationstherapie von Doxorubicin und Atorvastatin im Vergleich zur Monotherapie die signifikante Verschlechterung der systolischen Funktion erklären könnten. Atorvastatin verhindert die ausreichende Translokation der Untereinheiten des G-Proteins in die Plasmamembran und verhindert so die adrenerg vermittelte Steigerung der Chronotropie, Dromotropie, Inotropie und Senkung der Bathmotropie. Dies funktioniert über die Auskopplung der Effektoren über die cAMP-Downstream-Aktivierung. Doxorubicin führt zu einer Steigerung der Konzentration freier Sauerstoffradikale und zur Störung der Eisen- und Kalziumhomöostase sowie des Energiehaushaltes der Myozyten. Statine können die Produktion freier Sauerstoffradikale durch Steigerung der NADPH-Oxidase-Aktivität nicht effektiv verhindern. Sie reduzieren ebenfalls die Aktivität des Coenzym Q₁₀, welches eine bedeutende Rolle im Abbau der Anthrazyklin-induzierten Produktion freier Sauerstoffradikale spielt. Diese synergistischen Effekte auf die Reduktion der Kontraktilität könnten die Ergebnisse in unserem Modell erklären.

Ein weiterer, unter Umständen relevanter Mechanismus ist die Reduktion der Isoprenylierung monomerer GTPasen durch Statine. Die Isoprenylierung erfolgt durch Farnesylpyrophosphat (FPP) oder Geranylgeranylpyrophosphat (GGPP), beides Zwischenprodukte in der Cholesterinbiosynthese. Sie fungieren als lipophile

Membrananker und geben Proteinen in der posttranslationalen Modifikation ihre Funktion. Die $G\gamma$ -Untereinheit des Adenylatzyklase-regulierenden G-Proteins ($G\alpha/G\beta/G\gamma$) wird durch Atorvastatin nicht mit dem notwendigen Membrananker versehen, sondern akkumuliert im Zytosol.

Der β -adrenerge Reiz wird nicht adäquat in eine zelluläre Antwort umgewandelt, da das zwischen dem Rezeptor und der Adenylatzyklase vermittelnde G-Protein nicht in der Plasmamembran verankert werden kann. Die Erhöhung des cAMP durch die Adenylatzyklase und die Downstream zu erwartende Erhöhung der Kontraktilität über Proteinkinase A, Phospholamban und SERCA ist folglich deutlich reduziert (Muhlhauser et al., 2006). So könnten sich Störungen des Energiehaushaltes und der Kontraktilität der Myozyten durch Doxorubicin-vermittelte Effekte (Minotti et al., 2004) und ein inadäquates Ansprechen auf adrenerge Reize durch Statine (Muhlhauser et al., 2006) gegenseitig potenzieren. Hiermit lässt sich ein theoretisches Modell ableiten, durch das sich die schlechtere systolische Funktion der Herzen unter der Kombinationstherapie von Doxorubicin und Atorvastatin gegenüber der Doxorubicinmonotherapie erklären lassen könnte.

5.4 Vergleich zu anderen Ergebnissen

Unsere Ergebnisse stehen in deutlichem Gegensatz zu einer Studie der Forschergruppe um Riad (Riad et al., 2009). In deren Versuchsaufbau zeigte sich eine deutliche Verbesserung der kardialen Funktion unter der Kombinationstherapie mit Anthrazyklinen und Fluvastatin (100 mg/kg Körpergewicht/Tag). Darüber hinaus reduzierte Fluvastatin die Apoptose, die Aktivierung der Effektoren des inflammatorischen Signaltransduktionsweges und die Produktion freier Sauerstoffradikale. Es zeigten sich in einigen Punkten gravierende Unterschiede zu unserem Modell der Anthrazyklin-induzierten Herzmuskelschädigung. Wir applizierten Doxorubicin in einer Gesamtdosis von 20 mg/kg Körpergewicht durch zwei intraperitoneale Injektionen mit einem Abstand von sechs Tagen. Im Gegensatz dazu wurde bei Riad et al. (2009) die Dosis in einer einzigen Gabe appliziert. Die Aufteilung in zwei Einzelgaben entspricht dem klinischen Alltag jedoch deutlich besser, senkt die Plasmaspitzendosen und führt zu einer längerdauernden „Einwirkzeit“ von Doxorubicin. Des Weiteren entspricht die Gesamtdosis der Statine

von 100 mg/kg Körpergewicht bei Riad et al. (2009) einer Dosis, die deutlich überphysiologisch ist, und die resultierenden Plasmaspiegel können in menschlichen Individuen kaum erreicht werden. Ein 70 kg schwerer Mann müsste 7000 mg Fluvastatin pro Tag einnehmen. Zwar bleibt es schwierig, Medikamentenkonzentrationen zwischen zwei verschiedenen Spezies zu vergleichen, jedoch bewies eine bereits zehnfach niedrigere Konzentration von Fluvastatin die Effektivität zur Verhinderung einer Herzinsuffizienz nach einem stattgehabten Myokardinfarkt (Hayashidani et al., 2002). Auch wurde bei Riad et al. (2009) die Charakterisierung des kardialen Phänotyps bereits fünf Tage nach Applikation der Anthrazykline durchgeführt. Unter Umständen war dieser Zeitpunkt zu früh, um das Ausmaß der gesamten Kardiotoxizität erfassen zu können. Zur Bestimmung der systolischen linksventrikulären Funktion wurden die Tiere mit 125 mg/kg Thiopental narkotisiert und nach Sternotomie ein Millar-Katheter linksventrikulär positioniert. Diese Thiopentaldosis entspricht der LD₅₀ für Mäuse und reduziert die Herzfrequenz signifikant. Die Herzfrequenzen variierten von 241±38/min. unter Doxorubicin bis 294±28/min. bei den Kontrolltieren (Riad et al., 2009). Die linksventrikuläre Funktion ist bei Mäusen von einer physiologischen Herzfrequenz (500-600/min.) abhängig. Eine Bradykardisierung führt zur Abnahme der linksventrikulären Funktion. Daher ist die Verwendung der bradykardisierenden Anästhesie mit Thiopental trotz vorhandener besserer Alternativen nicht nachvollziehbar (Feldman et al., 2000). Die in vorliegender Arbeit gezeigten Marker der linksventrikulären Funktion (EF/FS) wurden bei deutlich physiologischeren Herzfrequenzen um 400/min. gemessen. Wir sind davon überzeugt, dass unsere Untersuchungen die klinische und physiologische Situation besser und relevanter widerspiegeln. Die von uns verwendeten Dosen von Atorvastatin sind pharmakologisch relevanter und zu vergleichen mit denen in der Therapie beim Menschen.

