Aus der medizinischen Klinik II-Kardiologie und Pulmologie
Campus Benjamin Franklin
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Eine Deletion des Bradykinin Typ-1 Rezeptors bewirkt eine reduzierte kardiale Apoptose und Inflammation und eine verbesserte linksventrikuläre Pumpfunktion bei der Doxorubicin Kardiomyopathie

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Meike Katharina Sobirey

aus Göttingen

Gutachter/in: 1. Prof. Dr. med. C. Tschöpe

2. Prof. Dr. med. U. Laufs

3. Priv.-Doz. Dr. med. A. Schmittel

Datum der Promotion: 08.04.2011

Inhaltsverzeichnis:

Abkürzungen 7

1. Einleitung.....9

1.1. Die Doxorubicin-induzierte Kardiomyopathie.....9

1.2. Symptome und Epidemiologie der Doxorubicin-Kardiomyopathie.....9

1.3. Morphologie der Doxorubicin-Kardiomyopathie.....10

1.4. Mechanismen der Doxorubicin-Kardiomyopathie 10

1.4.1. Oxidativer Stress.....11

1.4.2. Apoptose.....12

1.4.3. Inflammation 13

1.5. Diagnose, Prävention und Therapie der Doxorubicin-Kardiomyopathie 15

1.6. Das Kallikrein-Kinin-System 17

1.6.1. Die Wirkung des KKS 18

1.6.2. Die Wirkung des KKS auf das kardiovaskuläre System.....19

1.7. Fragestellung vorliegender Arbeit.....21

2. Material und Methode.....23

2.1. Studiendesign.....23

2.2. Mausstämme.....23

2.3. Induktion der Doxorubicin-Kardiomyopathie.....24

2.4. Tierhaltung 24

2.5. Hämodynamik-Messung.....24

2.6. Technik des Konduktanz-Katheters.....25

2.7. Operativer Eingriff.....25

2.7.1. Narkose 25

2.7.2. Intubation und Ventilation 25

2.7.3. Linksventrikuläre Katheterisierung.....25

2.7.4. Kalibrierung des Konkuktanz-Volumen-Signals 26

2.8. Aufzeichnung der Hämodynamik 26
2.8.1. Gemessene Parameter 27
2.8.2. Systolische Parameter 27
2.8.3. Maximaler linksventikulärer Druck: LVP max. (mmHg) 28
2.8.4. Linksventrikuläre Druckanstiegsgeschwindigkeit: dP/dt max. (mmHg/s) ... 28
2.8.5. Endsystolisches Volumen: ESV (µl) 28
2.8.6. Schlagvolumen: SV (µl) 28
2.8.7. Ejektionsfraktion: EF (%) 28
2.8.8. Herzfrequenz: HF (b/min) 28
2.8.9. Herzzeitvolumen: HZV (µl/min) 28
2.8.10. Endsystolische Druck-Volumen-Relationen: ESPVR (mmHg/µl) 29
2.8.11. Diastolische Parameter 29
2.8.12. Linksventrikulärer enddiastolischer Druck: LVEDP (mmHg) 29
2.8.13. LV Druckabfallsgeschwindigkeit: dP/dt min. (mmHg/s) 30
2.8.14. Tau (ms) 30
2.8.15. Enddiastolisches Volumen: EDV (µl) 30
2.8.16. Enddiastolische Druck-Volumen-Relationen: EDPVR (mmHg/µl) 30
2.9. Weiterverarbeitung des Gewebes 30
2.10. Anfertigung der Gefrierschnitte 31
2.11. TUNEL-Färbung der Gefrierschnitte 31
2.12. Mikroskopische Auswertung 32
2.13. Molekularbiologische Methoden 33
2.13.1. Realtime RT PCR 33
2.13.2. Isolierung der mRNA 33
2.13.3. Reverse Transkription 34
2.13.4. Realtime Polymerase-Kettenreaktion (Realtime-PCR) 35
2.14. Proteinchemische Methoden 36

2.14.1. Western Blot 36
2.14.2. Protein-Extraktion 37
2.14.3. Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) 37
2.14.4. Proteintransfer durch Western Blot 37
2.14.5. Nachweis der Proteine mittels Western-Blot-Analyse 38
2.14.6. Auswertung des Western Blots 39
2.15. Genutze Materialien 39
2.16. Statistische Analyse 42
3. Ergebnisse 43
3.1. Hämodynamische Messung 43
3.1.1. Systolische Parameter 43
3.1.2. Diastolische Parameter 51
3.2. Proteinchemische Ergebnisse 55
3.2.1. Bax/bcl-2-Relation 55
3.2.2. Aktivierungsstatus Akt 56
3.3. TUNEL-Färbung 57
3.4. Il-6 mRNA-Expression 58
3.5. B1-Rezeptor-mRNA-Regulation 59
3.6. B2-Rezeptor-mRNA-Regulation 60
4. Diskussion 61
4.1. Der methodische Ansatz 61
4.2. Die Doxorubicin-Kardiomyopathie im Tiermodell 62
4.3. Genetisch veränderte Tiermodelle: Deletion des B1R 62
4.4. Basale Hämodynamik 63
4.5. Hämodynamik nach der Doxorubicin-Behandlung 64
4.6. Hämodynamik der B1R-Knockout-Mäuse nach der Doxorubicin-Behandlung 66
4.7. Regulation des B1R und des B2R 67

4.8. Apoptose 71
4.9. Inflammation 74
4.10. Bedeutung dieser Studie 76
4.11. Einschränkungen dieser Studie 77
5. Zusammenfassung 78
6. Literaturverzeichnis 79
7. Anhang 93
7.1. Lebenslauf 93
7.2. Wissenschaftliche Veröffentlichungen : 94
7.3. Posterpräsentation : 95
7.4. Danksagung 96
7.5. Selbstständigkeitserklärung 97

Abkürzungen

ACE	Angiotensin Converting Enzyme
ACEI	Angiotensin Converting Enzyme Inhibitoren
Akt	Proteinkinase B
$B1^{+/+}$KON	C57bl6 J Mäuse
$B1^{-/-}$KON	C57bl6 J Mäuse mit einer Deletion des B1R
$B1^{+/+}$DOX	C57bl6 J Mäuse mit Doxorubicin behandelt
$B1^{-/-}$DOX	C57bl6 J Mäuse mit einer Deletion des B1R mit Doxorubicin behandelt
B1R	Bradykinin Typ 1 Rezeptor
B2R	Bradykinin Typ 2 Rezeptor
BAX	BCL-2 associated protein X
BCL-2	B-Cell-Lymphoma/Leukemia-2
BNP	Brain natriuretic peptide
BK	Bradykinin
DEPC	Diethylpyrocarbonat
des-Arg-BK	des-Arg-Bradykinin
des-Arg-KD	des-Arg-Kallidin
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DOX	Doxorubicin
dP/dt min.	Linksventrikuläre Druckabfallsgeschwindigkeit
dP/dt max.	Linksventrikuläre Druckanstiegsgeschwindigkeit
DTT	Dithiothreitol
EF	Ejektionsfraktion
EDPVR	Enddiastolische Druck Volumen Relation
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESPVR	Endsystolische Druck Volumen Relation
Fas-Rezeptor	CD94, APO-1, Tumor Nekrose Familien Rezeptor Nummer 6
G-CSF	Granulocyte colony stimulating factor
G-Protein	Guaninnucleotid bindendes Protein
HF	Herzfrequenz
HZV	Herzzeitvolumen

IL-6	Interleukin-6
KD	Kallidin
KKS	Kinin-Kallikrein System
LV	Linker Ventrikel
LVEDP	Linksventrikulärer enddiastolischer Druck
LVEDV	Linksventrikuläres Enddiastolisches Volumen
LVESV	Linksventrikuläres Endsystolisches Volumen
LVP max.	Maximaler linksventrikulärer Druck
mRNA	messenger RNA
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid Synthase
PBS	Phosphate-Buffered-Saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PI-3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
RNA	Ribonucleinsäure
ROS	Reactive Oxygen Species
RT-PCR	Realtime-Polymerase-Kettenreaktion
SDS-PAGE	Sodium duodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SV	Schlagvolumen
Tau	Zeitkonstante des Druckabfalls im linken Ventrikel
TNF-α	Tumor Nekrose Faktor α
TUNEL	TdT-mediated dUTP nick end labeling
V	Volumen
VCAM	Vascular cell adhesion molecule

1. Einleitung

1.1. Die Doxorubicin-induzierte Kardiomyopathie

Doxorubicin (DOX) ist ein wirkungsvolles Medikament, welches in der Therapie maligner Tumoren eine breite Anwendung findet. Die akute Leukämie, Morbus Hodgkin, Non Hodgkin Lymphome, Sarkome, Mammakarzinome und solide Tumore im Kindesalter gehören zu den Einsatzgebieten dieses Anthrazyclins [1]. Anthrazycline sind in der zytostatischen Therapie wirkungsvoll und werden häufig und in hohen Dosierungen verwendet [2]. Die Behandlung hat aber starke Nebenwirkungen; neben Übelkeit, Erbrechen, Haarausfall und einer Störung der Hämatopoese tritt auch eine spezifische Kardiomyopathie auf, die eine sehr schlechte Prognose hat und nur schwer therapierbar ist [1, 3]. Diese Kardiomyopathie wird Doxorubicin-Kardiomyopathie genannt.

1.2. Symptome und Epidemiologie der Doxorubicin-Kardiomyopathie

Die kardialen Wirkungen von Doxorubicin zeigen sich akut an Herzrhythmusstörungen, Hypotension und unterschiedlichen EKG-Veränderungen [4-6]. Diese Nebenwirkungen einer Doxorubicin-Therapie sind generell reversibel und gut behandelbar [4]. Auch eine akute Herzinsuffizienz, Perikarditis und Myokarditis können in seltenen Fällen auftreten [1]. Die chronischen Auswirkungen von Doxorubicin auf das kardiovaskuläre System rufen allerdings irreversible Schäden hervor, die zu einer Herzinsuffizienz führen [4, 7]. Die Symptome der Erkrankung sind verminderte körperliche Belastbarkeit, Tachypnoe, Tachykardie sowie pulmonale und periphere Ödeme. Auch eine vermehrte Neigung zu Arrhythmien mit ventrikulären Tachykardien und Kammerflimmern sowie plötzlicher Herztod sind Folgen der Doxorubicin-Kardiomyopathie [1].

Die akuten Nebenwirkungen von Doxorubicin treten bei circa 11 % der Patienten auf [4]. Die Inzidenz der chronischen Herzinsuffizienz bei Patienten, welche mit diversen Anthracyclinen behandelt werden, bewegt sich zwischen 0 % und 14 %, jene einer subklinischen Erkrankung liegt zwischen 0 % bis 57 %. Die breite Variation, mit der eine

durch Zytostatika dieser Gruppe hervorgerufene Kardiomyopathie auftritt, ist hierbei auf ein abweichendes Studiendesign, die Anwendung verschiedener Anthracycline, aber vor allem auf die angewandte Gesamtdosis des Zytostatikums zurückzuführen [8, 9].
In einer retrospektiven Analyse an Patienten, die einer Therapie mit Doxorubicin unterworfen waren, trat die Kardiomyopathie und Herzinsuffizienz bei 4 % der Patienten auf. Diese hatten eine Gesamtdosis von 500 bis 550 Milligramm pro Quadratmeter Körperoberfläche (mg/m^2) erhalten. Die Inzidenz der Erkrankung steigt mit einer kumulativen Dosis von 551-600 mg/m^2 bzw. über 600 mg/m^2 auf 18 % bzw. 36 % [4]. Die Dosisabhängigkeit einer Kardiomyopathie bestimmt die höchstmöglich einsetzbare Menge von Doxorubicin. So wird eine maximale kumulative Dosis von 450 mg/m^2 empfohlen [1]. Dennoch kommt es auch bei geringeren, vermeintlich sicheren Dosierungen zu morphologischen Veränderungen am Herzen und zu einer verminderten kontraktilen Funktion des Herzmuskels [10].
Weitere Faktoren beeinflussen das Auftreten der Kardiomyopathie. Das Alter der Patienten scheint einen Einfluss zu haben, denn insbesondere bei sehr alten, aber auch bei sehr jungen Patienten kommt es vermehrt zum Auftreten der Erkrankung. Eine vor der Doxorubicin-Therapie bereits bestehende Herzerkrankung, vorhergegangene antineoplastische Therapien und die Kombination unterschiedlicher Chemotherapeutika spielen ebenfalls eine wichtige Rolle [3].

1.3. Morphologie der Doxorubicin-Kardiomyopathie

Makroskopisch ist diese Erkrankung durch eine dilatative Kardiomyopathie gekennzeichnet. Mikroskopisch zeigen sich eine vermehrte Fibrose, ein Verlust von Myofibrillen, geschwollene Mitochondrien, eine erhöhte Zahl von Lysosomen und eine vakuoläre Degeneration der Zellen. Diese morphologischen Muster sind bei Patienten, aber auch im experimentellem Tiermodell bei Mäusen, Ratten oder Hasen mit Doxorubicin-Kardiomyopathie feststellbar und lassen auf einen von der Spezies unabhängigen Schädigungsmechanismus schließen [1, 11].

1.4. Mechanismen der Doxorubicin-Kardiomyopathie

Viele Mechanismen werden im Zusammenhang mit der Entstehung der Doxorubicin-Kardiomyopathie diskutiert. Hierzu zählen unter anderem ein durch das Medikament

induzierter oxidativer Stress, Inflammation und programmierter Zelltod (Apoptose). Auch eine Behinderung der Synthese von Nukleinsäuren und Proteinen, ein Freisetzen von vasoaktiven Substanzen, eine Veränderung der adrenergen Funktion, Calcium-Homöostase und Genexpression im Herzgewebe werden als mögliche Mechanismen in Betracht gezogen [12, 13]. Die Mechanismen, durch die Doxorubicin das Herzmuskelgewebe schädigt, scheinen sich jedoch von denen seiner antineoplastischen Wirkung zu unterscheiden [11]. Die Wirkung von Doxorubicin auf Tumorzellen beruht unter anderem auf einer Interkalierung der DNA, was die Bildung von Makromolekülen verhindert. Vor allem aber wird durch Hemmen der Topoisomerase II die DNA geschädigt und deren Replikation und Transkription verhindert [13]. Auch oxidativer Stress ist nicht nur ein auslösender Faktor bei der Kardiomyopathie, sondern wird auch als eine mögliche antineoplastische Wirkweise des Medikaments diskutiert [12].

1.4.1. Oxidativer Stress

Oxidativer Stress bezeichnet einen Zustand, in dem in Zellen vermehrt hochreagible Moleküle vorkommen, die auf diese Zellen schädlich wirken können. Diese Moleküle bezeichnet man auch als *Reactive Oxygen Species* (ROS). ROS werden in einem Organismus ständig gebildet, sie erfüllen auch physiologische Funktionen, und es gibt verschiedene Enzyme, um sie abzubauen. Kommt es aber zur vermehrten Ansammlung dieser Moleküle infolge vermehrter Produktion oder vermindertem Abbau, wirken sie toxisch [14]. Das Herzmuskelgewebe scheint für verstärkten oxidativen Stress besonders vulnerabel zu sein – unter anderem, da antioxidativ wirkende Enzyme in diesem Gewebe nur in geringen Mengen vorkommen [15]. ROS sind bei Entstehen und Fortschreiten verschiedener kardialer Erkrankungen beteiligt; bekannte kardiale Risikofaktoren wie Hypertonus oder Nikotinabusus sind mit einem erhöhten oxidativen Stress verbunden [14].

Doxorubicin akkumuliert vor allem in den Mitochondrien der Kardiomyozyten [16, 17]. Mitochondriale Enzyme bewirken nun eine Redox-Reaktion an einer Untereinheit des Doxorubicins, was wiederum zu einer Bildung von ROS führt [18]. Weiterhin verringert Doxorubicin die Aktivität von antioxidativ wirkenden Enzymen [15, 19, 20] und von Antioxidantien selbst [19, 21]. Bei der Bildung von ROS durch Doxorubicin scheint auch das Spurenelement Eisen eine förderliche Rolle zu spielen, und Eisenchelatoren wie

Dexrazoxane können den von Doxorubicin ausgelösten oxidativen Stress reduzieren [13].

Die ROS sind hochreagible Moleküle. Infolge von Reaktionen mit anderen intramyokardialen Molekülen können sie diese schädigen und so die intrazellulare Homöostase der Kardiomyozyten beeinträchtigen [14]. Durch die ROS werden unter anderem wichtige Enzyme im sarkoplasmatischen Retikulum und in den Mitochondrien inaktiviert [22]. Auch die Lipide in der zellulären Membran können von den ROS oxidiert werden; dies stört wiederum die Barrierefunktion der Zellmembran [14]. Der durch Doxorubicin hervorgerufene oxidative Stress ist zudem ein Auslöser für Apoptose, den programmierten Zelltod [22].

1.4.2. Apoptose

Zelltod kann von unterschiedlichen Prozessen hervorgerufen werden. Die Apoptose wird als programmierter Zelltod bezeichnet, der bei vielen physiologischen und pathophysiologischen Prozessen eine wichtige Rolle spielt [1]. Zellverlust durch Apoptose kommt auch bei diversen kardialen Erkrankungen wie Myokardinfarkt, dilatativer Kardiomyopathie und ebenso bei der Doxorubicin-Kardiomyopathie vor [23]. Es wurde im Tiermodell nachgewiesen, dass auch kleine Zellverluste durch Apoptose mit einer Herzinsuffizienz assoziiert sein können [24].