5.5 Zusammenfassung und Ausblick

Eine pharmakologisch relevante Konzentration von Atorvastatin schützt nicht vor der Doxorubicin-induzierten Kardiomyopathie, sondern verschlechtert die systolische Pumpfunktion des Herzens zusätzlich signifikant. Solange keine klinischen Daten zu den Effekten der Statine unter einer Chemotherapie existieren, kann ein potentiell ungünstiger Effekt oder ein etwaiger Nutzen nicht sicher abgeschätzt werden.

Statine gehören zu den weltweit meist verschriebenen und eingenommenen Medikamenten. Atorvastatin ist das weltweit am häufigsten verkaufte Medikament (finanzen.net, 2009). Statine haben ihre Effektivität zur Reduktion kardiovaskulärer Ereignisse in klinischen Studien gezeigt. Die primäre Indikation der Statine ist die Senkung des LDL-Cholesterins. Darüber hinaus werden Statine auch zur Primärprävention eines Infarktes bei einem Diabetes mellitus Typ 2 oder zur Sekundärprophylaxe nach Herzinfarkt eingesetzt. Ziel dabei ist es, das LDL auf Werte unter 100 mg/dl oder bei Hochrisikokonstellation (Framingham Score: 20% Wahrscheinlichkeit für Morbidität und Mortalität) gar unter 70 mg/dl zu bringen. Hierbei spielen auch die pleiotropen Effekte der Statine eine besondere Rolle, die zu einer Plaquestabilisierung führen. Die Indikation zum Beginn einer Statintherapie bei laufender Chemotherapie mit Doxorubicin sollte kritisch hinterfragt werden und mögliche Risiken im Sinne einer Verschlechterung der linksventrikulären systolischen Funktion in die Überlegungen mit einbezogen werden.

Ebenfalls unklar bleibt, ob eine bereits etablierte Statintherapie aufgrund eines Myokardinfarktes oder einer Hypercholesterinämie in Kombination mit anderen kardiovaskulären Risikofaktoren beim Beginn eines Chemotherapieregimes mit Anthrazyklinen abgesetzt werden sollte. Das Absetzen von Statinen nach einer zerebralen Ischämie erhöhte die Letalität in den darauffolgenden 90 Tagen signifikant, so dass in diesem Szenario das Absetzen von Statinen kontraindiziert ist (Blanco et al., 2007). Analoges wurde für Patienten in der Postmyokardinfarktphase gezeigt. Das Absetzen eines Statins nach einem akuten kardiovaskulären Ereignis führt zu „Entzugseffekten“ mit erhöhter Mortalität und erhöhter Wahrscheinlichkeit für ein weiteres Ereignis (Endres et al., 2006, Laufs et al., 2008). Die Empfehlungen zur Weiterführung der Statintherapie bei der Entwicklung einer Herzinsuffizienz sind nicht einheitlich. Neuere Studien liefern Hinweise für eine Verschlechterung der Herzinsuffizienz unter Weiterführung der Statintherapie (Clearfield, 2009, Jackson, 2008, Kjekshus et al., 2007). Ob diese Effekte klassentypisch für Statine sind oder nur für die Prüfsubstanz Rosuvastatin Gültigkeit hat, ist unklar. Studien, die diese strittigen Fragen zu klären vermögen, fehlen bislang.

Retrospektive Auswertungen publizierter Studien könnten Hinweise auf die möglichen klinischen Konsequenzen geben und dabei helfen, kontrollierte randomisierte Studien zur Sicherheit der Kombinationsbehandlung mit

Anthrazyklinen und Statinen zu planen. Die Endpunkte müssten streng und eng gewählt werden, um einen möglichen Schaden der Kombinationsbehandlung frühzeitig zu erkennen und das Risiko für die Studienteilnehmer zu reduzieren.

Auch wenn in dieser Arbeit signifikante Verschlechterungen der systolischen Funktion, der Apoptoseraten und Myokardfibrosierung unter Anthrazyklinen/Statinen gezeigt wurden, sind die klinische Relevanz und der Umgang mit der Frage des Absetzens von Statinen zu Beginn einer Chemotherapie unklar. Es ist zu hoffen, dass zukünftige Studien Klarheit zu dieser Fragestellung schaffen können.

6. Literaturverzeichnis

1. Adams J (2003) Potential for proteasome inhibition in the treatment of cancer. *Drug Discov Today* 8:307-315
2. Aries A, Paradis P, Lefebvre C, Schwartz RJ, Nemer M (2004) Essential role of GATA-4 in cell survival and drug-induced cardiotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:6975-6980
3. Belch JJ, Bridges AB, Scott N, Chopra M (1991) Oxygen free radicals and congestive heart failure. *Br Heart J* 65:245-248
4. Berger D, Engelhardt M, Mertelsmann R (2008) *Das Blaue Buch 2007-2008 – Chemotherapie-Manual Hämatologie und internistische Onkologie.*
5. Bergmann MW, Rechner C, Freund C, Baurand A, El Jamali A, Dietz R (2004) Statins inhibit reoxygenation-induced cardiomyocyte apoptosis: role for glycogen synthase kinase 3beta and transcription factor beta-catenin. *J Mol Cell Cardiol* 37:681-690
6. Binaschi M, Bigioni M, Cipollone A, Rossi C, Goso C, Maggi CA, Capranico G, Animati F (2001) Anthracyclines: selected new developments. *Curr Med Chem Anticancer Agents* 1:113-130
7. Blanco-Colio LM, Justo P, Daehn I, Lorz C, Ortiz A, Egido J (2003) Bcl-xL overexpression protects from apoptosis induced by HMG-CoA reductase inhibitors in murine tubular cells. *Kidney Int* 64:181-191
8. Blanco-Colio LM, Villa A, Ortego M, Hernandez-Presa MA, Pascual A, Plaza JJ, Egido J (2002) 3-Hydroxy-3-methyl-glutaryl coenzyme A reductase inhibitors, atorvastatin and simvastatin, induce apoptosis of vascular smooth muscle cells by downregulation of Bcl-2 expression and Rho A prenylation. *Atherosclerosis* 161:17-26
9. Blanco M, Nombela F, Castellanos M, Rodriguez-Yanez M, Garcia-Gil M, Leira R, Lizasoain I, Serena J, Vivancos J, Moro MA, Davalos A, Castillo J (2007) Statin treatment withdrawal in ischemic stroke: a controlled randomized study. *Neurology* 69:904-910

10. Brea-Calvo G, Rodriguez-Hernandez A, Fernandez-Ayala DJ, Navas P, Sanchez-Alcazar JA (2006) Chemotherapy induces an increase in coenzyme Q10 levels in cancer cell lines. *Free Radic Biol Med* 40:1293-1302
11. Burke BE, Olson RD, Cusack BJ, Gambliel HA, Dillmann WH (2003) Anthracycline cardiotoxicity in transgenic mice overexpressing SR Ca²⁺-ATPase. *Biochem Biophys Res Commun* 303:504-507
12. Bustin SA (2000) Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* 25:169-193
13. Cardinale D, Colombo A, Lamantia G, Colombo N, Civelli M, De Giacomo G, Rubino M, Veglia F, Fiorentini C, Cipolla CM (2010) Anthracycline-induced cardiomyopathy: clinical relevance and response to pharmacologic therapy. *J Am Coll Cardiol* 55:213-220
14. Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156-159
15. Chu EC, Tarnawski AS (2004) PTEN regulatory functions in tumor suppression and cell biology. *Med Sci Monit* 10:RA235-241
16. Cifuentes ME, Rey FE, Carretero OA, Pagano PJ (2000) Upregulation of p67(phox) and gp91(phox) in aortas from angiotensin II-infused mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 279:H2234-2240
17. Clearfield M (2009) Rosuvastatin in older patients with systolic heart failure. *Curr Atheroscler Rep* 11:5-6, 8
18. Clementi ME, Giardina B, Di Stasio E, Mordente A, Misiti F (2003) Doxorubicin-derived metabolites induce release of cytochrome C and inhibition of respiration on cardiac isolated mitochondria. *Anticancer Res* 23:2445-2450
19. Darzynkiewicz Z, Bruno S, Del Bino G, Gorczyca W, Hotz MA, Lassota P, Traganos F (1992) Features of apoptotic cells measured by flow cytometry. *Cytometry* 13:795-808

20. Daugas E, Susin SA, Zamzami N, Ferri KF, Irinopoulou T, Larochette N, Prevost MC, Leber B, Andrews D, Penninger J, Kroemer G (2000) Mitochondrio-nuclear translocation of AIF in apoptosis and necrosis. *FASEB J* 14:729-739
21. Demyanets S, Kaun C, Pfaffenberger S, Hohensinner PJ, Rega G, Pammer J, Maurer G, Huber K, Wojta J (2006) Hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitors induce apoptosis in human cardiac myocytes in vitro. *Biochem Pharmacol* 71:1324-1330
22. Dhalla NS, Temsah RM, Netticadan T (2000) Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. *J Hypertens* 18:655-673
23. Diekmann D, Abo A, Johnston C, Segal AW, Hall A (1994) Interaction of Rac with p67phox and regulation of phagocytic NADPH oxidase activity. *Science* 265:531-533
24. Dimitroulakos J, Thai S, Wasfy GH, Hedley DW, Minden MD, Penn LZ (2000) Lovastatin induces a pronounced differentiation response in acute myeloid leukemias. *Leuk Lymphoma* 40:167-178
25. Doroshov J (1995) Role of reactive-oxygen metabolism in the cardiac toxicity of the anthracycline antibiotics. *Anthracycline Antibiotics: New Analogues, Methods of Delivery and Mechanism of Action*:18
26. Dowd NP, Scully M, Adderley SR, Cunningham AJ, Fitzgerald DJ (2001) Inhibition of cyclooxygenase-2 aggravates doxorubicin-mediated cardiac injury in vivo. *J Clin Invest* 108:585-590
27. Drummond DC, Meyer O, Hong K, Kirpotin DB, Papahadjopoulos D (1999) Optimizing liposomes for delivery of chemotherapeutic agents to solid tumors. *Pharmacol Rev* 51:691-743
28. Endres M, Laufs U (2006) Discontinuation of statin treatment in stroke patients. *Stroke* 37:2640-2643
29. Feldman MD, Erikson JM, Mao Y, Korcarz CE, Lang RM, Freeman GL (2000) Validation of a mouse conductance system to determine LV volume:

- comparison to echocardiography and crystals. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 279:H1698-1707
30. Feleszko W, Mlynarczuk I, Balkowiec-Iskra EZ, Czajka A, Switaj T, Stoklosa T, Giermasz A, Jakobisiak M (2000) Lovastatin potentiates antitumor activity and attenuates cardiotoxicity of doxorubicin in three tumor models in mice. *Clin Cancer Res* 6:2044-2052
 31. Figueiredo-Pereira ME, Chen WE, Li J, Johdo O (1996) The antitumor drug aclacinomycin A, which inhibits the degradation of ubiquitinated proteins, shows selectivity for the chymotrypsin-like activity of the bovine pituitary 20 S proteasome. *J Biol Chem* 271:16455-16459
 32. finanzen.net (2009) ROUNDUP: Branchenprimus Pfizer greift im Geschäft mit Generika an. finanzen.net
 33. Freeman W, Gomyoda M (1999) Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. *Biotechniques* 26:112
 34. Gambliel HA, Burke BE, Cusack BJ, Walsh GM, Zhang YL, Mushlin PS, Olson RD (2002) Doxorubicin and C-13 deoxydoxorubicin effects on ryanodine receptor gene expression. *Biochem Biophys Res Commun* 291:433-438
 35. Gewirtz DA (1999) A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. *Biochem Pharmacol* 57:727-741
 36. Gianni L, Munzone E, Capri G, Fulfaro F, Tarenzi E, Villani F, Spreafico C, Laffranchi A, Caraceni A, Martini C, et al. (1995) Paclitaxel by 3-hour infusion in combination with bolus doxorubicin in women with untreated metastatic breast cancer: high antitumor efficacy and cardiac effects in a dose-finding and sequence-finding study. *J Clin Oncol* 13:2688-2699
 37. Gille L, Nohl H (1997) Analyses of the molecular mechanism of adriamycin-induced cardiotoxicity. *Free Radic Biol Med* 23:775-782
 38. Gordon SA, Abou-Jaoude W, Hoffman RA, McCarthy SA, Kim YM, Zhou X, Zhang XR, Simmons RL, Chen Y, Schall L, Ford HR (2001) Nitric oxide induces

- murine thymocyte apoptosis by oxidative injury and a p53-dependent mechanism. *J Leukoc Biol* 70:87-95
39. Grant DS, Williams TL, Zahaczewsky M, Dicker AP (2003) Comparison of antiangiogenic activities using paclitaxel (taxol) and docetaxel (taxotere). *Int J Cancer* 104:121-129
40. Grupp IL, Subramaniam A, Hewett TE, Robbins J, Grupp G (1993) Comparison of normal, hypodynamic, and hyperdynamic mouse hearts using isolated work-performing heart preparations. *Am J Physiol* 265:H1401-1410
41. Haq S, Kilter H, Michael A, Tao J, O'Leary E, Sun XM, Walters B, Bhattacharya K, Chen X, Cui L, Andreucci M, Rosenzweig A, Guerrero JL, Patten R, Liao R, Molkentin J, Picard M, Bonventre JV, Force T (2003) Deletion of cytosolic phospholipase A2 promotes striated muscle growth. *Nat Med* 9:944-951
42. Hayashidani S, Tsutsui H, Shiomi T, Suematsu N, Kinugawa S, Ide T, Wen J, Takeshita A (2002) Fluvastatin, a 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibitor, attenuates left ventricular remodeling and failure after experimental myocardial infarction. *Circulation* 105:868-873
43. Henaff M, Antoine S, Mercadier JJ, Coulombe A, Hatem SN (2002) The voltage-independent B-type Ca²⁺ channel modulates apoptosis of cardiac myocytes. *FASEB J* 16:99-101
44. Hensley ML, Hagerty KL, Kewalramani T, Green DM, Meropol NJ, Wasserman TH, Cohen GI, Emami B, Gradishar WJ, Mitchell RB, Thigpen JT, Trotti A, 3rd, von Hoff D, Schuchter LM (2009) American Society of Clinical Oncology 2008 clinical practice guideline update: use of chemotherapy and radiation therapy protectants. *J Clin Oncol* 27:127-145
45. Hoppe UC, Böhm M, Hanrath P, Kroemer HK, Osterspey A, Schmaltz AA, Erdmann E (2005) Leitlinien zur Therapie der chronischen Herzinsuffizienz. *Z. Kardiol.* 94:21
46. Ito H, Miller SC, Billingham ME, Akimoto H, Torti SV, Wade R, Gahlmann R, Lyons G, Kedes L, Torti FM (1990) Doxorubicin selectively inhibits muscle gene

- expression in cardiac muscle cells in vivo and in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:4275-4279
47. Jackson G (2008) CORONA--rosuvastatin in older patients with systolic heart failure. *Int J Clin Pract* 62:1
 48. Jeyaseelan R, Poizat C, Baker RK, Abdishoo S, Isterabadi LB, Lyons GE, Kedes L (1997) A novel cardiac-restricted target for doxorubicin. CARP, a nuclear modulator of gene expression in cardiac progenitor cells and cardiomyocytes. *J Biol Chem* 272:22800-22808
 49. Jeyaseelan R, Poizat C, Wu HY, Kedes L (1997) Molecular mechanisms of doxorubicin-induced cardiomyopathy. Selective suppression of Reiske iron-sulfur protein, ADP/ATP translocase, and phosphofructokinase genes is associated with ATP depletion in rat cardiomyocytes. *J Biol Chem* 272:5828-5832
 50. Kang YJ, Zhou ZX, Wang GW, Buridi A, Klein JB (2000) Suppression by metallothionein of doxorubicin-induced cardiomyocyte apoptosis through inhibition of p38 mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem* 275:13690-13698
 51. Keyomarsi K, Sandoval L, Band V, Pardee AB (1991) Synchronization of tumor and normal cells from G1 to multiple cell cycles by lovastatin. *Cancer Res* 51:3602-3609
 52. Kim JK, Pedram A, Razandi M, Levin ER (2006) Estrogen prevents cardiomyocyte apoptosis through inhibition of reactive oxygen species and differential regulation of p38 kinase isoforms. *J Biol Chem* 281:6760-6767
 53. Kim R, Tanabe K, Uchida Y, Emi M, Inoue H, Toge T (2002) Current status of the molecular mechanisms of anticancer drug-induced apoptosis. The contribution of molecular-level analysis to cancer chemotherapy. *Cancer Chemother Pharmacol* 50:343-352
 54. Kim Y, Ma AG, Kitta K, Fitch SN, Ikeda T, Ihara Y, Simon AR, Evans T, Suzuki YJ (2003) Anthracycline-induced suppression of GATA-4 transcription factor:

- implication in the regulation of cardiac myocyte apoptosis. *Mol Pharmacol* 63:368-377
55. Kirshenbaum LA, de Moissac D (1997) The bcl-2 gene product prevents programmed cell death of ventricular myocytes. *Circulation* 96:1580-1585
56. Kiyomiya K, Matsuo S, Kurebe M (2001) Mechanism of specific nuclear transport of adriamycin: the mode of nuclear translocation of adriamycin-proteasome complex. *Cancer Res* 61:2467-2471
57. Kjekshus J, Apetrei E, Barrios V, Bohm M, Cleland JG, Cornel JH, Dunselman P, Fonseca C, Goudev A, Grande P, Gullestad L, Hjalmarson A, Hradec J, Janosi A, Kamensky G, Komajda M, Korewicki J, Kuusi T, Mach F, Mareev V, McMurray JJ, Ranjith N, Schaufelberger M, Vanhaecke J, van Veldhuisen DJ, Waagstein F, Wedel H, Wikstrand J (2007) Rosuvastatin in older patients with systolic heart failure. *N Engl J Med* 357:2248-2261
58. Kobayashi S, Lackey T, Huang Y, Bisping E, Pu WT, Boxer LM, Liang Q (2006) Transcription factor gata4 regulates cardiac BCL2 gene expression in vitro and in vivo. *FASEB J* 20:800-802
59. Larsen TS, Belke DD, Sas R, Giles WR, Severson DL, Lopaschuk GD, Tyberg JV (1999) The isolated working mouse heart: methodological considerations. *Pflugers Arch* 437:979-985
60. Laufs U, Custodis F, Bohm M (2008) Who does not need a statin: too late in end-stage renal disease or heart failure? *Heart* 94:1138-1140
61. Laufs U, Kilter H, Konkol C, Wassmann S, Bohm M, Nickenig G (2002) Impact of HMG CoA reductase inhibition on small GTPases in the heart. *Cardiovasc Res* 53:911-920
62. Lee LG, Connell CR, Bloch W (1993) Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. *Nucleic Acids Res* 21:3761-3766
63. Lee SJ, Ha MJ, Lee J, Nguyen P, Choi YH, Pirnia F, Kang WK, Wang XF, Kim SJ, Trepel JB (1998) Inhibition of the 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase pathway induces p53-independent transcriptional regulation of

- p21(WAF1/CIP1) in human prostate carcinoma cells. *J Biol Chem* 273:10618-10623
64. Li T, Danelisen I, Singal PK (2002) Early changes in myocardial antioxidant enzymes in rats treated with adriamycin. *Mol Cell Biochem* 232:19-26
65. Littarru GP, Langsjoen P (2007) Coenzyme Q10 and statins: biochemical and clinical implications. *Mitochondrion* 7 Suppl:S168-174
66. Livak KJ, Flood SJ, Marmaro J, Giusti W, Deetz K (1995) Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl* 4:357-362
67. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275
68. Maack C, Kartes T, Kilter H, Schafers HJ, Nickenig G, Bohm M, Laufs U (2003) Oxygen free radical release in human failing myocardium is associated with increased activity of rac1-GTPase and represents a target for statin treatment. *Circulation* 108:1567-1574
69. Marcoff L, Thompson PD (2007) The role of coenzyme Q10 in statin-associated myopathy: a systematic review. *J Am Coll Cardiol* 49:2231-2237
70. Marnett LJ, Riggins JN, West JD (2003) Endogenous generation of reactive oxidants and electrophiles and their reactions with DNA and protein. *J Clin Invest* 111:583-593
71. Meissner K, Sperker B, Karsten C, Zu Schwabedissen HM, Seeland U, Bohm M, Bien S, Dazert P, Kunert-Keil C, Vogelgesang S, Warzok R, Siegmund W, Cascorbi I, Wendt M, Kroemer HK (2002) Expression and localization of P-glycoprotein in human heart: effects of cardiomyopathy. *J Histochem Cytochem* 50:1351-1356
72. Merika M, Orkin SH (1993) DNA-binding specificity of GATA family transcription factors. *Mol Cell Biol* 13:3999-4010

73. Minotti G, Cairo G, Monti E (1999) Role of iron in anthracycline cardiotoxicity: new tunes for an old song? *FASEB J* 13:199-212
74. Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, Cairo G, Gianni L (2004) Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacol Rev* 56:185-229
75. Miyashita T, Reed JC (1995) Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* 80:293-299
76. Mordente A, Minotti G, Martorana GE, Silvestrini A, Giardina B, Meucci E (2003) Anthracycline secondary alcohol metabolite formation in human or rabbit heart: biochemical aspects and pharmacologic implications. *Biochem Pharmacol* 66:989-998
77. Morin S, Charron F, Robitaille L, Nemer M (2000) GATA-dependent recruitment of MEF2 proteins to target promoters. *EMBO J* 19:2046-2055
78. Muck AO, Seeger H, Wallwiener D (2004) Class-specific pro-apoptotic effect of statins on human vascular endothelial cells. *Z Kardiol* 93:398-402
79. Muhlhauser U, Zolk O, Rau T, Munzel F, Wieland T, Eschenhagen T (2006) Atorvastatin desensitizes beta-adrenergic signaling in cardiac myocytes via reduced isoprenylation of G-protein gamma-subunits. *FASEB J* 20:785-787
80. Myers C (1998) The role of iron in doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Semin Oncol* 25:10-14
81. Narahari J, Ma R, Wang M, Walden WE (2000) The aconitase function of iron regulatory protein 1. Genetic studies in yeast implicate its role in iron-mediated redox regulation. *J Biol Chem* 275:16227-16234
82. Neely JR, Morgan HE (1974) Relationship between carbohydrate and lipid metabolism and the energy balance of heart muscle. *Annu Rev Physiol* 36:413-459
83. Negoro S, Oh H, Tone E, Kunisada K, Fujio Y, Walsh K, Kishimoto T, Yamauchi-Takahara K (2001) Glycoprotein 130 regulates cardiac myocyte survival in doxorubicin-induced apoptosis through phosphatidylinositol 3-