Viele Signaltransduktionswege können bei einer Zelle zur Apoptose führen. Wichtige Schlüsselenzyme der Apoptose sind Caspasen. Die Aktivierung von Caspasen initiiert unter anderem den Abbau von DNA und Proteinen in der Zelle und ist somit ein zentraler Bestandteil des programmierten Zelltodes [1]. Es gibt einen intrinsischen und einen extrinsischen Weg, auf dem die Caspasen aktiviert werden können. Bei dem extrinsischen Weg bindet ein Ligand an einen spezifischen Rezeptor, den Fas-Rezeptor (CD95; Apo-1; Tumor-Nekrose-Familien-Rezeptor Nummer 6), auf der Zelloberfläche. Über intrazelluläre Signaltransduktionswege wird nun die Apoptose der Zelle eingeleitet. Liganden für den Fas-Rezeptor sind unter anderen Zytokine, wie der Tumor Nekrosefaktor α (TNF-α). Bei dem intrinsischen Signaltransduktionsweg kommt es infolge einer Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien zur Aktivierung der Caspasen [1, 25, 26]. Bei den intrazellulären Signaltransduktionswegen spielen unterschiedliche Moleküle eine Rolle. Die *B-cell-lymphoma-2*(Bcl-2)-Familie ist eine Gruppe von Proteinen, die entweder antiapoptotisch wie Bcl-2 (B-cell-

lymphoma/leukemia-2) oder proapoptotisch wie Bax (Bcl-2 associated protein X) wirken. Bax vermittelt als proapoptotischer Faktor unter anderem das Freisetzen von Cytochrom C aus den Mitochondrien, und Bcl-2 verhindert dies [22]. Es wird angenommen, dass die Mengenverhältnisse von Bax und Bcl-2 das Ausmaß von Apoptose in einem Gewebe widerspiegeln können [23]. Bei vielen kardiovaskulären Erkrankungen konnte bei der Relation von proapoptotischen Faktoren wie Bax und antiapoptotischen Faktoren wie Bcl-2 eine Verschiebung zugunsten der proapoptotischen Faktoren festgestellt werden [27]. Als Bestandteil seiner kardiotoxischen Wirkung zeigte sich auch nach einer Doxorubicin-Behandlung eine Verschiebung dieses Verhältnisses zugunsten des proapoptotischen Faktors Bax [28-31].

Die proapoptotische Wirkung von Doxorubicin wird unter anderem durch den vermehrten oxidativen Stress verursacht. So können Wasserstoffperoxid oder Superoxide, welche bei den Redox-Vorgängen am Doxorubicin vermehrt entstehen, proapoptotische Faktoren wie p53 induzieren. Auch können sie die Barrierefunktion der Mitochondrien-Membran stören, was dann über das Freisetzen von Cytochrom C den programmierten Zelltod auslöst. Ein im Myokard wichtiger antiapoptotischer Signaltransduktionsweg beinhaltet die Aktivierung der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI-3K). Die PI-3K aktiviert dann ein weiteres Enzym, die Proteinkinase B (Akt). Dieses Enzym wiederum bewirkt die Hemmung verschiedener proapoptotischer Effektorproteine [32]. Es konnte gezeigt werden, dass eine Aktivierung dieses Signaltransduktionsweges die durch DOX ausgelöste Apoptose verhindern kann [33].

Dass Doxorubicin Apoptose im Herzen auslöst, konnte in vielen Studien nachgewiesen werden [11]. In Tiermodellen wurde in mehreren Studien nach Doxorubicin-Behandlung eine vermehrte Apoptose beschrieben, die jedoch im Verlauf rückläufig war [30, 34]. Ein Bestandteil der akuten toxischen Wirkung von Doxorubicin scheint also Apoptose zu sein. Der durch die Apoptose hervorgerufene Zellverlust könnte zur Entwicklung der Herzinsuffizienz beitragen [24].

1.4.3. Inflammation

Bei der Herzinsuffizienz kommt es zu einer Aktivierung des Immunsystems. Die genauen Mechanismen sind noch nicht geklärt. Eine endotheliale Aktivierung und eine veränderte Antigenpräsentation der geschädigten Kardiomyozyten könnten hier eine

Rolle spielen [35, 36]. Infolge dieser Immunantwort kommt es unter anderem zu einer vermehrten Expression von proinflammatorischen Zytokinen wie Tumornekrosefaktor α (TNF α) und Interleukin-6 (IL-6) durch die kardialen Zellen. Es konnte nachgewiesen werden, dass Zytokine wie IL-6 die linksventrikuläre Pumpfunktion negativ beeinflussen, das kardiale *Remodeling* prägen und proapoptotisch wirken können. Somit kann eine vermehrte Expression der Zytokine zum Fortschreiten einer Herzinsuffizienz beitragen [37].

Doxorubicin hat inflammatorische Eigenschaften, auch an Herz und Gefäßen [38-40]. Das Zytostatikum kann über eine vermehrte Expression von Zelladhäsionsmolekülen wie *vascular cell adhesion molecule* (VCAM) die Adhäsion von neutrophilen Granulozyten an Endothelzellen und damit auch deren Einwanderung in das Gewebe fördern [36]. Es konnte nachgewiesen werden, dass antiinflammatorisch wirkende Substanzen die kardiotoxische Wirkung von Doxorubicin reduzieren [36, 41]. Dies spricht also für eine inflammatorische Komponente, die bei der Doxorubicin-Kardiomyopathie zum Fortschreiten der Herzinsuffizienz beiträgt. Ob dabei ebenfalls eine vermehrte Zytokinexpression eine Rolle spielt, wird diskutiert [42, 43].

Weitere Mechanismen werden im Zusammenhang mit der Entstehung der Doxurubicin-Kardiomyopathie in Erwägung gezogen. Eine verminderte Expression von kardialen Proteinen, welche Teile des kontraktilen Apparates und des sarkoplasmatischen Retikulums sind, wird unter anderem für die Störung der kardialen Kontraktion und Kalzium-Homöostase verantwortlich gemacht. Weiterhin werden eine Störung der adrenergen Funktionen und des Elektrolythaushaltes in den Kardiomyozyten diskutiert [1].

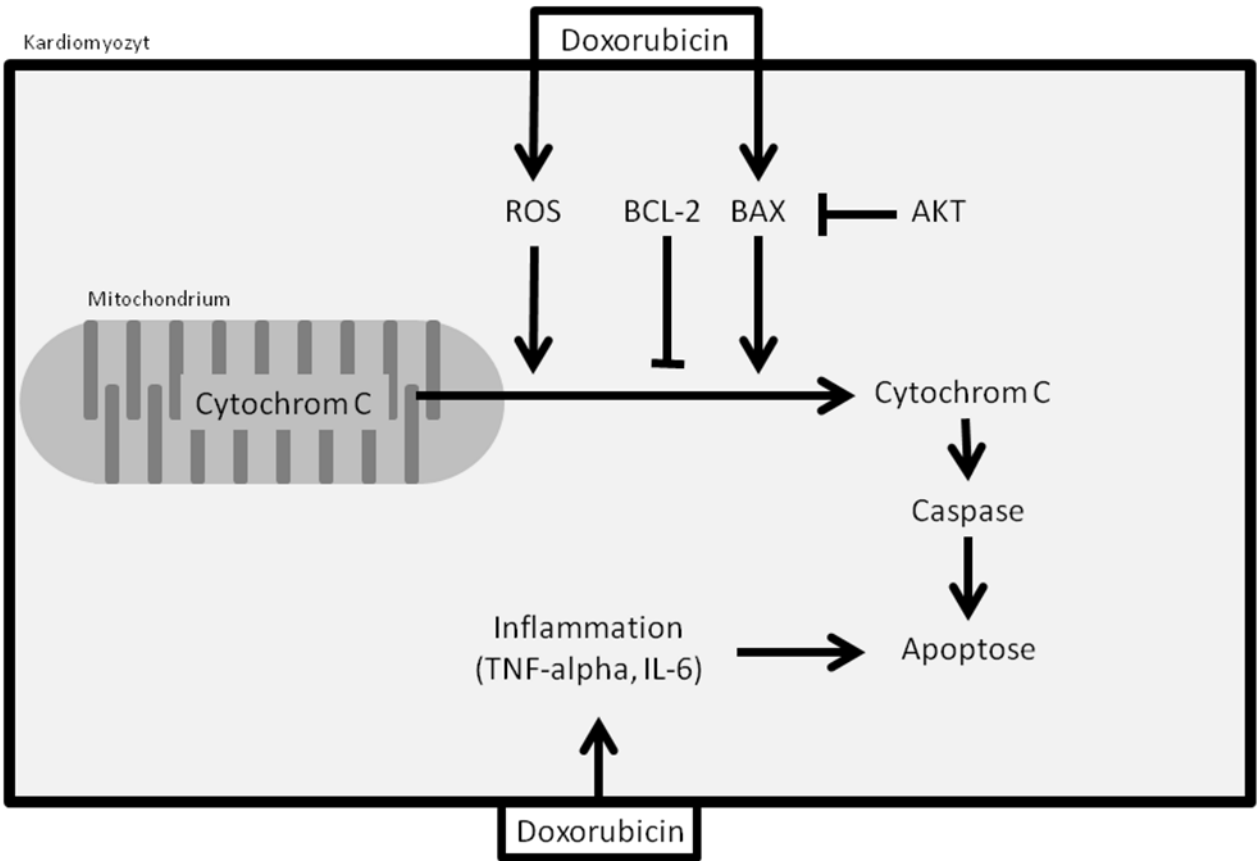


Abb. 1: TNF-alpha (Tumornekrosefaktor-alpha), IL-6 (Interleukin-6), ROS (Reactive Oxygen Species), BCL-2 (B-cell-lymphoma-2), BAX (BCL-2 associated protein X) AKT (Proteinkinase B)

1.5. Diagnose, Prävention und Therapie der Doxorubicin-Kardiomyopathie

Diagnostische Möglichkeiten umfassen unter anderem Röntgen-Thorax-Bilder, das Elektrokardiogramm, Echokardiografie, Magnetresonanztomografie und die Serumlevel von kardialen Enzymen und Neurohormonen wie Troponin oder *Brain natriuretic peptide* (BNP), welche jedoch alle nicht spezifisch für die Doxorubicin-Kardiomyopathie sind [12]. Die myokardiale Biopsieentnahme mit Nachweis der für die Doxorubicin-Kardiomyopathie typische Histologie ist eine weitere Möglichkeit, die jedoch aufwendig und invasiv ist [1, 44, 45].

Die wichtigste präventive Maßnahme, um das Auftreten der Doxorubicin-Kardiomyopathie zu verhindern, besteht darin, die Gesamtdosis möglichst gering zu halten, da die Inzidenz der Erkrankung mit der Höhe der Dosis steigt [4]. Dies schränkt die Behandlungsmöglichkeiten mit diesem wirkungsvollen Medikament ein, da eine geringere Dosis die antineoplastische Wirkung beeinträchtigen könnte. Eine Kombination mit anderen Zytostatika kann hilfreich sein, um die Gesamtdosis zu

reduzieren, und zeigt im Falle von Vincristin sogar kardioprotektive Effekte [46]. Andere Ansätze, wie die Verwendung unterschiedlicher Doxorubicin-Analoga, Variationen in der Verabreichungsdauer, Variation an DOX zum Beeinflussen seiner pharmakokinetischen Eigenschaften, zeigten in der Klinik nur begrenzte Erfolge [1]. Auch Antioxidantien, welche den durch Doxorubicin ausgelösten oxidativen Stress vermindern, haben sich in der Klinik nicht durchgesetzt [13]. Einzig der Eisenchelator Dexrazoxane scheint sowohl im Tiermodell als auch in klinischen Studien kardioprotektiv zu wirken, ohne die antineoplastische Wirkung von DOX zu beeinflussen [13]. Es gibt weitere pharmakologische Ansätze, die vor allem in Tiermodellen überprüft wurden. Hierzu zählen Sildenafil, Erythropoietin, Thrombopoietin und *granulocyte colony-stimulating factor* (G-CSF) [12]. Unsere Arbeitsgruppe konnte in einem Tiermodell nachweisen, dass der Endothelin-Rezeptorantagonist Bosentan protektive Wirkung bei Doxorubicin-Behandlung zeigt [47]. In einer anderen Studie unserer Arbeitsgruppe konnten kardioprotektive Effekte eines Statins nachgewiesen werden [48].

Zurzeit gibt es keine etablierte Therapie zur Behandlung der Doxorubicin-Kardiomyopathie. Die Ursache liegt einerseits im Mangel an großen randomisierten klinischen Studien, welcher unter anderem mit der geringen Gesamtprävalenz der Erkrankung zu erklären ist. Zudem sind noch weitere Erkenntnisse über die Entstehungsmechanismen der Doxorubicin-Kardiomyopathie nötig. Von den aus der Therapie der Herzinsuffizienz bekannten Medikamenten zeigen β-Blocker positive Effekte [49, 50]. Auch die Therapie mit ACEI (Angiotensin Converting Enzyme Inhibitoren) oder eine Kombination der beiden Präparate senken die Mortalität bei Patienten mit dieser Erkrankung [49, 51]. Dennoch ist die Doxorubicin-Kardiomyopathie mit den aus der Herzinsuffizienztherapie bekannten Medikamenten nur unzureichend behandelbar, sodass die Herztransplantation bei Patienten mit dieser Erkrankung eine Therapieoption ist [11, 49]. Demnach gibt es keine etablierte medikamentöse Therapie oder Prävention für die Doxorubicin-Kardiomyopathie. Dies betrifft auch Medikamente, welche man parallel zur Doxorubicin-Behandlung einsetzen könnte, um die Toxizität des Doxorubicin abzumildern. Hierdurch wäre es möglich, dieses wirkungsvolle Medikament in höheren Dosierungen zu verabreichen.

1.6. Das Kallikrein-Kinin-System

Das Kallikrein-Kinin-System (KKS) kommt im Plasma, aber auch in unterschiedlichen Geweben wie dem Herzen vor. Aus Vorstufen, den Kininogenen, werden durch eine enzymatische Reaktion die Kinine gespalten. Die Enzyme, die diese Reaktion katalysieren, heißen Kallikreine. Sie sind als *Plasma Kallikrein* vor allem im Blut oder als *Tissue Kallikrein* vor allem im Gewebe wirksam. Es gibt eine große Anzahl unterschiedlicher Kinine, darunter Bradykinin (BK), Kallidin (KD), des-Arg-Bradykinin (des-Arg-BK) und des-Arg-Kallidin (des-Arg-KD). Diese Kinine entfalten ihre Wirkung über zwei Rezeptoren, den Bradykinin Typ1 Rezeptor (B1R) und den Bradykinin Typ 2 Rezeptor (B2R). Der Abbau der Kinine erfolgt über eine Vielzahl von Enzymen, darunter Carboxpeptidasen, Aminopeptidasen und auch das *Angiotensin Converting Enzyme* (ACE). Bei diesem Abbau können entweder aktive Zwischenstufen oder inaktive Abbauprodukte der Kinine entstehen [52]. Das System ist komplex, wird auf vielen Ebenen reguliert und zieht im Organismus diverse Effekte nach sich. Die Auswirkungen können je nach Gewebe sehr variabel sein, was unter anderem an der Präsenz der jeweiligen Rezeptoren, aber auch an spezifischen regulativen Mechanismen liegt [52, 53]. Die Kinin-Rezeptoren werden von vielen Zelltypen exprimiert. Hierzu zählen Endothelzellen und glatte Muskelzellen in Gefäßen, die glatte Muskulatur von Hohlorganen, Fibroblasten, Nervenzellen und viele neoplastische Zellen [52]. Im Herzen gibt es ebenfalls ein lokales KKS, und die Rezeptoren werden von Endothelzellen, Fibroblasten und Kardiomyozyten exprimiert [54-56]. Der B2R wird konstitutiv in vielen Geweben exprimiert, der B1R wird unter physiologischen Bedingungen nur gering exprimiert. Stimuli wie Inflammation oder Gewebstrauma führen zu einer vermehrten Expression des B1R im Gewebe [52, 53].

Die Kinine zeigen eine unterschiedliche Affinität für die jeweiligen Rezeptoren. BK und KD aktivieren vor allem den B2R. Die des-Arg-Metaboliten, welche aus KD und BK durch die Carboxypeptidasen gebildet werden, wirken über den B1R [53].

Der B1R und der B2R sind G-Protein-gekoppelte Rezeptoren. Viele Signaltransduktioswege werden, abhängig vom Zelltyp, von den Kinin-Rezeptoren aktiviert. In Endothelzellen führt die Aktivierung der Rezeptoren zu einer Erhöhung der intrazellulären Kalzium-Konzentration. Eine Aktivierung der Phospolipase und der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS) mit Produktion von Prostaglandinen

und Stickstoffmonoxid (NO) sind eine Folge. Diese Mediatoren führen nun zu einer Relaxation der glatten Muskulatur der Gefäße [53].