- kinase/Akt phosphorylation and Bcl-xL/caspase-3 interaction. *Circulation* 103:555-561
84. Niedernhofer LJ, Daniels JS, Rouzer CA, Greene RE, Marnett LJ (2003) Malondialdehyde, a product of lipid peroxidation, is mutagenic in human cells. *J Biol Chem* 278:31426-31433
85. Niitsu N, Yamazaki J, Nakayama M, Umeda M (1998) Pirarubicin-induced myocardial damage in elderly patients with non-Hodgkin's lymphoma. *Nippon Ronen Igakkai Zasshi* 35:358-362
86. Ogata Y, Takahashi M, Takeuchi K, Ueno S, Mano H, Ookawara S, Kobayashi E, Ikeda U, Shimada K (2002) Fluvastatin induces apoptosis in rat neonatal cardiac myocytes: a possible mechanism of statin-attenuated cardiac hypertrophy. *J Cardiovasc Pharmacol* 40:907-915
87. Pastorino JG, Chen ST, Tafani M, Snyder JW, Farber JL (1998) The overexpression of Bax produces cell death upon induction of the mitochondrial permeability transition. *J Biol Chem* 273:7770-7775
88. Penault-Llorca F, Cayre A, Bouchet Mishellany F, Amat S, Feillel V, Le Bouedec G, Ferriere JP, De Latour M, Chollet P (2003) Induction chemotherapy for breast carcinoma: predictive markers and relation with outcome. *Int J Oncol* 22:1319-1325
89. Perego P, Corna E, De Cesare M, Gatti L, Polizzi D, Pratesi G, Supino R, Zunino F (2001) Role of apoptosis and apoptosis-related genes in cellular response and antitumor efficacy of anthracyclines. *Curr Med Chem* 8:31-37
90. Planavila A, Rodriguez-Calvo R, Palomer X, Coll T, Sanchez RM, Merlos M, Laguna JC, Vazquez-Carrera M (2008) Atorvastatin inhibits GSK-3beta phosphorylation by cardiac hypertrophic stimuli. *Biochim Biophys Acta* 1781:26-35
91. Poulaki V, Mitsiades CS, Jousen AM, Lappas A, Kirchhof B, Mitsiades N (2002) Constitutive nuclear factor-kappaB activity is crucial for human retinoblastoma cell viability. *Am J Pathol* 161:2229-2240

92. Pracyk JB, Tanaka K, Hegland DD, Kim KS, Sethi R, Rovira, II, Blazina DR, Lee L, Bruder JT, Kovesdi I, Goldshmidt-Clermont PJ, Irani K, Finkel T (1998) A requirement for the rac1 GTPase in the signal transduction pathway leading to cardiac myocyte hypertrophy. *J Clin Invest* 102:929-937
93. Rao S, Porter DC, Chen X, Herliczek T, Lowe M, Keyomarsi K (1999) Lovastatin-mediated G1 arrest is through inhibition of the proteasome, independent of hydroxymethyl glutaryl-CoA reductase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:7797-7802
94. Riad A, Bien S, Westermann D, Becher PM, Loya K, Landmesser U, Kroemer HK, Schultheiss HP, Tschope C (2009) Pretreatment with statin attenuates the cardiotoxicity of Doxorubicin in mice. *Cancer Res* 69:695-699
95. Ruiz-Ruiz C, Robledo G, Cano E, Redondo JM, Lopez-Rivas A (2003) Characterization of p53-mediated up-regulation of CD95 gene expression upon genotoxic treatment in human breast tumor cells. *J Biol Chem* 278:31667-31675
96. Safra T, Muggia F, Jeffers S, Tsao-Wei DD, Groshen S, Lyass O, Henderson R, Berry G, Gabizon A (2000) Pegylated liposomal doxorubicin (doxil): reduced clinical cardiotoxicity in patients reaching or exceeding cumulative doses of 500 mg/m². *Ann Oncol* 11:1029-1033
97. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230:1350-1354
98. Shadle SE, Bammel BP, Cusack BJ, Knighton RA, Olson SJ, Mushlin PS, Olson RD (2000) Daunorubicin cardiotoxicity: evidence for the importance of the quinone moiety in a free-radical-independent mechanism. *Biochem Pharmacol* 60:1435-1444
99. Singal PK, Li T, Kumar D, Danelisen I, Iliskovic N (2000) Adriamycin-induced heart failure: mechanism and modulation. *Mol Cell Biochem* 207:77-86

100. Siveski-Iliskovic N, Hill M, Chow DA, Singal PK (1995) Probucol protects against adriamycin cardiomyopathy without interfering with its antitumor effect. *Circulation* 91:10-15
101. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, Fleming T, Eiermann W, Wolter J, Pegram M, Baselga J, Norton L (2001) Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* 344:783-792
102. Stearns V, Singh B, Tsangaris T, Crawford JG, Novielli A, Ellis MJ, Isaacs C, Pennanen M, Tibery C, Farhad A, Slack R, Hayes DF (2003) A prospective randomized pilot study to evaluate predictors of response in serial core biopsies to single agent neoadjuvant doxorubicin or paclitaxel for patients with locally advanced breast cancer. *Clin Cancer Res* 9:124-133
103. Sun X, Zhou Z, Kang YJ (2001) Attenuation of doxorubicin chronic toxicity in metallothionein-overexpressing transgenic mouse heart. *Cancer Res* 61:3382-3387
104. Taatjes DJ, Fenick DJ, Koch TH (1999) Nuclear targeting and nuclear retention of anthracycline-formaldehyde conjugates implicates DNA covalent bonding in the cytotoxic mechanism of anthracyclines. *Chem Res Toxicol* 12:588-596
105. Taatjes DJ, Koch TH (2001) Nuclear targeting and retention of anthracycline antitumor drugs in sensitive and resistant tumor cells. *Curr Med Chem* 8:15-29
106. Violi F, Micheletta F, Iuliano L (2002) MRC/BHF Heart Protection Study. *Lancet* 360:1782-1783; author reply 1783-1784
107. Von Hoff DD, Layard MW, Basa P, Davis HL, Jr., Von Hoff AL, Rozencweig M, Muggia FM (1979) Risk factors for doxorubicin-induced congestive heart failure. *Ann Intern Med* 91:710-717
108. Wang L, Ma W, Markovich R, Chen JW, Wang PH (1998) Regulation of cardiomyocyte apoptotic signaling by insulin-like growth factor I. *Circ Res* 83:516-522
109. Wang S, Kotamraju S, Konorev E, Kalivendi S, Joseph J, Kalyanaraman B (2002) Activation of nuclear factor-kappaB during doxorubicin-induced

- apoptosis in endothelial cells and myocytes is pro-apoptotic: the role of hydrogen peroxide. *Biochem J* 367:729-740
110. Wassmann S, Czech T, van Eickels M, Fleming I, Bohm M, Nickenig G (2004) Inhibition of diet-induced atherosclerosis and endothelial dysfunction in apolipoprotein E/angiotensin II type 1A receptor double-knockout mice. *Circulation* 110:3062-3067
111. Wei L, Imanaka-Yoshida K, Wang L, Zhan S, Schneider MD, DeMayo FJ, Schwartz RJ (2002) Inhibition of Rho family GTPases by Rho GDP dissociation inhibitor disrupts cardiac morphogenesis and inhibits cardiomyocyte proliferation. *Development* 129:1705-1714
112. Wojnowski L, Kulle B, Schirmer M, Schluter G, Schmidt A, Rosenberger A, Vonhof S, Bickeboller H, Toliat MR, Suk EK, Tzvetkov M, Kruger A, Seifert S, Kloess M, Hahn H, Loeffler M, Nurnberg P, Pfreundschuh M, Trumper L, Brockmoller J, Hasenfuss G (2005) NAD(P)H oxidase and multidrug resistance protein genetic polymorphisms are associated with doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Circulation* 112:3754-3762
113. Wright CD, Chen Q, Baye NL, Huang Y, Healy CL, Kasinathan S, O'Connell TD (2008) Nuclear alpha1-adrenergic receptors signal activated ERK localization to caveolae in adult cardiac myocytes. *Circ Res* 103:992-1000
114. Wu W, Lee WL, Wu YY, Chen D, Liu TJ, Jang A, Sharma PM, Wang PH (2000) Expression of constitutively active phosphatidylinositol 3-kinase inhibits activation of caspase 3 and apoptosis of cardiac muscle cells. *J Biol Chem* 275:40113-40119
115. Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR (1980) Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 68:251-306
116. Xia Z, Tan MM, Wong WW, Dimitroulakos J, Minden MD, Penn LZ (2001) Blocking protein geranylgeranylation is essential for lovastatin-induced apoptosis of human acute myeloid leukemia cells. *Leukemia* 15:1398-1407

117. Yen HC, Oberley TD, Vichitbandha S, Ho YS, St Clair DK (1996) The protective role of manganese superoxide dismutase against adriamycin-induced acute cardiac toxicity in transgenic mice. *J Clin Invest* 98:1253-1260
118. Zhou S, Heller LJ, Wallace KB (2001) Interference with calcium-dependent mitochondrial bioenergetics in cardiac myocytes isolated from doxorubicin-treated rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 175:60-67
119. Zucchi R, Danesi R (2003) Cardiac toxicity of antineoplastic anthracyclines. *Curr Med Chem Anticancer Agents* 3:151-171
120. Zunino F, Pratesi G, Perego P (2001) Role of the sugar moiety in the pharmacological activity of anthracyclines: development of a novel series of disaccharide analogs. *Biochem Pharmacol* 61:933-938

6.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Strukturformel von Doxorubicin	8
Abb. 2: Cholesterinbiosynthese und Wirkmechanismus der Statine.....	19
Abb. 3: Western Blot-Aufbau	33
Abb. 4: Real-Time PCR (TaqMan-Sonde).....	38
Abb. 5: Schema des ELISA (Cell Death Detection ELISA).....	39
Abb. 6: Druck-Volumen-Beziehungen des Herzens nach Frank Starling	46
Abb. 7: Working Heart, modifiziert nach Hugo Sachs (Operating Manual for the Apparatus ISOLATED PERFUSED HEART modell ICH-SR, Type 844, Version 1.5; Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Deutschland).....	49
Abb. 8: Apoptoseraten in Prozent unter Doxo/Atorva in der TUNEL-Färbung (n=32/Bedingung).....	52
Abb. 9: Apoptoseraten, gemessen mit dem Celldeath Elisa Kit (n=5/Bedingung)	53
Abb. 10 Bax, Bcl-2 und Cleaved Caspase-3 unter Doxo/Atorva (Western Blot).....	54
Abb. 11: Gata4-, Gata6- und Mef2c-Expression und -Konzentration unter Doxo/Atorva im Modell der akuten Myokardschädigung (n=3)	56
Abb. 12: Überlebensraten der behandelten Mäuse	58
Abb. 13: Apoptoseraten der Herzen behandelter Versuchstiere.....	61
Abb. 14: Myokardiale Expression von GATA4 auf Protein- und mRNA-Ebene	62
Abb. 15: Myokardiale ROS-Produktion.....	64
Abb. 16: Aortale ROS-Produktion.....	65
Abb. 17: Fibrosedarstellung durch Trichromfärbung.....	66
Abb. 18: Ergebnisübersicht der Working Heart-Versuche	70
Abb. 19: Aorten-Okklusionsversuche im Working Heart-Modell	72
Abb. 20: Einfluss der Statine auf die Survivalpathways.....	77
Abb. 21: Einfluss der Statine über Gs α auf die myokardiale Kontraktilität.....	81