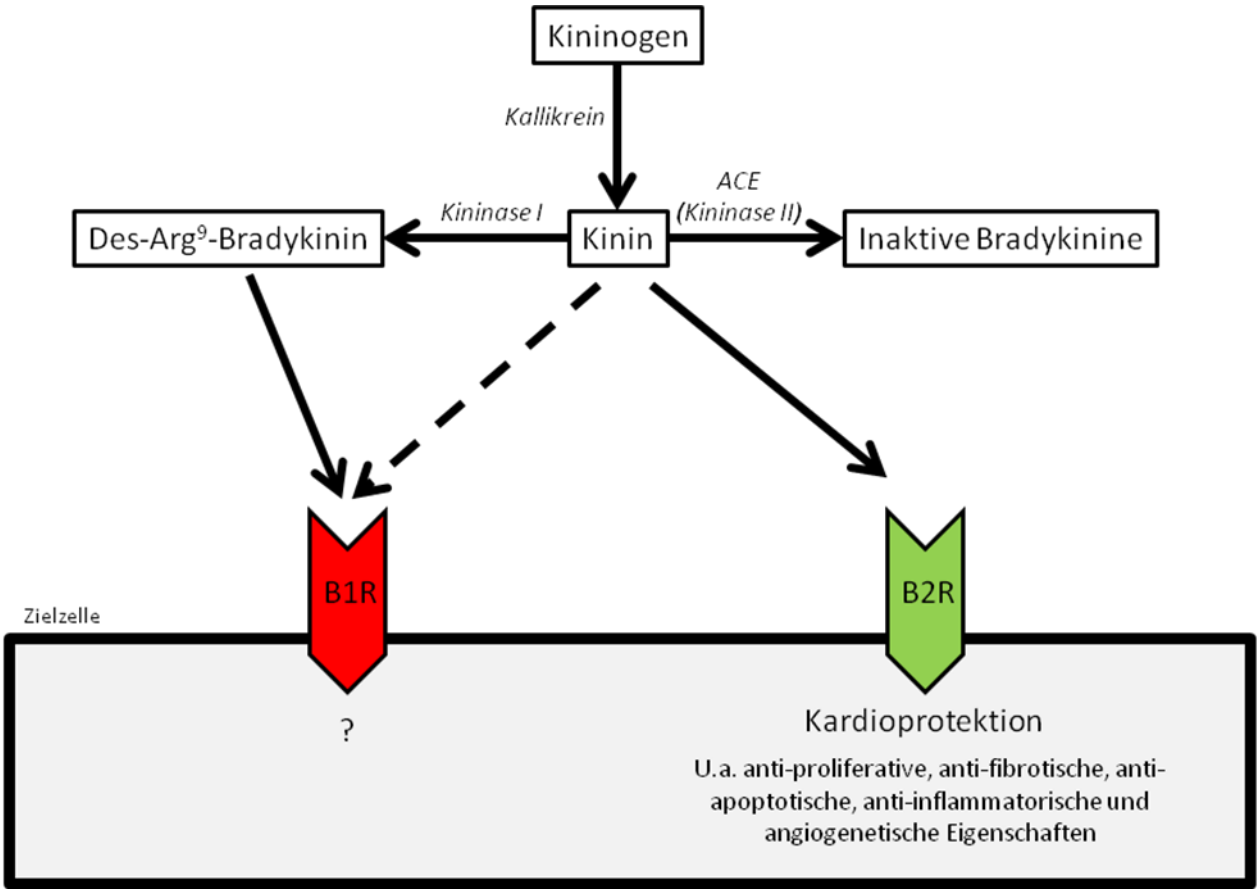


Abb. 2: B1R (Bradykinin-Typ-1-Rezeptor), B2R (Bradykinin-Typ-2-Rezeptor), ACE (Angiotensin Converting Enzyme)

1.6.1. Die Wirkung des KKS

Zu den Wirkungen der Kinine zählen Vasodilatation und Permeabilitätssteigerung am Endothel [52]. Kinine haben im Organismus proinflammatorische und Schmerz vermittelnde Eigenschaften [53]. Bei Krankheiten wie Sepsis, Asthma bronchiale, Angioödem oder chronisch entzündlichen Darmerkrankungen spielen die proinflammatorischen und vasodilatorischen Eigenschaften der Kinine offenbar eine wichtige Rolle [57-60]. Die akute Entzündungsreaktion scheint hierbei vor allem über den B2R vermittelt zu werden, der unter Basalbedingungen exprimiert wird. Bei der chronischen Inflammation scheint der B1R einen Einfluss zu haben, der in dieser Situation vermehrt exprimiert wird [53]. B2R-Antagonisten werden bereits in ihrer klinischen Wirkung bei Erkrankungen wie Angioödem oder Asthma bronchiale erprobt [58, 59].

1.6.2. Die Wirkung des KKS auf das kardiovaskuläre System

Die Wirkung des KKS auf das kardiovaskuläre System hängt nicht zuletzt von seinen vasodilatorischen Eigenschaften ab [61, 62]. Eine Senkung des Blutdruckes sowohl bei Menschen als auch in unterschiedlichen Tiermodellen ist die Folge [62]. Dies wurde erstmals 1909 von Abelous und Bardier anhand des blutdrucksenkenden Effekts von menschlichem Urin bei Hunden beschrieben [63]. Zwei Jahrzehnte später wurde die hypotensiv wirkende Substanz isoliert und Kallikrein genannt [52, 53]. Bei Menschen und Versuchstieren mit Hypertonus konnte eine reduzierte Ausscheidung von Kallikrein im Urin festgestellt werden [64].

Dieser Effekt scheint vor allem auf den B2R zurückzugehen, denn die vasodilatorische Wirkung von Bradykinin im menschlichen Unterarm kann durch Gabe eines B2R-Antagonisten aufgehoben werden [65]. Ebenso wird die blutdrucksenkende Wirkung von ACE-Inhibitoren zum Teil über Kinine vermittelt [64]. Dies konnte in einem Ratten-Tiermodell nachgewiesen werden. Sowohl die hypotensiven Wirkungen von Bradykinin als auch die eines ACE-Inhibitors konnten in dieser Studie durch Beigabe eines B2R-Antagonisten aufgehoben werden [66]. Unter inflammatorischen Bedingungen hat der B1R ebenfalls vasodilatorische Eigenschaften [67, 68]. Bei Patienten mit Herzinsuffizienz scheint die durch den ACE-Inhibitor vermittelte Vasodilatation vom B1R abzuhängen [69]. Das KKS hat neben seinem Einfluss auf den Gefäßtonus kardioprotektive Eigenschaften, und eine reduzierte Aktivität des KKS kann zum Fortschreiten unterschiedlicher kardiovaskulärer Erkrankungen beitragen. Dies konnte in vielen Studien an Modellen diverser kardiovaskulärer Erkrankungen wie Diabetische Kardiomyopathie [70], kardiale Hypertrophie [71-74], kardiale Reperfusionsschäden nach Ischämie [75-77] und Myokardinfarkt [75, 78] nachgewiesen werden. Es wird zudem angenommen, dass die kardioprotektive Wirkung von ACE-Inhibitoren nicht nur von einer verminderten Bildung von Angiotensin II hervorgerufen wird, sondern dass hier der verminderte Abbau der Kinine eine zusätzliche Rolle spielt [79, 80].

Es gibt mehrere systematische Ansätze, um die Wirkung des KKS auf das kardiovaskuläre System zu untersuchen. Medikamentös kann man hier mit den entsprechenden Rezeptoragonisten und Rezeptorantagonisten arbeiten. Es stehen eine Reihe an Tiermodellen zur Verfügung, welche Veränderungen des KKS auf verschiedenen Ebenen zeigen [80]. Es gibt hier zum einen die experimentelle

Möglichkeit, die Aktivität des KKS durch vermehrte oder auch fehlende Expression von einzelnen Komponenten des Systems oder durch Gentransfer zu beeinflussen [62, 73, 80]. Zum anderen kann man auf Rezeptorebene, mit Mäusen, die die Bradykininrezeptoren entweder über- oder gar nicht exprimieren, das KKS untersuchen [80].

In einem Ratten-Tiermodell konnte nachgewiesen werden, dass eine vermehrte Expression von menschlichen Kallikreinen die durch Isoproterenol induzierte kardiale Hypertrophie und Fibrose im Herzmuskelgewebe reduziert. Diese positiven Effekte werden mittels Gabe eines B2R-Antagonisten aufgehoben [73]. Unsere Arbeitsgruppe konnte weiterhin zeigen, dass die gleichen Tiere bei experimentellem Diabetes Mellitus, mithin Diabetischer Kardiomyopathie, eine verminderte Fibrosierung des Myokards aufweisen. Die intrazelluläre Kalzium-Homöostase ist bei diesen Tieren im Vergleich zu Wildtypen verbessert. Die Mechanismen führen zu einer verbesserten Herzfunktion und können ebenfalls durch einen B2R-Antagonisten aufgehoben werden [81, 82].

Bei Hypertonus kann die positive Wirkung des KKS anhand eines Gentransfers in Tiermodellen an Ratten nachgewiesen werden. Der Gentransfer führt zu einer Reduktion der kardialen Hypertrophie und Fibrose [62]. Auch bei Ischämie im Herzmuskel scheint das KKS kardioprotektiv zu wirken. Es bewirkt eine Vasodilatation , eine Reduktion von Infarktgröße und *Remodeling* nach dem Infarkt [78]. Weiterhin kann das KKS Angiogenese nach Ischämie bewirken [70, 78]. Viele der kardioprotektiven Mechanismen des KKS werden also offenbar über den B2R vermittelt, da die Gabe von B2R-Antagonisten eine Reihe an positiven Wirkungen aufhebt. Anhand von Knockout-Mäusen konnte der kardioprotektive Effekt des B2R ebenfalls nachgewiesen werden [80].

Die Rolle des B1R im kardiovaskulären System sowohl unter Basalbedingungen als auch bei kardialen Erkrankungen ist dagegen noch nicht ausreichend untersucht. In Studien konnte allerdings gezeigt werden, dass der B1R im Myokard konstitutiv, wenngleich in geringen Mengen exprimiert wird [83, 84].

Unsere und andere Arbeitsgruppen konnten keinen Einfluss des B1R auf die basale Herzfunktion und Morphologie nachweisen [78, 85]. Lauton-Santos et al. konnten bei B1R-Knockout-Mäusen jedoch eine reduzierte systolische Funktion verbunden mit Veränderungen im Kalziumhaushalt in den Kardiomyozyten feststellen [83]. Diese

diskrepanten Ergebnisse könnten in unterschiedlichen Studienmodellen begründet sein, da unsere Messungen *in vivo* und jene von Lauton-Santos et al. *ex vivo* erfolgten.
Bei verschiedenen kardiovaskulären Erkrankungen wird der B1R im Herzen vermehrt exprimiert. So führt Ischämie zu einer vermehrten Expression des Rezeptors [86], bei Patienten mit Herzinsuffizienz wird der Rezeptor verstärkt im Herzen exprimiert [55].
In einigen Studien an Tieren konnte gezeigt werden, dass der B1R vasodilatorische und hypotensive Effekte aufweist [68, 87-89]. Cruden et al. konnten jedoch nachweisen, dass der B1R keinen Einfluss auf den Tonus der Gefäße bei Patienten mit Herzinsuffizienz hat [90]. Weiterhin werden einerseits kardioprotektive, andererseits aber auch gegenteilige Eigenschaften des Rezeptors vermutet. So konnten kardioprotektive Wirkungen des Rezeptors bei myokardialer Ischämie nachgewiesen werden [91, 92]; andere Studien zeigten weder kardioprotektive noch gegenteilige Wirkungen des Rezeptors bei Ischämie [85, 93]. Zudem liegen Studien vor, die eine schädliche Wirkung des Rezeptors bei myokardialer Ischämie aufzeigen [94]. Auch bei der durch Diabetes Mellitus ausgelösten Kardiomyopathie scheint der Rezeptor schädlich zu wirken [95]. Zur Wirkung des B1R bei der Doxorubicin-Kardiomyopathie gibt es noch keine Studien. Demnach bedarf die Klärung der Funktion des B1R im kardiovaskulären System weiterer Untersuchungen.

1.7. Fragestellung vorliegender Arbeit

In unserer Studie wollen wir den Einfluss des B1R auf die Doxorubicin-Kardiomyopathie untersuchen. Hierzu verwendeten wir B1R-Knockout-Mäuse, um zu zeigen, welche Effekte eine Deletion dieses Rezeptors bei der Doxorubicin-Kardiomyopathie nach sich zieht. Folgende Fragen gilt es zu beantworten:

- Welchen Einfluss hat eine Behandlung mit Doxorubicin auf die Hämodynamik bei C57/Bl6-J-Mäusen?
- Welchen Einfluss hat eine Deletion des B1R bei C57/bl6-J-Mäusen auf die basale Hämodynamik?
- Welchen Einfluss hat eine Deletion des B1R bei C57/bl6-J-Mäusen auf die Hämodynamik bei Tieren, welche mit Doxorubicin behandelt wurden?

- Führt eine Behandlung mit Doxorubicin bei C57/bl6-J-Mäusen zu einer vermehrten Apoptose und Inflammation, und wie wirkt sich eine Deletion des B1R darauf aus?

2. Material und Methode

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Tierversuche erfolgten gemäß § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes nach Erteilung der Genehmigung zur Vornahme von Versuchen an lebenden Wirbeltieren für das Versuchsvorhaben G138/07. Die Genehmigung wurde am 23.05.2005 erteilt. Der tierexperimentelle Teil dieser Arbeit wurde gemäß den Richtlinien des Deutschen Ethikrates und der US-Gesundheitsbehörde NIH und mit Billigung der Ethikkommission der Charité, Campus Benjamin Franklin durchgeführt.

2.1. Studiendesign

Die Tiere wurden vor Beginn der Studie randomisiert in folgende Gruppen eingeteilt:

- 1. Gruppe: C57/bl6-J-Mäuse ($B1^{+/+}$KON)
- 2. Gruppe: C57/bl6-J-Mäuse mit einer Deletion des B1R ($B1^{-/-}$KON)
- 3. Gruppe: C57/bl6-J-Mäuse, welche mit Doxorubicin behandelt wurden ($B1^{+/+}$DOX)
- 4. Gruppe: C57/bl6-J-Mäuse mit einer Deletion des B1R, welche mit Doxorubicin behandelt wurden ($B1^{-/-}$DOX)

Es wurden insgesamt vier Gruppen mit jeweils zehn Mäusen im Alter von zwei Monaten untersucht.

2.2. Mausstämme

20 B1R-Knockout-Mäuse mit C57/bl6-J-genetischem Hintergrund und 20 C57/bl6-J-Mäuse wurden uns für dieses Experiment freundlicherweise von Prof. M. Bader vom Max-Delbrück-Zentrum für Molekulare Medizin in Berlin-Buch zur Verfügung gestellt. Das B1R-Gen wurde aus einer Gen-Bibliothek von 129/SvJ-Mäusen geklont. Der Zielvektor wurde durch Flankieren des Neomycin-Resistenzgens mit einem 1.0-Kilobasen(kb)-Fragment 5´ von der B1R-kodierenden Region und einem 7.0-kb-Fragment 3´ von der B1R-kodierenden Region erstellt. Es erfolgte die Transfektion des

Konstrukts in E14-1-embryonische Stammzellen durch Elektroporation. Gancyclovir-resistente Klone wurden durch PCR identifiziert. Zwei positive Klone wurden in C75/bl6-J-Blastozyten injiziert. Hieraus wurden Keimbahn-Schimären mit heterozygoten Nachkommen für die Zielmutation gezüchtet. Die Transmission des mutierten Allels wurde mittels Southern-Blot-Analyse aus der DNA der Tiere ermittelt. Die B1R-Knockout-Mäuse wurden aus Paarung der heterozygoten Tiere generiert.

2.3. Induktion der Doxorubicin-Kardiomyopathie

Die Induktion der Doxorubicin-Kardiomyopathie erfolgte mit einer einmaligen intraperitonealen Injektion. Zehn B1R-Knockout-Mäuse ($B1^{-/-}$DOX) und zehn Wildtypen ($B1^{+/+}$DOX) erhielten Doxorubicin in einer Dosierung von 20 Milligramm pro Kilogramm Körpergewicht (20mg/kg/KG). Weitere zehn B1R-Knockout-Mäuse und zehn Wildtypen wurden mit NaCl (0,9 %) als Placebo behandelt und dienten als Kontrollen ($B1^{-/-}$KON; $B1^{+/+}$KON).

2.4. Tierhaltung

Alle Tiere wurden während des gesamten Versuchszeitraums in einem Tierstall der Sicherheitsstufe S1 gehalten. Die Räume standen unter Überdruck und wurden nur nach Händedesinfektion mit Schutzkleidung betreten. Die Tiere wurden auf staubfreiem Weichholzgranulat in einem Makrolonkäfig des Typs II gehalten. Die Raumtemperatur lag konstant bei 20°C mit 50-60 % Luftfeuchtigkeit. Die Belichtung erfolgte in einem Zwölf-Stunden-Hell-Dunkel-Rhythmus. Gefüttert wurde *ad libitum* mit Altromin 1324 Alleinfutter und Leitungswasser. Der Gesundheitszustand der Tiere wurde täglich vom Pflegepersonal sowie durch veterinärmedizinische Kontrollen überwacht.

2.5. Hämodynamik-Messung

Die hämodynamische Charakterisierung erfolgte mit der Konduktanz-Methode. Hierbei werden mit einem Koduktanz-Katheter *in vivo* Druck-Volumen-Kurven aufgezeichnet. Aus dieser Messung ergeben sich viele systolische und diastolische Parameter. Die Vielzahl dieser Parameter erlaubt eine sehr genaue Charakterisierung der Herzfunktion und macht die Konduktanz-Methode zum Goldstandard der hämodynamischen Charakterisierung bei Menschen und großen Tieren [96]. Dank der Entwicklung eines

Konduktanz-Katheters für Kleintiermodelle ist es möglich, diese Methode im Maus- und Rattenmodell anzuwenden [97].

2.6. Technik des Konduktanz-Katheters

Aus der kontinuierlichen Messung von Druck und Volumen im linken Ventrikel ergeben sich die Druck-Volumen-Kurven bei der Konduktanz-Methode. Der Katheter ist hierfür mit einem Drucksensor und vier Elektroden ausgestattet. Mittels der Elektroden wird die Leitfähigkeit des Blutes ermittelt; anhand der Formel $V_i(t) = (1/\alpha)\ (pL^2)\ (G_i(t)-G_{pi})$ wird das intraventrikuläre Volumen V_i errechnet. Hierbei ist α ein Volumen-Kalibrationsfaktor, p der elektrische Widerstand des Blutes, L der Abstand zwischen den Elektroden. G_i bezeichnet die Gesamt-Konduktanz und G_{pi} die Konduktanz des umgebenden Gewebes.

2.7. Operativer Eingriff

2.7.1. Narkose

Vor dem Eingriff wurden die Tiere durch eine intraperitoneale Injektion von Thiopental mit einer Dosierung von 125 µg/kg/KG narkotisiert. Die Tiefe der Narkose wurde anhand eines Schmerzreizes überprüft und das Narkotikum bei Bedarf nachinjiziert.