6.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht der antineoplastischen Effekte von Anthrazyklinen.....	10
Tabelle 2: Übersicht der kardiotoxischen Effekte von Anthrazyklinen	15
Tabelle 3: Antikörper	26
Tabelle 4: PCR-Primer	26
Tabelle 5: Kits.....	27
Tabelle 6: Geräte.....	27
Tabelle 7: Medien, Lösungen, Puffer.....	29
Tabelle 8: Verbrauchsmaterialien	30
Tabelle 9: Chemikalien	30
Tabelle 10: Western Blot-Antikörper.....	34
Tabelle 11: PCR-Primer	36
Tabelle 12: Bezeichnungen, Formelzeichen und Einheiten der gemessenen Werte in der Versuchsanordnung WORKING HEART.....	47
Tabelle 13: Bezeichnungen, Formelzeichen und Einheiten der berechneten Parameter aus der Versuchsanordnung WORKING HEART.	47
Tabelle 14: Morphologische Charakterisierung der Versuchstiere	59
Tabelle 15: Kardial funktionelle Charakterisierung der Versuchstiere (Echokardiographie)	68
Tabelle 16: Ergebnisse im Working Heart-Modell.....	71

7. Publikationen/Dank

7.1 Publikationen

Jan-Christian Reil, David Steffen, Mathias Hohl, Fabian Drautz, Sarah-Lena Puhl, Michael Pfreunds Schuh, Michael Böhm, Heiko Kilter: Statin treatment does not reduce cardiotoxicity but further impairs systolic function in doxorubicin treated mice

Im Review-Verfahren

Abstract: It has been suggested that anthracycline induced cardiotoxicity involves NAD(P)H oxidase. Several groups have shown that myocardial NAD(P)H oxidase activity can be inhibited by statins. Aim of the study was to determine the effect of statins on anthracycline induced cardiotoxicity in mice. C57/BL6 mice were treated with the anthracycline doxorubicin alone or in combination with atorvastatin. The cardiac phenotype was characterized after 4 weeks. Only 73% of the doxorubicin treated mice survived until the end of the study compared to controls. Furthermore, doxorubicin induced myocardial fibrosis (3.03 ± 1.0 fold increase), apoptosis ($16.2 \pm 0.9\%$) and an increase in NAD(P)H oxidase activity (1.37 ± 0.09 fold increase) in the hearts compared to controls. Co-treatment of the mice with atorvastatin had no significant effect on survival (67%) neither on fibrosis (3.06 ± 0.6 fold increase), myocardial apoptosis ($14.3 \pm 4.5\%$) nor NAD(P)H oxidase activity (1.38 ± 0.07 fold increase) compared to controls, but significantly inhibited the doxorubicin induced increase in vascular superoxide release (3.85 ± 1.05 vs. 1.97 ± 0.67 , $p < 0.05$). Atorvastatin alone had no effect compared to control animals. Hemodynamically, hearts from doxorubicin treated mice showed left ventricular (LV) dilatation, a significant decrease of LV contractility (Ees) (3.40 ± 0.20 vs. 4.50 ± 0.28 mmHg/ μ l, $p < 0.05$) as well as ejection fraction ($38.7 \pm 1.5\%$ vs. $57.7 \pm 3.2\%$, $p < 0.01$) compared to controls. Hearts from mice co-treated with atorvastatin demonstrated a further and significant reduction in LV contractility compared to hearts from animals treated with doxorubicin alone (Ees: 2.34 ± 0.25 mmHg/ μ l, $p < 0.01$) while LV dilatation remained unchanged. Conclusion: Low-dose atorvastatin does not protect from doxorubicin induced cardiotoxicity, but further impairs LV contractility of mice hearts.

7.2 Dank

Mein Dank gilt Herrn Universitätsprofessor Dr. med. Böhm für die Überlassung des Themas und für die Möglichkeit, die Dissertationsarbeit in den Laboratorien der Klinik für Innere Medizin III des Universitätsklinikums des Saarlandes erstellen zu können.

Herrn Dr. med. H. Kilter danke ich für seine wissenschaftliche Betreuung sowie für seine hilfreiche und anspornende Unterstützung in allen Abschnitten der Durchführung dieser Arbeit und im Erlernen eigenständigen wissenschaftlichen Arbeitens.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Jan Reil für die Hilfe und den wissenschaftlichen Rat im Rahmen der Working Heart-Experimente.

Weiterhin möchte ich allen Doktoranden, technischen Assistenten und Mitarbeitern des Labors für die gute Zusammenarbeit danken.

An dieser Stelle möchte ich mich bei meinen Eltern für die Unterstützung während meines Studiums bedanken und widme diese Arbeit meinem Vater in Erinnerung an den Kampf gegen die Leukämie.

D. V. Steffen

8. Lebenslauf

David Valentin Steffen, geb. am 14. Februar 1982 in Püttlingen

Vater: Rainer Josef Steffen, geb. am 09. Mai 1953

Mutter: Sonja Eveline Steffen, geb. Schikora, geb. am 06. Juni 1955

Geschwister: Michael Sebastian Steffen, geb. am 28. Juli 1985

1988-1992 Grundschule St. Arnual, Saarbrücken

1992-2001 Gymnasium am Schloß, Saarbrücken
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

2001-2002 Zivildienst, Deutsches Rotes Kreuz, LV Saarland, Abt. Rettungsdienst

2002-2008 Studium der Humanmedizin an der Universität des Saarlandes

2004 **Ärztliche Vorprüfung**, Weiterführung des Studiums nach neuer
Approbationsordnung für Ärzte vom 27.06.2002

2007-2008 **Praktisches Jahr**

- Wahlfach: Psychiatrie, Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie, Uniklinikum des Saarlandes, Homburg
- Innere/Chirurgie: Klinikum Saarbrücken, Saarbrücken

Dez. 2008 **2. Ärztliche Prüfung und Approbation als Arzt**

2009-2010 Weiterbildungsassistent an der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie, Universitätsklinikum des Saarlandes

seit 2011 Weiterbildungsassistent an der Klinik für Neurologie, Klinikum Saarbrücken, Saarbrücken

Seit 2004 **Promotionsarbeit** im Kardiologischen Forschungslabor der Medizinischen Klinik III des Universitätsklinikum des Saarlandes bei Prof. Dr. M. Böhm; Thema: „Untersuchungen zum Einfluss von HMG-CoA-Reduktase-Hemmern bei der Anthrazyklin-induzierten Kardiomyopathie.“