2.7.2. Intubation und Ventilation

Die Tiere wurden in Rückenlage fixiert und unter visueller Kontrolle mit einem Plastiktubus intubiert. Der Tubus wurde nun an eine Beatmungsmaschine angeschlossen. Die korrekte Lage des Tubus wurde mit visueller Kontrolle symmetrischer Thoraxbewegungen überprüft. Die Ventilation erfolgte mit Raumluft. Das Hubvolumen betrug hierbei 8µl/g/KG und die Frequenz 200 Züge pro Minute.

2.7.3. Linksventrikuläre Katheterisierung

Es erfolgte nun ein longitudinaler Hautschnitt an der ventralen Seite des Halses. Die oberflächliche Halsmuskulatur und die Speicheldrüsen wurden durchtrennt, wobei ein Blutverlust konsequent vermieden wurde. Eventuelle Blutungen wurden koaguliert. Nun wurde die rechte Arteria carotis communis dargestellt und sowohl proximal als auch distal wurden Blutsperren angelegt. Mit Mikroinstrumentarium wurde der Konduktanzkatheter in das Gefäß eingebracht und danach retrograd über die

Aortenklappe in den linken Ventrikel vorgeschoben. Unter ständiger Kontrolle der Druck-Volumen-Kurve wurde der Katheter nun optimal platziert.

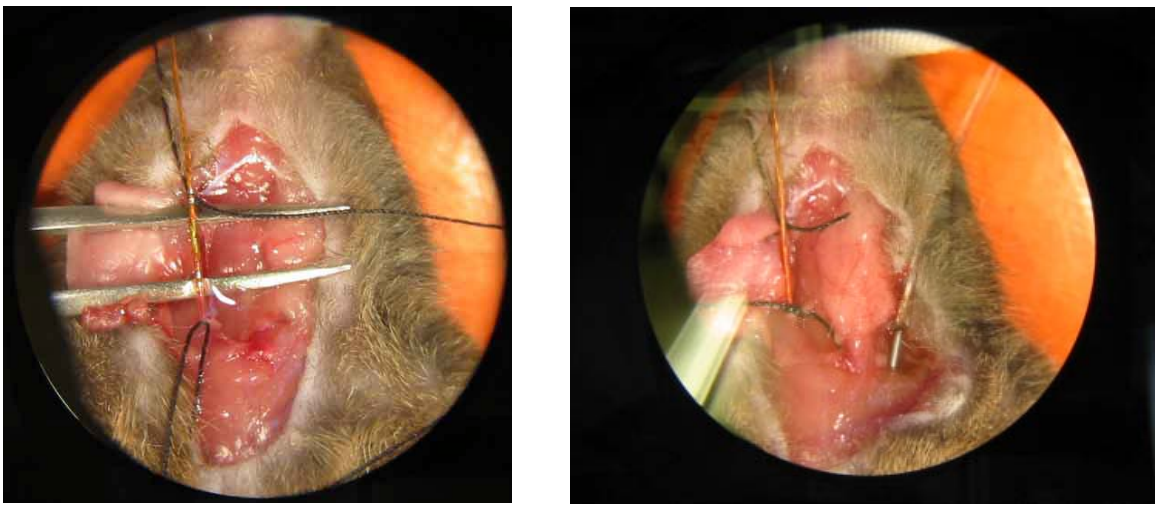


Abbildung 3: Einführen des Konduktanzkatheters in die Arteria carotis

2.7.4. Kalibrierung des Konkuktanz-Volumen-Signals

Das mit dem Katheter ermittelte Volumensignal beinhaltet sowohl die Konduktanz des Blutes als auch des umgebenden Gewebes, was auch als parallele Konduktanz bezeichnet wird. Um diese parallele Konduktanz zu ermitteln, wurde über die linke V. Jugularis 5µl einer 10 % NaCl-Lösung infundiert. Bei gleichbleibendem intraventrikulärem Volumen zeigte sich nun ein starker Anstieg des Konduktanzsignals. Aus diesem Anstieg ließ sich die parallele Konduktanz ermitteln [98].

2.8. Aufzeichnung der Hämodynamik

Die Aufzeichnung der Hämodynamik erfolgte unter Apnoe, um atembedingte Veränderungen der Hämodynamik auszuschließen. Hierfür wurde die Ventilation für fünf Sekunden unterbrochen. Die Herzaktionen während der Apnoe wurden aufgezeichnet und später analysiert.

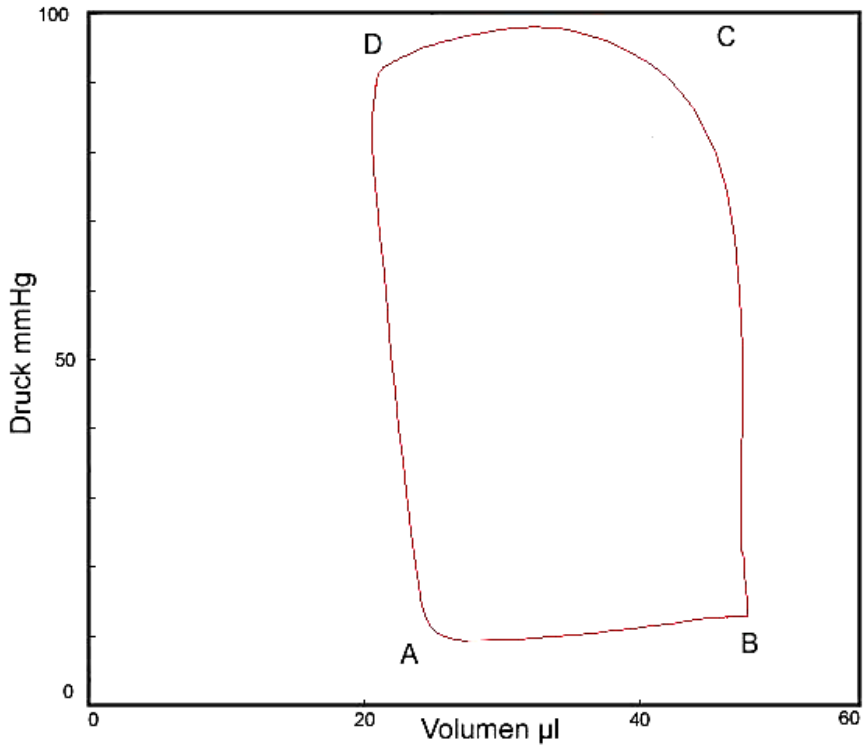


Abbildung 4: Druck-Volumen-Kurve während eines Herzzyklus bei der Maus (eigene Aufzeichnungen)
A) Öffnung der Mitralklappe, B) Schluss der Mitralklappe, C) Öffnung der Aortenklappe, D) Schluss der Aortenklappe

Zur Aufzeichnung von vorlast unabhängigen Parametern wurde die Vene cava für einige Sekunden manuell okkludiert. Dafür wurde am untersten Rippenbogen ein Hautschnitt durchgeführt, die Vena cava kurz unterhalb des Diaphragmas präpariert und mit einer Pinzette für einige Sekunden verschlossen. Die aufgezeichneten Werte wurden zur Analyse der endsystolischen und enddiastolischen Druck-Volumen-Relation, zwei vorlastunabhängigen Parametern der LV-Funktion, genutzt.

2.8.1. Gemessene Parameter

Aus den aufgezeichneten Herzaktionen wurden nun unterschiedliche Parameter ermittelt. Von den einzelnen Parametern wurde jeweils der Mittelwert errechnet.

2.8.2. Systolische Parameter

2.8.3. Maximaler linksventikulärer Druck: LVP max. (mmHg)

Dieser Parameter ist der während einer Systole maximal gemessene linksventrikuläre Druck. Er wird in der Einheit mmHg angegeben.

2.8.4. Linksventrikuläre Druckanstiegsgeschwindigkeit: dP/dt max. (mmHg/s)

Die linksventikuläre Druckanstiegsgeschwindigkeit wird aus der ersten Ableitung der linksventrikulären Druckkurve ermittelt. Sie wird in der Einheit mmHg pro Sekunde (mmHg/s) angegeben. Die Kontraktilität des linken Ventrikels wird auf diese Weise gut wiedergegeben.

2.8.5. LV Endsystolisches Volumen: ESV (µl)

Das endsystolische Volumen ist das Volumen, das nach Beendigung der Systole im linken Ventrikel verbleibt. Es wird in µl angegeben.

2.8.6. Schlagvolumen: SV (µl)

Das Schlagvolumen ist das Volumen, das während der Systole über die Aortenklappe ausgeworfen wird. Es errechnet sich aus der Differenz zwischen enddiastolischem Volumen (EDV) und endsystolischem Volumen (ESV) im linken Ventrikel (SV=EDV-ESV). Die Einheit des Schlagvolumens ist µl.

2.8.7. Ejektionsfraktion: EF (%)

Als Ejektionsfraktion bezeichnet man den prozentualen Anteil des enddialstolischen Volumens, das während der Systole aus dem linken Ventrikel ausgeworfen wird. Die EF ist ein in der Klinik sehr wichtiger und häufig verwendeter Parameter zur Beurteilung der systolischen Funktion. Sie wird mit folgender Formel ermittelt: (maximales Volumen-minimales Volumen) / (maximales Volumen × 100). Die Ejektionsfraktion wird in Prozent angegeben.

2.8.8. Herzfrequenz: HF (b/min)

Die Herzfrequenz bezeichnet die Anzahl der Herzaktionen pro Minute. Sie wird in Herzschlägen (b) pro Minute (min) angegeben.

2.8.9. Herzzeitvolumen: HZV (µl/min)

Das Herzzeitvolumen errechnet sich durch Multiplikation der Herzfrequenz mit dem Schlagvolumen (HF×SV=HZV). Es wird in µl pro Minute angegeben.

2.8.10. Endsystolische Druck-Volumen-Relationen: ESPVR (mmHg/µl)

Während der Okklusion der Vena cava werden bis zu zehn Herzzyklen aufgezeichnet, um dann bei abfallendem Druck durch Reduktion der Vorlast die endsystolische Druck-Volumen-Relation zu errechnen. Die Steilheit der sich ergebenden Kurve ist ein vorlastunabhängiges Maß der systolischen LV Funktion.

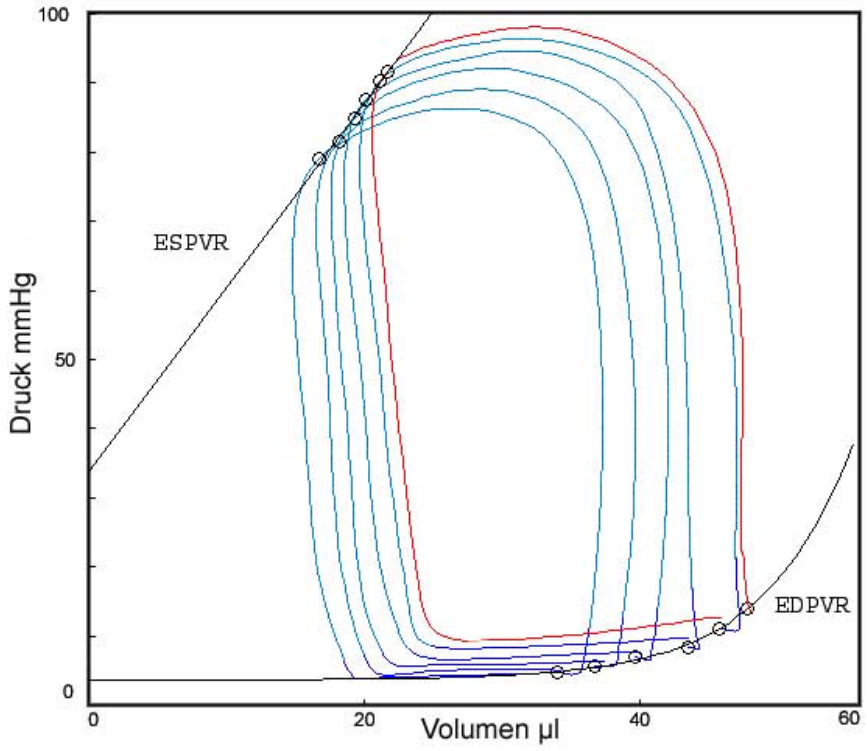


Abbildung 5: Während Reduktion der Vorlast werden Druck-Volumen-Kurven aufgezeichnet sowie die endsystolische Druck-Volumen-Relation (ESPVR) und die enddiastolische Druck-Volumen-Relation (EDPVR) werden berechnet.

2.8.11. Diastolische Parameter

2.8.12. Linksventrikulärer enddiastolischer Druck: LVEDP (mmHg)

Der linksventrikuläre enddiastolische Druck ist der Druck, welcher kurz vor Beginn der Systole im linken Ventrikel vorliegt. Er ist einer der wichtigsten konventionellen Parameter zur Beurteilung der diastolischen Funktion.

2.8.13. LV Druckabfallsgeschwindigkeit: dP/dt min. (mmHg/s)

Die linksventrikuläre Druckabfallsgeschwindigkeit wird analog zur linksventrikulären Druckanstiegsgeschwindigkeit aus der ersten Ableitung der Druckkurve errechnet. Dieser Parameter ist für die Beurteilung der Relaxationsfähigkeit des linken Ventrikels wichtig. Die Relaxation findet vor allem in der frühen Diastole statt.

2.8.14. Tau (ms)

Tau bezeichnet die Zeitspanne zwischen dem Zeitpunkt der maximalen Druckabfallsgeschwindigkeit und einem Zeitpunkt kurz vor Ende der Diastole. Letzterer ist erreicht, wenn nur noch 10 % des maximalen LVP vorliegen. Dieser Parameter bezieht sich ebenfalls auf die Relaxationsfähigkeit des linken Ventrikels.

2.8.15. LV Enddiastolisches Volumen: EDV (µl)

Das enddiastolische Volumen ist das Volumen, welches sich am Ende der Diastole im linken Ventrikel befindet. Es wird in µl angegeben.

2.8.16. Enddiastolische Druck-Volumen-Relationen: EDPVR (mmHg/µl)

Während der Okklusion der Vena cava werden bis zu zehn Herzzyklen aufgezeichnet, um bei abfallendem Druck durch Reduktion der Vorlast die enddiastolische Druck-Volumen-Relation zu errechnen. Die Steilheit der sich ergebenden Kurve ist ein vorlastunabhängiges Maß der diastolischen LV Steifigkeit.

2.9. Weiterverarbeitung des Gewebes

Nach Beendigung der *in-vivo*-Messung wurde das Herz der Tiere für die TUNEL-Färbung und die molekularbiologischen Untersuchungen entnommen. Das Gewebe wurde auf Eis gebettet und sofort weiterverarbeitet. Für die immunhistologische Färbung wurde zur Standardisierung ein 3 mm breiter Querschnitt durch die Ventrikel direkt unterhalb der Vorhöfe angefertigt. Der Schnitt wurde in Tissue Tek eingebettet und in Methylbutan, das mit Flüssigstickstoff auf -70°C abgekühlt worden war, schockgefroren. Tissue Tek besitzt in gefrorenem Zustand nahezu die gleiche Konsistenz wie das Herzmuskelgewebe. Dies ermöglicht die Anfertigung von Schnitten für die nachfolgende Färbung. Methylbutan verhindert eine Schädigung der

Zellmembranen im Zuge des Einfrierens, denn bei sehr schneller Abkühlung des Gewebes können die Zellen platzen, was die Qualität der Schnitte negativ beeinflussen würde. Die Herzspitze wurde für die weitere molekularbiologische und proteinchemische Verarbeitung in Eppendorf-Gefäße eingebracht und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Das Einfrieren und Einbetten des Gewebes diente der Verhinderung von Prozessen wie Autolyse und Austrocknung.

2.10. Anfertigung der Gefrierschnitte

Mit einem Kryostaten (Leica CM 3000) wurden 5 µm dicke Schnitte der in Tissue Tek eingefrorenen Herzbasis angefertigt. Dies erfolgte mit einem Rotationsmikrotom, welches sich in einer auf -30°C abgekühlten Kammer des Kryostaten befand. Die Schnitte wurden auf Objektträger aufgebracht. Die Objekträger wurden vorher zehn Minuten in 0.01 % Poly-L-Lysin eingetaucht und getrocknet, um eine bessere Haftung des Gewebes auf dem Objektträger zu erreichen. Die Schnitte wurden seriell auf die Objektträger aufgetragen, damit sich auf einem Objektträger unterschiedliche Schnittebenen befinden. Die Schnitte wurden daraufhin in eiskaltem Aceton fixiert und bei -20°C bis zur weiteren Verarbeitung gekühlt.

2.11. TUNEL-Färbung der Gefrierschnitte

Die TUNEL-Färbung wurde mit dem *DeadEnd Colorietric* TUNEL *System* (Promega Corparoation, Mannheim, Deutschland) durchgeführt. Mit dieser Färbung lassen sich die für Apoptose typischen DNA-Fragmente nachweisen. Die charakteristischen Strangbrüche werden durch eine enzymatische Reaktion angefärbt. Diese enzymatische Markierung erfolgt durch das Enzym Terminale Desoxynukleotidyl-Transferase, welches die freien 3`-OH Enden des DNA-Strangbruches erkennt und dort biotinylierte Nucleotide anfügt. Anschließend werden die Nucleotide mit *Horse Raddish* Peroxidase gekoppeltem Streptavidin (Streptavidin HRP) markiert, welches infolge der Umsetzung des Substrats mit Carbazol sichtbar wird.

Die Schnitte wurden mit 1xPBS (137 mM NaCl; 2,68 mM KCL; 1,74 mM KH_2PO_4; 8,1 mM NaH_2PO_4) inkubiert und anschließend in 10 % gepuffertem Formalin fixiert. Diese Fixierung führte zur Bildung von vernetzten Mehtylenbrücken. Um die behinderten Bindungsstellen freizulegen, wurden die Objektträger mit Proteinase K behandelt. Diese wurde mit Proteinase K-Puffer (100 mM Tris-HCL mit pH 8,0; 50 mM EDTA) in einem Verhältnis von 1:500 verdünnt. Die Schnitte wurden nach zweimaligem

fünfminütigem Waschen in PBS erneut in Formalin fixiert. Im Anschluss wurden sie für zehn Minuten in Equilibrationspuffer (200 mM Potassium cacodylate; 25 mM Tris-HCL; 0,2 mM DTT; 0,25 mg/ml BSA; 2,5 mM Cobalt Chloride) gepuffert und dann für eine Stunde bei 37°C mit einer rTdT-Mix inkubiert. Letzteres bestand aus Equilibrationspuffer, biotinyliertem Nucleotid-Mix (1:10) und rTdT-Enzym (1:10). Die Reaktion wird durch Zugabe von mit Aqua dest. 1:10 verdünnter SSC-Stocklösung nach erneuter fünfzehnminütiger Inkubation beendet. Um die gewebseigene Peroxidase zu blockieren und so unspezifische Färbereaktionen des Carbazols zu verhindern, wurden die Schnitte fünf Minuten mit 0,3 % H_2o_2 behandelt. Die Bindung mit Streptavidin-HRP erfolgte nun mittels 30-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur. Die Schnitte wurden zwischen den einzelnen Färbeschritten zweimal fünf Minuten in PBS gewaschen. Nun erfolgte die Umsetzung des Substrats Carbazol durch HRP. Der Ansatz der Lösung bestand aus 10 mg Carbazol in 10 ml N,N-Dimethylformamid, einer Lösung aus 35 ml 0,2M Natriumacetat, 15 ml 0,2M Essigsäure, 150 ml Aqua dest. und 100 µl 30 % H_2O_2. Anschließend wurden die Objektträger durch kurzes Eintauchen in Hämalaun gegengefärbt; die Schnitte wurden mit Glyceringelatine eingedeckt und mit Deckgläschen versehen. Die positive Gegenkontrolle erfolgte durch eine zehnminütige Behandlung mit DNAse I, welche in DNAse-Puffer im Verhältnis 1:5 verdünnt wurde (Quiagen, Hilden, Deutschland). Mit diesem Verfahren wird die zelleigene DNA fragmentiert und so die Bindung der biotynilierten Nucleotide nicht nur an die DNA apoptotischer Zellen ermöglicht. Die Negativkontrolle wurde mit Aqua dest. anstatt mit rTdT-Mix behandelt.

2.12. Mikroskopische Auswertung

Die lichtmikroskopische Auswertung der Schnitte erfolgte mit einem Mikroskop der Firma Zeiss. Die Anzahl der positiv markierten Zellen wurde pro mm^2 Gewebe angegeben. Die Auswertung erfolgte in 200facher Vergrößerung. Pro Versuchstier und Färbung wurden mindestens zwei Gewebeschnitte mäanderförmig analysiert. Die Färbereaktion wurde mit der Software Lucia G (Version 3,51) der Firma Imaging Laboratories dokumentiert und jeweils mit einem selbst angepassten Makro quantifiziert.

2.13. Molekularbiologische Methoden

Um Verunreinigungen zu vermeiden, wurden alle Versuche auf sauberen, desinfizierten Arbeitsflächen durchgeführt. Glasgeräte wurden vor Verwendung bei 250°C fünf Stunden ausgebacken und Plastikgeräte autoklaviert. Es wurden ausschließlich sterile, RNAse-freie Substanzen und Materialien verwendet. Alle nicht erworbenen Lösungen wurden mit Diethylpyrocarbonat (DEPC), Arbeitsflächen sowie Arbeitshandschuhe mit RNAse-Zap behandelt.

2.13.1. Realtime RT PCR

Um eine Aussage über die Regulation der Expression der Bradykinin-Rezeptoren B1R und B2R bei den B1R-Knockout-Tieren ($B1^{-/-}$KON) und Wildtypen ($B1^{+/+}$KON) unter Basalbedingungen und nach der Behandlung mit Doxorubicin ($B1^{+/+}$DOX, $B1^{-/-}$DOX) treffen zu können, wurde die mRNA durch die RT-PCR quantifiziert. Weiterhin wurde die mRNA für das proinflammatorische Zytokin IL-6 quantifiziert, um Erkenntnisse zur intrakardialen Inflammation zu gewinnen. Wiederum wurden alle vier Gruppen ($B1^{+/+}$KON, $B1^{-/-}$KON, $B1^{+/+}$DOX, $B1^{-/-}$DOX) miteinander verglichen, um die Wirkung der Doxorubicin-Behandlung und den Einfluss des B1R nach Behandlung und unter Basalbedingungen zu charakterisieren. Bei der RT-PCR wird die isolierte RNA zunächst in DNA umgeschrieben, dann durch PCR amplifiziert; schließlich werden die DNA-Mengen quantifiziert.

2.13.2. Isolierung der mRNA

Die Isolierung der mRNA erfolgte nach einem leicht modifizierten Protokoll der Firma Quiagen. Die bei -80°C eingefrorenen Präparate wurden gewogen und in Eppendorf-Gefäße gegeben, welche zuvor mit 400 µl Trizol gefüllt worden waren. Nun wurde das Material mit einem Homogenisator zerkleinert und nach erneuter Zugabe von 400 µl Trizol fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nun wurden 160 µl Chloroform hinzugegeben, die Proben 15 Sekunden geschwenkt und abermals für drei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Proben 15 Minuten bei 4°C und 12.000 g zentrifugiert. Es entstanden drei Phasen: Die obere, wässrige Phase enthielt RNA, die unteren DNA und Protein. Die obere Phase mit der RNA wurde abpipettiert und in ein weiteres Reaktionsgefäß überführt. Die Protein- und DNA-haltige Unter- und

Interphase wurden für die spätere Proteinextraktion bei -20°C gelagert. Dann wurde 400 µl Isopropanol in das Gefäß gegeben, um die RNA auszufällen. Nach zehn Minuten Inkubationszeit bei 4°C wurde die Probe abermals zentrifugiert (10 min., 12.000 g, 4°C). Die ausgefällte RNA sammelte sich als Pellet am Boden des Reagenzgefäßes. Der Überstand wurde abpipettiert und verworfen, das Pellet in 100 µl RNAse-freiem Wasser aufgelöst und zur Aufreinigung mit dem RNeasy®Kit behandelt. Die RNA wurde mit in 250 µl RLT-Puffer aufgelöstem 1 % 2-Mercapto-Ethanol und 250 µl Ethanol vermischt und auf die RNeasy-Mini-Spin-Säule gegeben. Nun wurde für 15 Sekunden bei Raumtemperatur mit 10.000 rpm zentrifugiert, um die RNA an die Mini-Spin-Säule zu binden. Nach Entfernung der Flüssigkeit wurde der Mini-Spin-Säule 350 µl Waschpuffer hinzugefügt und abermals zentrifugiert (15 Sekunden, Raumtemperatur, 10.000 rpm). Dem DNA-Verdau diente das RNAse free DNAse Set der Firma Quiagen. 10µl DNAse wurden mit 70 µl RDD-Puffer vermischt, das Gemisch wurde auf die Säulen gegeben und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nun wurde Waschpuffer RW1 hinzugefügt und erneut zentrifugiert (15 Sekunden, Raumtemperatur, 10.000 rpm). Diese Zentrifugation wurde nach Hinzufügen von 500 µl RPE-Puffer erneut für zwei Minuten wiederholt. Nun wurde der Puffer entfernt und erneut für eine Minute bei Raumtemperatur (10.000 rpm) zentrifugiert, um die Säule zu trocknen. Die Säule wurde nun in RNAse-freiem Wasser aufgelöst. Hierfür wurden 50 µl RNAse-freies Wasser hinzugefügt, das Gemisch fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend für eine Minute bei Raumtemperatur zentrifugiert (13.200 rpm). Dieser Schritt wurde nochmals mit 30 µl RNAse-freiem Wasser wiederholt. Die Konzentration der RNA wurde in 1 µl der Lösung bestimmt. Hierfür wurde der Nanodrop (Thermo Scientific PEQLAB, Erlangen) mit dem Programm Nanodrop-1000 v3.1.2. verwendet. Die Qualität der RNA wurde mittels A260/A280 Ratio ermittelt, wobei ein Wert von 1,8 bis 2,0 erzielt werden musste.

2.13.3. Reverse Transkription

Mithilfe des Enzyms Reverse Transkriptase wurde die RNA in cDNA umgeschrieben, um eine spätere Quantifizierung mittels PCR zu ermöglichen. Vorab wurde die isolierte RNA bei 70°C denaturiert. Hierfür wurden 2 µg der RNA und 10 µl H_2O gelöst. Die Transkription erfolgte mit einem Kit der Firma Applied Biosystems. Dieses enthält das Enzym Reverse Transkriptase, welches die RNA in cDNA umschreibt, und dNTPs als Grundsubstanz für das Enzym. Weiterhin befinden sich in dem für die Reverse

Transkription hergestellten Master Mix Random Primer – kurze Oligonukleotide, welche sich an die RNA anlagern und als Ansatzstellen für die Reverse Transkriptase fungieren – sowie ein Puffer und RNase-freies Wasser. 2 µg der RNA wurden für einen Einfachansatz angesetzt. Dies entsprach einer Menge von 10 µl RNA. Nun wurden 2 µl RT-Puffer, 0.8 µl dNTP-Mix, 2 µl Random Primer, 1 µl MultiScribe Reverse Transcriptase (50 U/µl) und 3.2 µl RNase-freies Wasser hinzugegeben. Sollten größere Mengen der RNA umgeschrieben werden, wurden entsprechend größere Mengen der Reagenzien im gleichen Mischverhältnis verwendet. Die Transkription erfolgte mit einem Thermo Cycler zehn Minuten bei Raumtemperatur, dann zwei Stunden bei 37°C und zuletzt für fünf Minuten auf Eis. Nach der Reversen Transkription wurde die cDNA entweder bei -20°C eingefroren oder gleich zur quantitativen PCR weiterverwendet.

2.13.4. Realtime Polymerase-Kettenreaktion (Realtime-PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion erlaubt es, geringe Mengen cDNA so zu vervielfältigen, dass ein semiquantitativer Vergleich zwischen unterschiedlichen Proben möglich ist. Spezifische *Primer*, kurze, das Zielgen flankierende Oligonukleotide, ermöglichen die Vervielfältigung des gewünschten cDNA-Abschnittes. Durch Erhitzen in einem Thermocycler werden die beiden komplementären cDNA-Stränge durch Denaturierung getrennt. Dann können sich die *Primer* an die cDNA anlagern (*Annealing*). Die eigentliche Amplifikation erfolgt durch eine thermostabile DNA-Polymerase. Das Enzym synthetisiert vom 3’-Ende ausgehend den komplementären Strang. Nach der Synthesephase liegen nun wieder zwei Doppelstränge vor. Denaturierung, *Annaeling* und Synthese werden nun je nach Gen unterschiedlich oft wiederholt. Dabei verdoppelt sich nach jedem Zyklus der DNA-Gehalt.

Bei der RT-PCR ist ein direkter Rückschluss auf die zu Beginn der Reaktion vorliegende Menge an cDNA möglich. Beim *TaqMan Assay* bindet zwischen den *Primern* ein fluoreszenzmarkiertes Oligonukleotid, dessen Aktivität von einem am 3’-Ende liegendem *Quencher* unterdrückt wird. Durch die Exonuklease-Aktivität in 5‘-3‘-Richtung der Taq-Ploymerase wird die kurze, sequenzspezifische Sonde, welche fluoreszierenden Farbstoff und *Quencher* enthält, zerlegt. Fluoreszierender Farbstoff und *Quencher* liegen nun weit auseinander und die Fluoreszenz kann detektiert werden. Sobald die Fluoreszenz einen Schwellenwert überschreitet, wird sie mit dem *Cycler* gemessen. Sie ist direkt proportional zu der DNA-Menge im Testansatz. Die

Anzahl der Zyklen, welche benötigt werden, um den Schwellenwert zu erreichen, wird als CT-Wert bezeichnet. Ausgehend von dem CT-Wert kann man nun die Genexpression berechnen.

Die quantitative PCR wurde mit einem *Kit* der Firma Applied Biosystems durchgeführt. Es wurden die Genprodukte von IL-6, B1R und B2R quantifiziert. Die Expression der unterschiedlichen Gene wurde mittels Bestimmung der 18s rRNA normalisiert und damit relativ zur 18s rRNA dargestellt. In die Vertiefungen einer 96-well-Platte wurden jeweils 10 µl TaqMan-Mastermix, 1 µl Genexpressionsassay, 8 µl autoklaviertes Aqua Dest. und 1 µl cDNA pipettiert. Die Amplifizierung erfolgte in einem *Cycler* in drei Stufen: die erste bei 95°C zehn Minuten, die zweite 15 Sekunden bei 95°C, die dritte eine Minute bei 60°C. Schritt zwei bis drei wurde zyklisch 41 Mal wiederholt. Alle Proben wurden einer Doppelbestimmung unterzogen; bei einer Abweichung der ermittelten Ct-Werte um 0,5 wurde eine dritte PCR durchgeführt. Die Ct-Werte wurden dann mit dem Programm SDS 2.2. ermittelt und mit Excel und Graph Pad ausgewertet.

2.14. Proteinchemische Methoden

2.14.1. Western Blot

Der Western Blot dient der spezifischen Detektion von Proteinen. Nach der elektrophoretischen Auftrennung werden diese Proteine auf eine PVDF-Membran transferiert. Spezifische Antikörper binden an die Proteine auf der Membran und ein mit Peroxidase enzymmarkierter Sekundärantikörper bindet an das Fc-Fragment des Primärantikörpers. Daraufhin wird Luminol hinzugegeben, welches in einer Peroxidase katalysierten Reaktion zu einem cyclischen Peroxid oxidiert. Bei dieser Reaktion wird Licht emittiert, welches im Bereich blauempfindlicher Standard-Röntgenfilme liegt. Ein Röntgenfilm wird in einer Röntgenkassette von der PVDF-Membran belichtet. Die Auswertung dieses Röntgenfilmes erlaubt dann die Berechnung der Expressionswerte für die jeweiligen Proteine. Für vorliegende Arbeit wurden die Expressionswerte von Akt, Bax, Bcl-2 und GAPDH bestimmt.

2.14.2. Protein-Extraktion

Die aus der RNA-Extraktion verbliebenen Unter- und Interphasen wurden für die Proteinextraktion weiterverwendet. Zu den Proben wurde 240 µl, -20°C kaltes Ethanol hinzugegeben, das Gemisch drei Minuten inkubiert und anschließend zentrifugiert (2.000 g, 4°C, 5 min.) Der Überstand wurde weiterverarbeitet und die Proteine durch Zugabe von 1200 µl Isopropanol ausgefällt. Das Gemisch wurde zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend zentrifugiert (12.000 g; 4°C). Der Überstand wurde verworfen und die Proteine dreimal in einer 1,6 ml Lösung aus 0,3 M Guanidiniumhydrochlorid in 95 % Ethanol inkubiert. Anschließend wurden die Proteine bei Raumtemperatur 20 Minuten inkubiert und fünf Minuten zentrifugiert (7.500 g, 4°C). Nun wurden die Proteine in 2 ml 100 % Ethanol gewaschen und abermals für 20 Minuten inkubiert und zentrifugiert (5 min., 4°C, 7.500g). Nach dem Waschen wurden die Proteine für 15 Minuten an der Luft getrocknet und nach Zugabe von Resuspensionspuffer (300 mM Tris-HCL, 5 % Sucrose, 5 % SDS, 0,25 mg/ml Pyronin G) bei 50°C und 1.000 rpm schüttelnd gelöst. Anschließend wurden alle nicht gelösten Teile durch Zentrifugation zehn Minuten bei 10.000 g und 4°C sedimentiert.

2.14.3. Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung der Proteine aufgrund ihrer Ladung und ihrer Größe erfolgte in einer Elektrophoresekammer. Hierfür wurden die Proteine mit Aqua dest. und Laemmli-Puffer (779,6 mM Glycerin; 1 M Tris-HCL; 19,8 mM SDS; 0,358 mM ß-Mercaptoethanol, 14,4 mM Bromphenolblau; pH 6.8) bei 95°C denaturiert und in ein Polyacrylamid-Elektrophoresegel, bestehend aus einem 5 % Sammelgel und einem 10 % Trenngel, eingebracht. Es wurden jeweils 30 µg des Proteins aufgetragen. Nun wurden die Gele in die mit Elektrophoresepuffer (0.025 M Tris-OH; 0.192 M Glycin; 0.1 % SDS ad; pH 8.4) gefüllte Elektrophoresekammer eingesetzt und die Elektrophorese mit 20 mA pro verwendetem Gel eine Stunde durchgeführt. Als Größenstandard diente ein gefärbtes Proteingemisch bekannter Molekulargrößen.

2.14.4. Proteintransfer durch Western Blot

Im folgenden Schritt wurden die Proteine in einer Blotting-Kammer der Firma BioRad auf eine PVDF-Membran transferiert. Hierfür wurde eine PVDF-Membran in der Größe des Gels in 100 % Methanol zehn Sekunden inkubiert und anschließend fünf Minuten in destilliertem H_2O gewaschen. Nun wurde die Membran zehn Minuten im Anodenpuffer

äquilibriert. Ein Sandwich Blot, bestehend aus Filterpads, Filterpapier, PVDF-Membran und dem Polyacrylamidgel, wurde luftblasenfrei zusammengesetzt und die Blotting-Kammer eingesetzt. Die Kammer wurde nun mit dem Transferpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, pH 8,3) gefüllt. Der Transfer erfolgte über eine Stunde bei 100 mA und 4°C. Hierbei dienten die vorgefärbten Molekulargewichtsmarker der Überprüfung des Transfers.

2.14.5. Nachweis der Proteine mittels Western-Blot-Analyse

Nun erfolgte die Bindung der entsprechenden Antikörper auf der PVDF-Membran. Im Vorfeld wurde die PVDF-Membran mit TBS-Puffer (200 mM Tris/HCl, 1,37 M NaCl, pH 7,6) fünf Minuten gewaschen. Anschließend wurde die Membran eine Stunde in 25 ml Blockpuffer (5 % Magermilchpulver in 10 mM Tris-HCL, 150 mM NaCl, 0,05 % Tween) bei Raumtemperatur inkubiert und dann mehrmals mit TBS/T-Puffer (20 mM Tris-HCl, 137 mM NaCl, 0,1 % Tween 20, pH 7,6) gewaschen. Als Primärantikörper wurden Kaninchen-Antiseren in einer 1:1000-Verdünnung verwendet. Für die Verdünnung wurden TBS/T-Puffer und 0,4 % Mic-O-Protect verwendet. Die PVDF-Membran wurde mit dem Antikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Membran mehrmals mit TBS/T gewaschen. Als zweiter Antikörper wurde ein mit Peroxidase markierter Ziege-Anti-Kanninchen-Antikörper in einer 1:2000-Verdünnung eingesetzt. Die Membran wurde für eine Stunde mit dem sekundären Antikörper bei Raumtemperatur inkubiert und dann mehrfach mit TBS/T-Puffer gewaschen. Nun konnte der Blot mit dem ECL-Kit der Firma Amersham entwickelt werden. Der überschüssige Puffer wurde durch Ablaufen von der Membran entfernt. In einer Mischung aus den Luminol-Lösungen A und B im Verhältnis 40:1 wurde die Membran nun fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Hierfür wurde die Membran auf eine Einschweißfolie platziert. Nach der Inkubation wurde die überschüssige Detektionslösung durch Ablaufen von der Membran entfernt und die Einschweißfolie luftblasenfrei verschlossen. Die Membran wurde in einer Röntgenkassette mit einem Röntgenfilm platziert. Die Expositionszeit betrug 15 Sekunden bis eine Stunde. Durch Zugabe von Luminol entsteht in einer Peroxidase-katalysierten Reaktion ein kurzlebiges cyclisches Peroxid, das Licht emittiert. Infolge der Emission wird ein Röntgenfilm belichtet, welcher dann zur weiteren quantitativen Bestimmung der Proteine verwendet wird.

2.14.6. Auswertung des Western Blots

Die Auswertung erfolgte mit der Software Scion Image. Hierbei wurde die Bandenstärke auf dem jeweiligen Röntgenfilm in Pixel umgerechnet. Die in den Myocardproben errechneten Expressionswerte für die Proteine Bax, Bcl-2 und Akt wurden anhand der Expression von GAPDH in den gleichen Proben normalisiert.

2.15. Genutze Materialien

Arbeitsgerät	**Bezeichnung**	**Bezug**
Autoklaviergerät		Hartmann
Beatmungsgerät	Mouse Minivent	Hugo Sachs
Blot-Kammer	Mini Trans Blot	Bio-Rad
Set für die TUNEL Färbung	DeadEnd Colorietric TUNEL System	Promega
Elektronische Waage	DMS 580	Kern
Elektrophoresekammer	Mini-Protean® 3 Cell	Bio Rad
Katheterhalter	00574-11	Fine Science Tools
Kryostat	CM 3000	Leica
Konduktanzkatheter		Miller
Mikroschere	18000-08	Fine Science Tools
Nanodrop		Thermo Scientific
PCR-Maschine	Mastercycler gradient	Eppendorf
Pinzetten		Fine Science Tools
Pipetten	Reference	Eppendorf
Präzisionswaage		Sartorius
Schere	14074-11	Fine Science Tools
Schüttler	3015 (ISH)	GFL
Thermocycler		Applied Biosystems

Tischzentrifuge	Centrifuge 5415 C	Eppendorf
Vortexgerät	VF 2	IKA-Labortechnik
Zentrifuge	Megafuge 1.OR	Heraeus
Zeiss Axioskop	Axioskop	Zeiss
Verbrauchsartikel	**Bezeichnung**	**Bezug**
96-Well-PCR-Platte		Kisker
0,2 ml Reaktionsgefäße		Biozym
0,5 ml Reaktionsgefäße	RNAse frei	Eppendorf
0,5 ml Reaktionsgefäße	Safe-Lock	Eppendorf
1,5 ml Reaktionsgefäße	Safe-Lock	Eppendorf
15 ml Reaktionsgefäße	Falcon tubes	Sarstedt
50 ml Reaktionsgefäße	Falcon tubes	Sarstedt
Deckgläschen		Menzel Gläser
Einmalhandschuhe		Ansell Medical
Objektträger	76x26 mm	Menzel-Gläser
PCR-Tubes	0,2 ml	Biozym
Pipettenspitzen 10,100, 1000 µl	Unsteril	Eppendorf
Pipettenspitzen 10,100, 1000 µl	Mit Filtertip, RNAse frei	Biozym Diagnostik
Polyacrylamidgel	7,5% Tris-HCL-Gel	Bio-Rad
PVDF-Membran		Bio-Rad
Tubus	Braunüle 22G Adsyte Pro	Becton Dickinson
Zentrifugationsgefäße		Kendro
Reagenzien	**Name**	**Bezug**
Aceton	Pro analysi	Merck
Aqua bidest.	Aqua Spüllösung	Delta Select
ß-Mercaptoethanol		Sigma
Bromphenolblau		Sigma
Chloroform		Merck
Cobalt Chloride	Colbaltchlorid	Sigma
DEPC	Diethylpyrocarbonat	Sigma

DEPC-treatet water	RNAse freies Wasser	Ambion
DTT	Dithiothreitol	Promega
DNAse I	RNAse frei	Roche
DNAse Puffer		Quiagen
ECL Kit	ECL Plus	Amersham
EDTA	Ethylenediaminetetracetic	Merck
Ethanol absolut	Pro analysi	Merck
Essigsäure		Merck
Formalin	Formaldehyd	Merck
Glycin		Serva
Glycerin		Roth
Guanidiniumhydrochlorid		Merck
H_2O_2	Wasserstoffperoxid	Sigma
Hämalaun		Merck
Isopropanol	2-Propanol	Merck
Kayser's Glyceringelantine		Merck
KCL	Kaliumchlorid	Merck
KH_2PO_4	Kaliumdihydrogenphosphat	Merck
Luminol		Roth
Magermilchpulver	Blotting Grade Blocker Non-Fat Dry Milk	Bio-Rad
Methanol		J.T. Baker
Methylbutan		Merck
Mic-O-Protect		Boeringer
NaCl	Natriumchlorid	Merck
NaH_2PO_4	Natriumdihydrogenphosphat	Merck
Natriumacetat		Merck
N,N-Dimethylformamid		Merck
Poly-L-Lysin		Sigma
Potassium cacodylate		Sigma
Primer		TIB Molbiol
Pyronin		Merck

Reverse Transcription Set		Applied Biosystems
RNAse free DNAse Set		Quiagen
RNAse free Water		Quiagen
RNAse Zap		Ambion
RNeasy Kit		Quiagen
SDS	Sodium Laury Sulfate	Sigma
TaqMan Universal PCR Masermix		Applied Biosystems
Thiopental	Trapanal	Glaxo Smith
Tissue Tek		Sakura
Tris		Merck
Tris-HCL	Trishydroxymethyl-aminomethanhydrochlorid	Merck
Trizol LS Reagent		Invitrogen
Tween	Tween 20	Aldrich

2.16. Statistische Analyse

Zur zufallskritischen Absicherung der beobachteten Werte ist die Anwendung statistischer Testverfahren unerlässlich. Für die hier verwendeten Tests wurde ein Ergebnis mit einer Fehlerwahrscheinlichkeit von $p \leq 0.05$ als ein signifikantes Ergebnis gewertet, wobei jeweils das genaue Signifikanzniveau als p-Wert angegeben wurde. P-Werte größer 0.05 wurden folglich als nicht signifikantes Ergebnis (n.s.) gewertet. Die Auswertung wurde mit SPSS 11.0 durchgeführt.

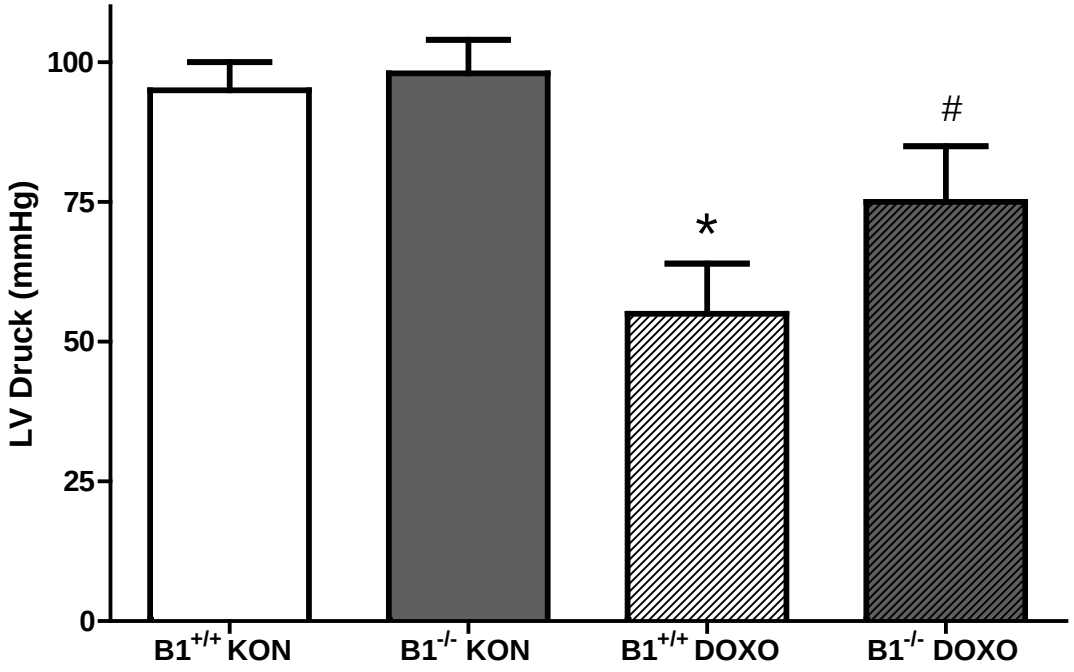
Die statistische Auswertung der Gruppenunterschiede wurde mittels der ANOVA-Prozedur (Analysis of Variance) berechnet. Die ANOVA ist an folgende Voraussetzungen geknüpft: Die Fehlerkomponenten müssen normalverteilt sein, die Fehlervarianzen müssen homogen und die Fehlerkomponenten müssen voneinander unabhängig sein. Nachdem die ANOVA-Prozedur signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen offenbarte, wurde als Post-HOC-Test der Bonferroni-Test angewandt.

3. Ergebnisse

3.1. Hämodynamische Messung

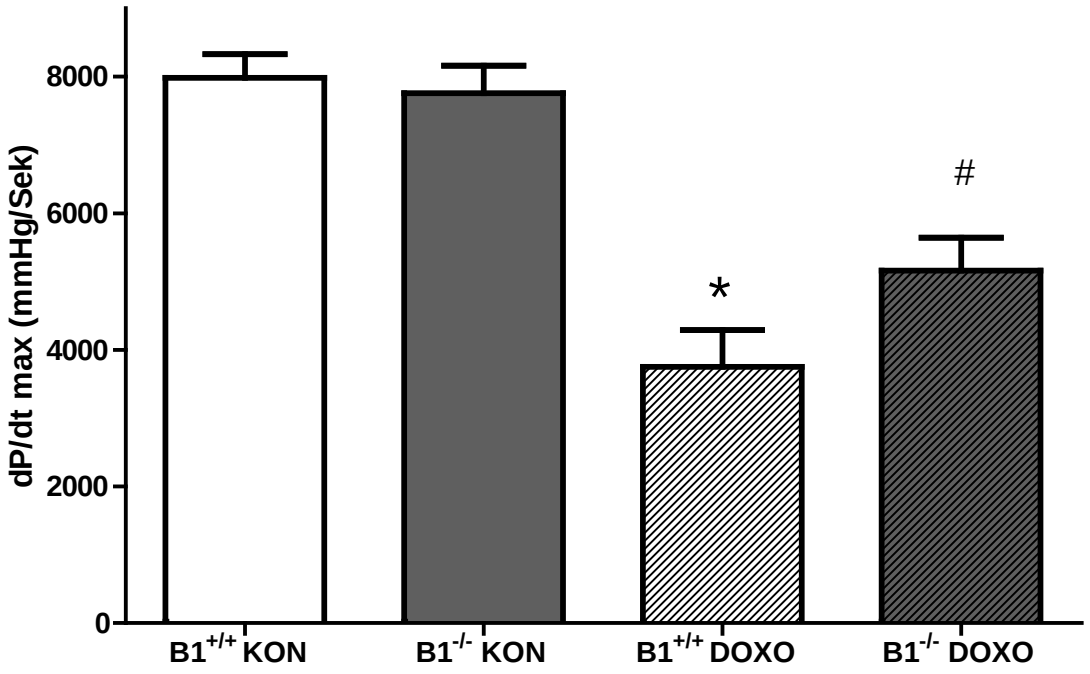
3.1.1. Systolische Parameter

Maximaler linksventrikulärer Druck: LVP max. (mmHg)



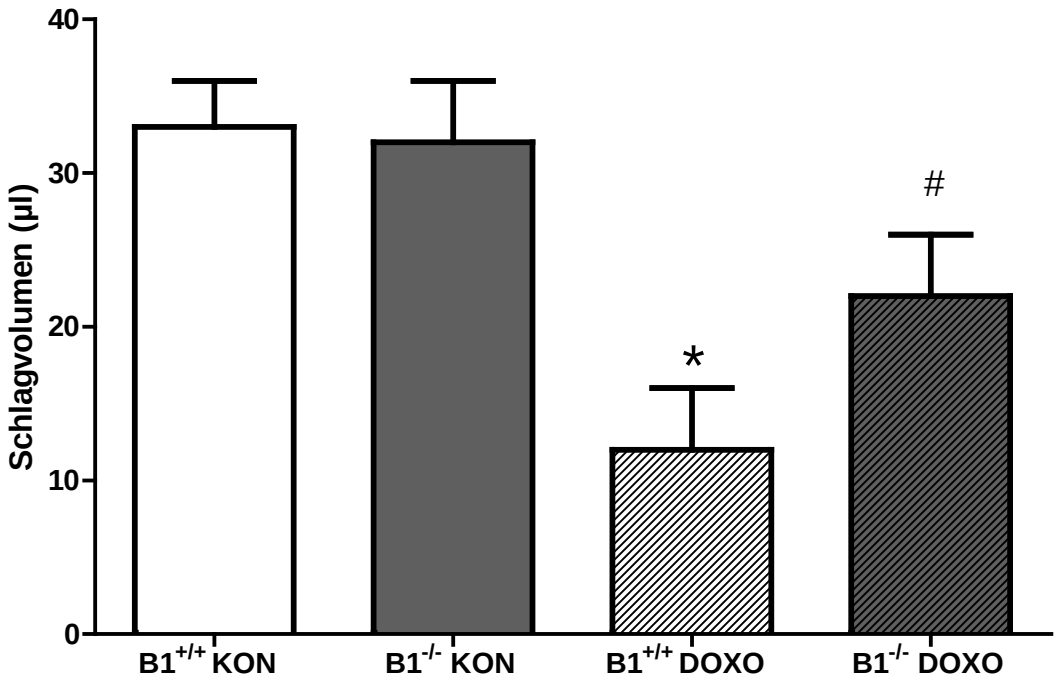
Bei den mit Placebo behandelten Kontrollgruppen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede im LVP max. zwischen den Wildtypen ($B1^{+/+}$KON) und den B1-Rezeptor-Knockout-Mäusen ($B1^{-/-}$KON). Eine Behandlung mit Doxorubicin führte bei den Wildtypen ($B1^{+/+}$DOX) zu einer signifikanten Verringerung des LVP max. Die mit Doxorubicin behandelten B1-Rezeptor-Knockout-Mäuse ($B1^{-/-}$DOX) zeigten im Vergleich zu den mit Doxorubicin behandelten Wildtypen ($B1^{+/+}$DOX) einen signifikant höheren LVP max.

Linksventrikuläre Druckanstiegsgeschwindigkeit: dP/dt max. (mmHg/s)



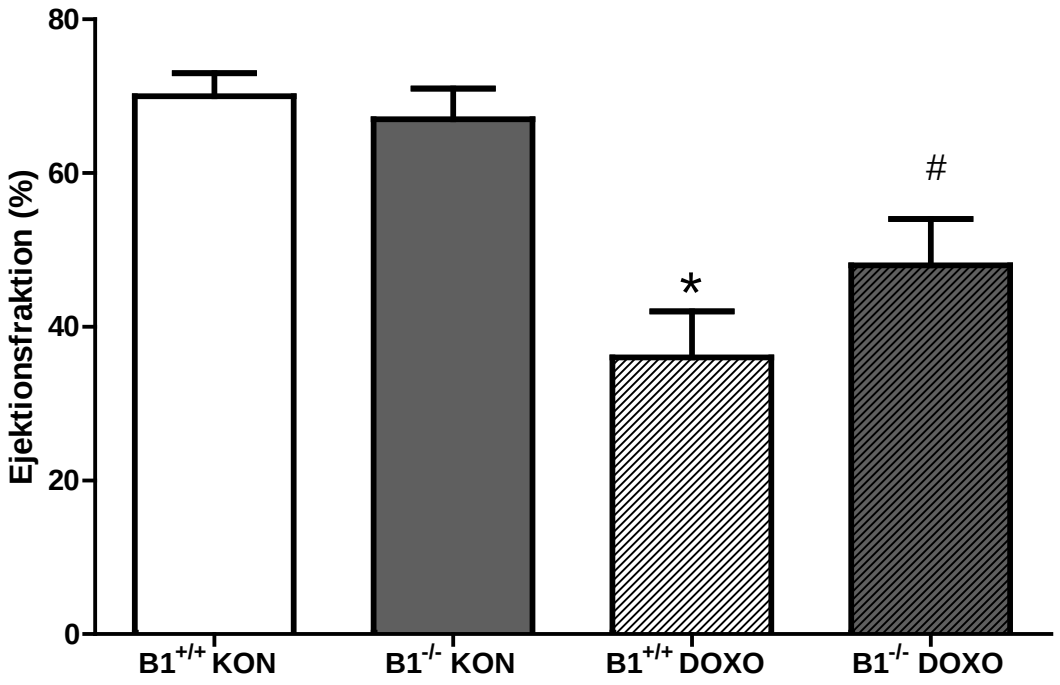
Bei den mit Placebo behandelten Kontrollgruppen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede der dP/dt max. zwischen den Wildtypen ($B1^{+/+}$KON) und den B1-Rezeptor-Knockout-Mäusen ($B1^{-/-}$KON). Die Behandlung mit Doxorubicin führte bei den Wildtypen ($B1^{+/+}$DOX) zu einer signifikanten Reduktion der dP/dt max. Die B1-Rezeptor-Knockout-Mäuse ($B1^{-/-}$DOX) wiesen nach der Behandlung mit Doxorubicin eine signifikant höhere dP/dt max. im Vergleich zu den mit Doxorubicin behandelten Wildtypen ($B1^{+/+}$DOX) auf.

Schlagvolumen: SV (µl)



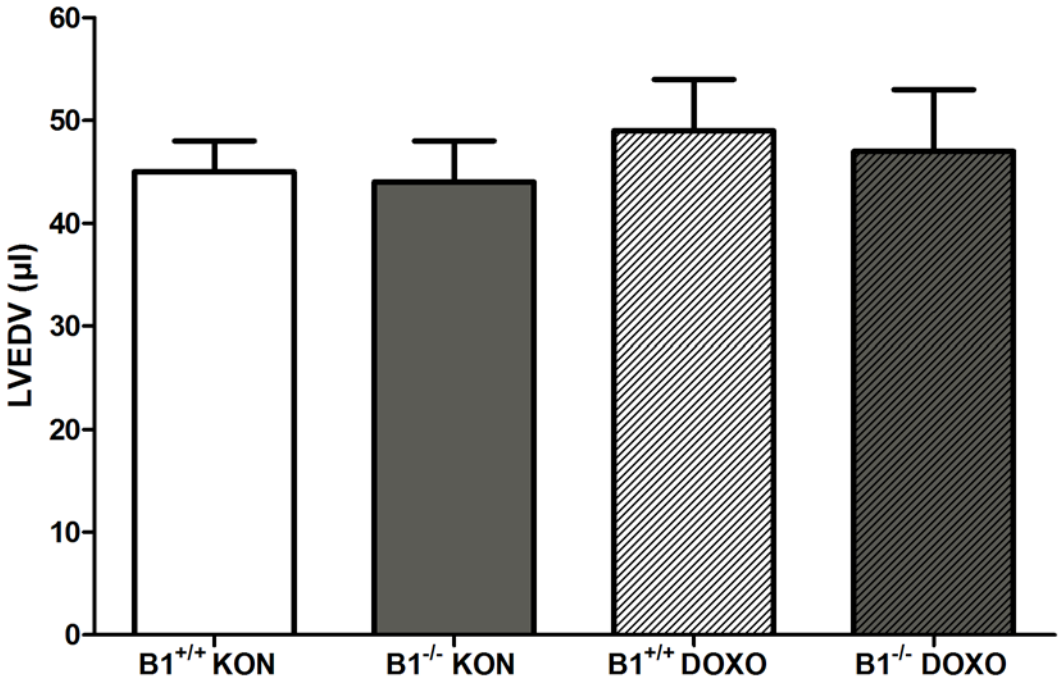
Bei den Kontrollgruppen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede des Schlagvolumens zwischen den Wildtypen ($B1^{+/+}$KON) und den B1-Rezeptor-Knockout-Mäusen ($B1^{-/-}$KON). Die Behandlung mit Doxorubicin führte bei den Wildtypen ($B1^{+/+}$DOX) zu einer signifikanten Reduktion des Schlagvolumens. Die B1-Rezeptor-Knockout-Mäuse ($B1^{-/-}$DOX) wiesen nach der Behandlung mit Doxorubicin ein signifikant höheres Schlagvolumen im Vergleich zu den mit Doxorubicin behandelten Wildtypen ($B1^{+/+}$DOX) auf.

Ejektionsfraktion: EF (%)



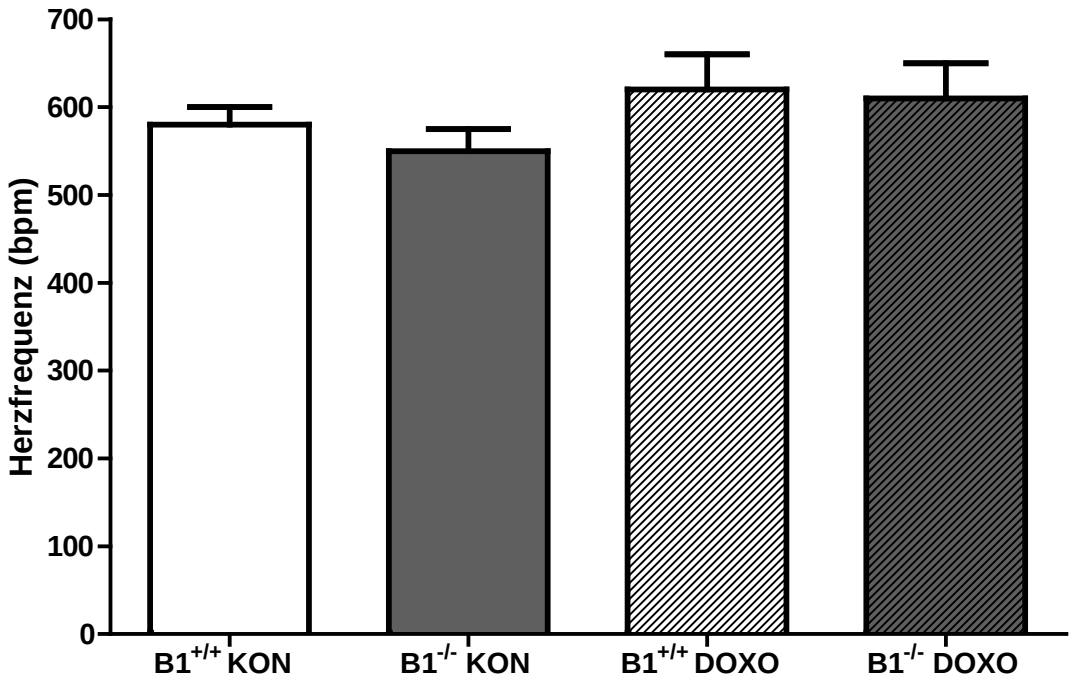
Bei den Kontrollgruppen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede der Ejektionsfraktion zwischen den Wildtypen ($B1^{+/+}$KON) und den B1-Rezeptor-Knockout-Mäusen ($B1^{-/-}$KON). Die Behandlung mit Doxorubicin führte bei den Wildtypen ($B1^{+/+}$DOX) zu einer signifikanten Reduktion der Ejektionsfraktion. Die B1-Rezeptor-Knockout-Mäuse ($B1^{-/-}$DOX) wiesen nach der Behandlung mit Doxorubicin eine signifikant höhere Ejektionsfraktion im Vergleich zu den mit Doxorubicin behandelten Wildtypen ($B1^{+/+}$DOX) auf.

LV enddiastolisches Volumen: LVEDV (ml)



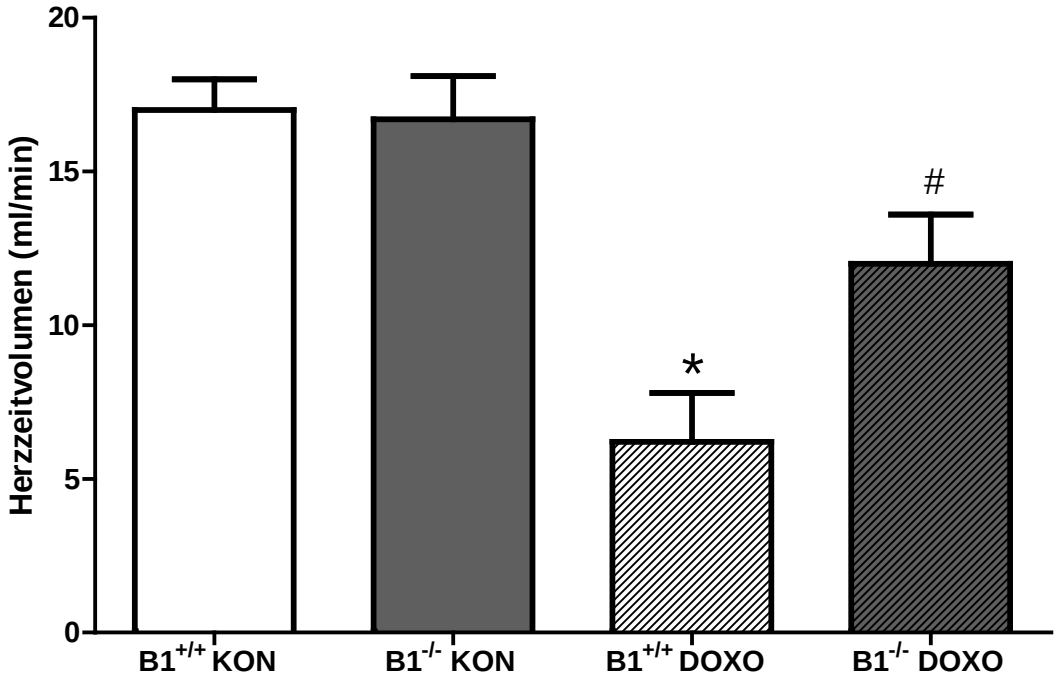
Bei den Kontrollgruppen zeigten sich keine Signifikanten Unterschiede im LVEDV zwischen den Wildtypen ($B1^{+/+}$KON) und den B1-Rezeptor-Knockout-Mäusen ($B1^{-/-}$ KON). Eine Behandlung mit Doxorubicin führte bei den Wildtypen ($B1^{+/+}$DOX) und bei den B1-Rezeptor-Knockout-Mäusen nicht zu einem signifikant größeren LVEDV.

Herzfrequenz: HF (b/min)



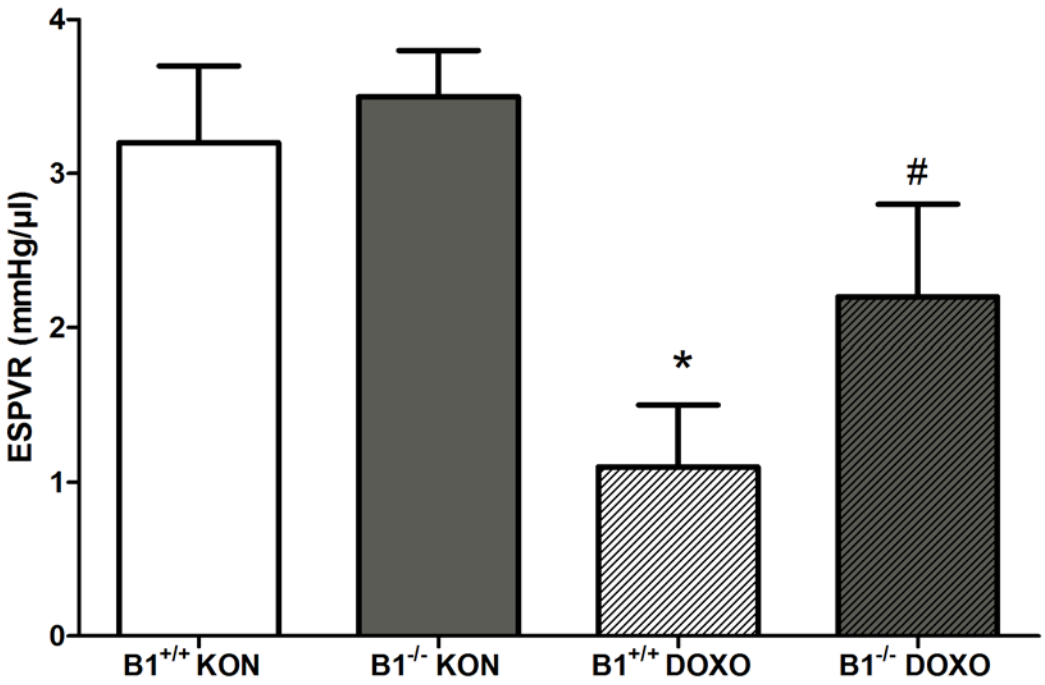
Die Herzfrequenz ergab in keiner der Gruppen signifikante Abweichungen.

Herzzeitvolumen: HZV (µl/min)



Bei den Kontrollgruppen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede des Herzzeitvolumens zwischen den Wildtypen ($B1^{+/+}$KON) und den B1-Rezeptor-Knockout-Mäusen ($B1^{-/-}$KON). Die Behandlung mit Doxorubicin führte bei den Wildtypen ($B1^{+/+}$DOX) zu einer signifikanten Reduktion des Herzzeitvolumens. Die B1-Rezeptor-Knockout-Mäuse ($B1^{-/-}$DOX) wiesen nach der Behandlung mit Doxorubicin ein signifikant höheres Herzzeitvolumen im Vergleich zu den mit Doxorubicin behandelten Wildtypen ($B1^{+/+}$DOX) auf.

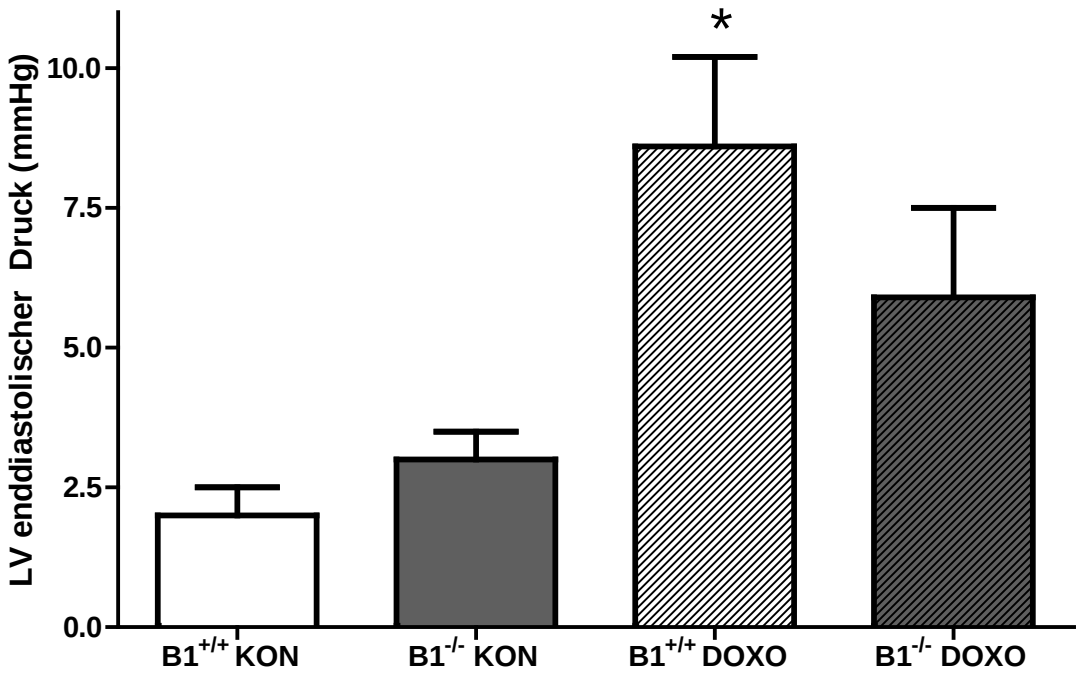
Endsystolische Druck-Volumen-Relation (ESPVR) (mmHg/µl)



Bei den Kontrollgruppen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede der ESPVR. Die Behandlung mit Doxorubicin führte bei den Wildtypen ($B1^{+/+}$DOX) zu einer signifikanten Reduktion der ESPVR. Die B1-Rezeptor-Knockout-Mäuse ($B1^{-/-}$DOX) wiesen nach der Behandlung mit Doxorubicin ein signifikant höheres ESPVR im Vergleich zu den mit Doxorubicin behandelten Wildtypen ($B1^{+/+}$DOX) auf.

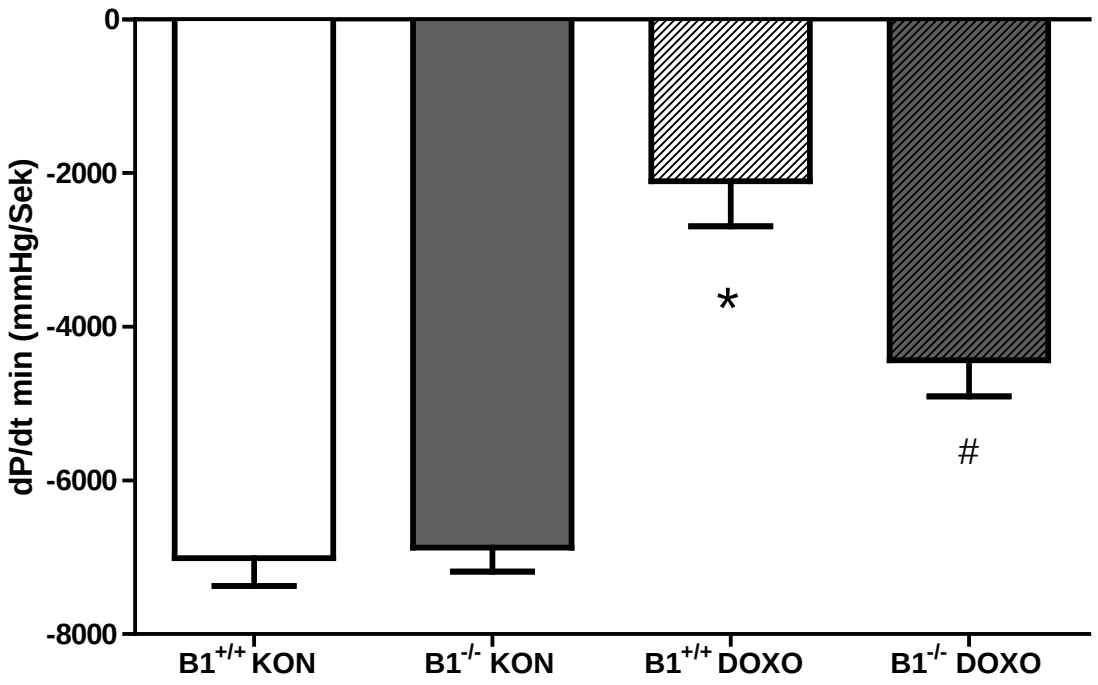
3.1.2. Diastolische Parameter

Linksventrikulärer enddiastolischer Druck: LVEDP (mmHg)



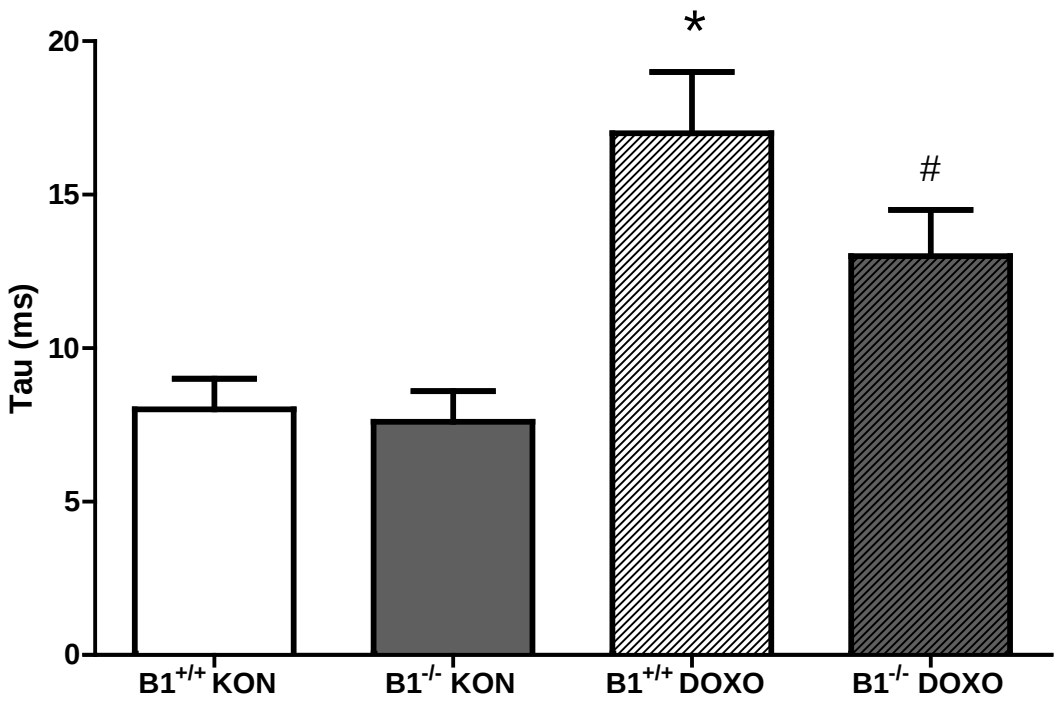
Der LV enddiastolische Druck unterschied sich zwischen den beiden Kontrollgruppen nicht signifikant. Die Behandlung mit Doxorubicin führte bei den Wildtypen ($B1^{+/+}$DOX) zu einem signifikanten Anstieg des enddiastolischen Druckes. Die B1-Rezeptor-Knockout-Mäuse ($B1^{-/-}$DOX) wiesen nach der Behandlung mit Doxorubicin nur einen tendenziell geringeren LV enddiastolischen Druck im Vergleich zu den $B1^{+/+}$DOX auf.

Linksventrikuläre Druckabfallsgeschwindigkeit: dP/dtmin. (mmHg/s)



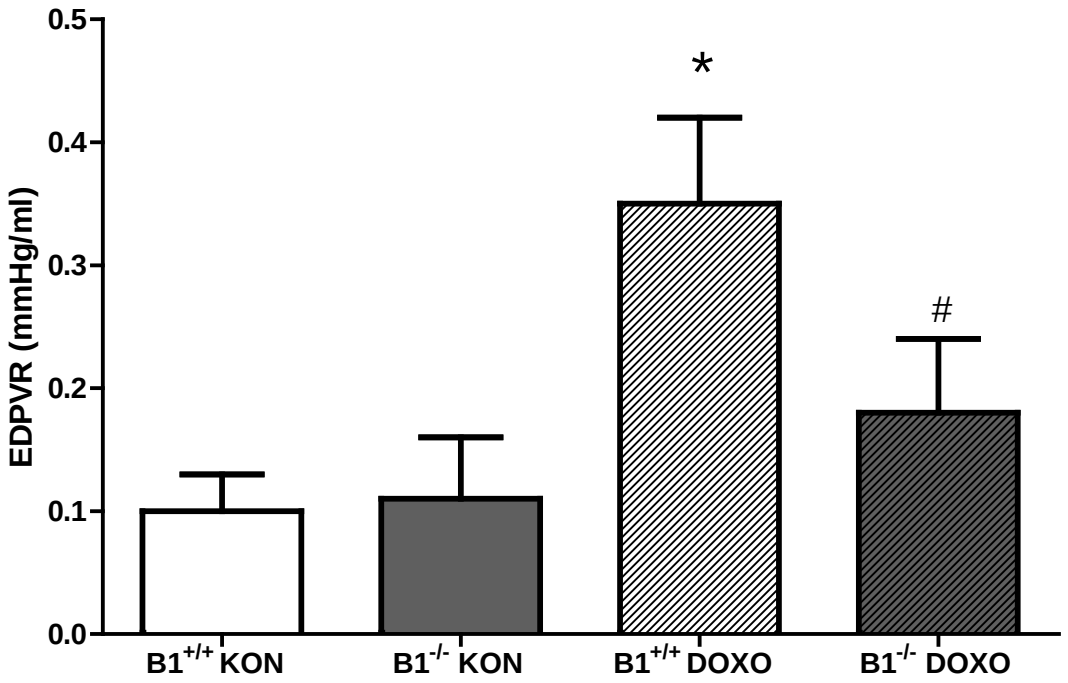
Bei den Kontrollgruppen zeigten sich keine signifikanten Abweichungen der dP/dtmin. zwischen den Wildtypen ($B1^{+/+}$KON) und den B1-Rezeptor-Knockout-Mäusen ($B1^{-/-}$ KON). Die Behandlung mit Doxorubicin führte bei den Wildtypen ($B1^{+/+}$DOX) zu einer signifikanten Reduktion der dP/dt min. Die B1-Rezeptor-Knockout-Mäuse ($B1^{-/-}$DOX) wiesen nach der Behandlung mit Doxorubicin eine signifikant höhere dP/dt min. im Vergleich zu den mit Doxorubicin behandelten Wildtypen ($B1^{+/+}$DOX) auf.

Isovolumetrische Relaxationszeit Tau (ms)



Bei den Kontrollgruppen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede der isovolumetrischen Relaxationszeit Tau zwischen den Wildtypen ($B1^{+/+}$KON) und den B1-Rezeptor-Knockout-Mäusen ($B1^{-/-}$KON). Die Behandlung mit Doxorubicin führte bei den Wildtypen ($B1^{+/+}$DOX) zu einer signifikanten Verlängerung von Tau. Die B1-Rezeptor-Knockout-Mäuse ($B1^{-/-}$DOX) wiesen nach der Behandlung mit Doxorubicin ein signifikant kürzeres Tau im Vergleich zu den mit Doxorubicin behandelten Wildtypen ($B1^{+/+}$DOX) auf.

Linksventrikuläre diastolische Druck-Volumen-Relation (mmHg/ml)

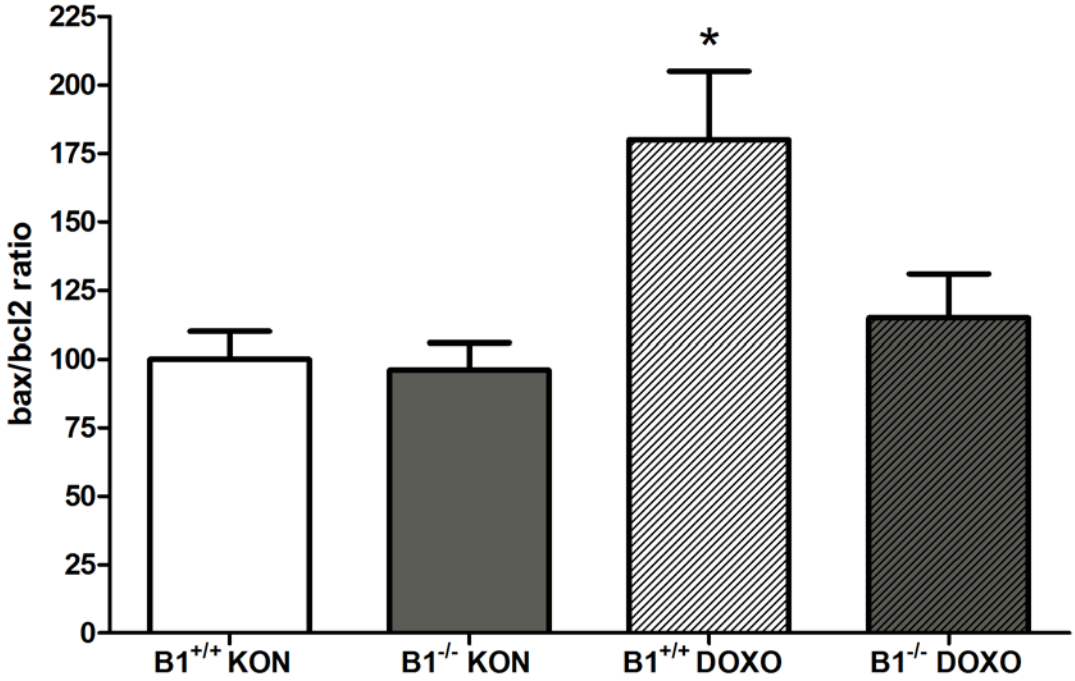


Die Kontrollgruppen $B1^{+/+}$KON und $B1^{-/-}$KON zeigten im internen Vergleich keine signifikanten Unterschiede der LV-Steifigkeit. Nach der Behandlung mit Doxorubicin war die Steifigkeit bei den Wildtypen ($B1^{+/+}$DOX) im Vergleich zu den Kontrollgruppen signifikant erhöht. Im Vergleich zu den $B1^{+/+}$DOXO zeigten die mit Doxorubicin behandelten B1-Rezeptor-Knockout-Mäuse ($B1^{-/-}$DOX) eine signifikant geringere LV-Steifigkeit.

3.2. Proteinchemische Ergebnisse

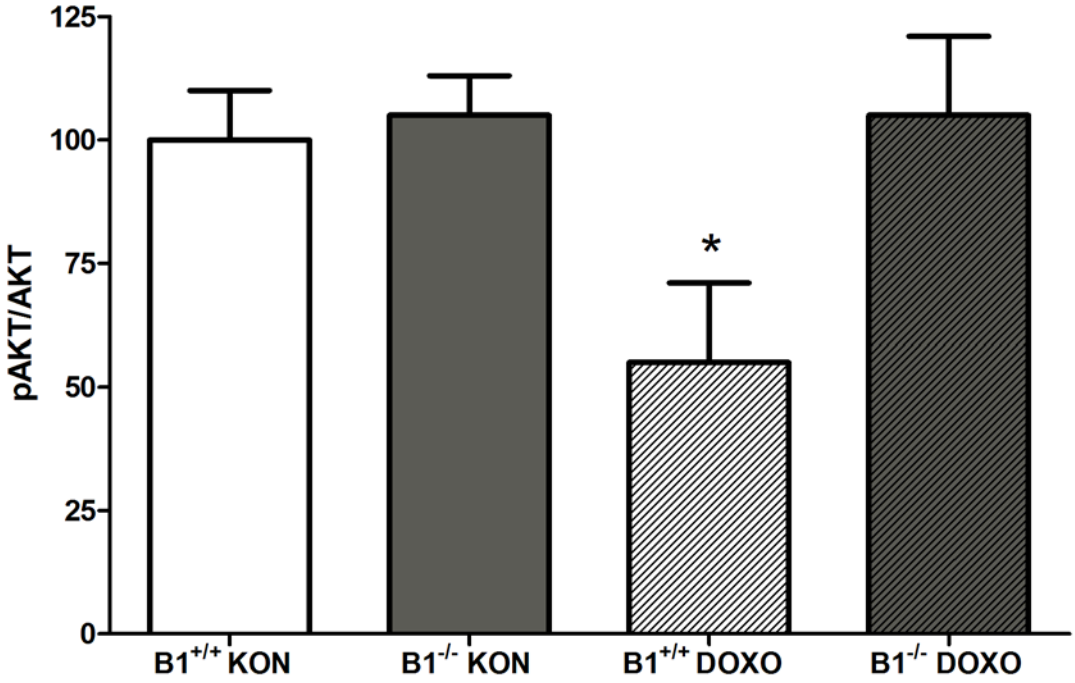
3.2.1. Bax/bcl-2-Relation

Die Kontrollgruppen $B1^{+/+}$KON und $B1^{-/-}$KON zeigten im Vergleich miteinander keine signifikanten Unterschiede der bax/bcl-2-Relation. Nach der Behandlung mit Doxorubicin war die bax/bcl-2-Relation bei den Wildtypen ($B1^{+/+}$DOX) in Relation zu den Kontrollgruppen signifikant erhöht. Im Vergleich zu den Kontrollgruppen $B1^{+/+}$KON und $B1^{-/-}$KON zeigten die mit Doxorubicin behandelten B1-Rezeptor-Knockout-Mäuse ($B1^{-/-}$ DOX) keine signifikant erhöhte bax/bcl-2-Relation.



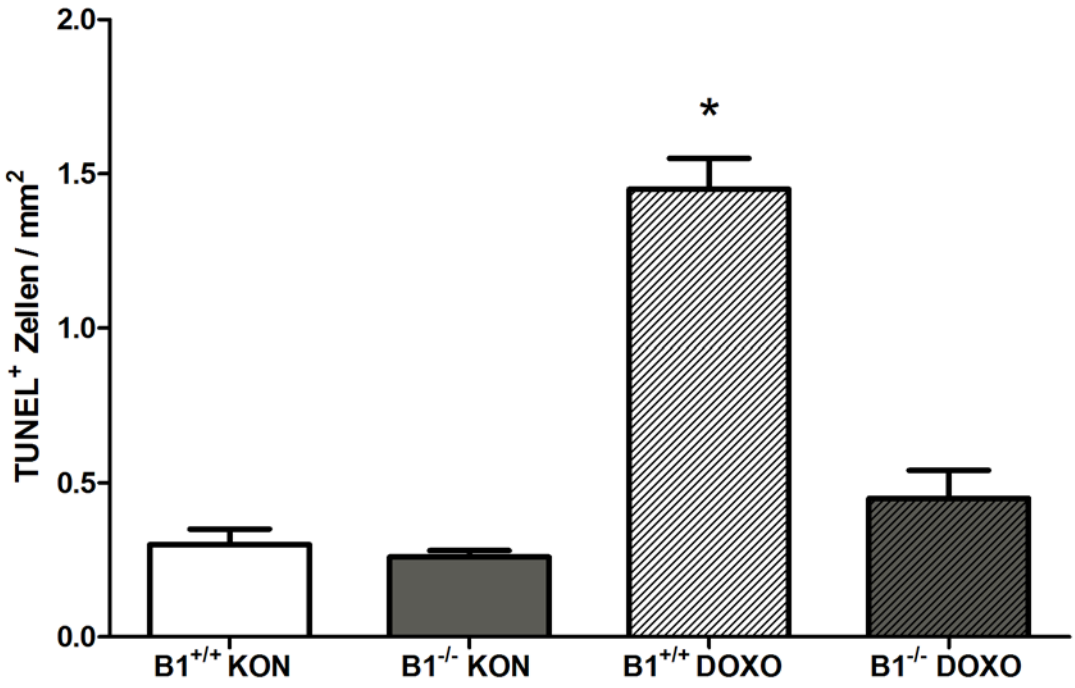
3.2.2. Aktivierungsstatus Akt

Die Kontrollgruppen $B1^{+/+}$KON und $B1^{-/-}$KON zeigten im internen Vergleich keine signifikanten Unterschiede im Aktivierungsstatus der Akt. Eine Behandlung mit Doxorubicin führte zu einer signifikanten Reduktion des Akt-Aktivierungsstatus bei den Wildtypen ($B1^{+/+}$DOX) im Vergleich zu den Kontrollgruppen $B1^{+/+}$KON und $B1^{-/-}$KON. Bei den B1-Rezeptor-Knockout-Mäusen ($B1^{-/-}$DOX) führte die Behandlung mit Doxorubicin nicht zu einem signifikant reduzierten Akt-Aktivierungsstatus.



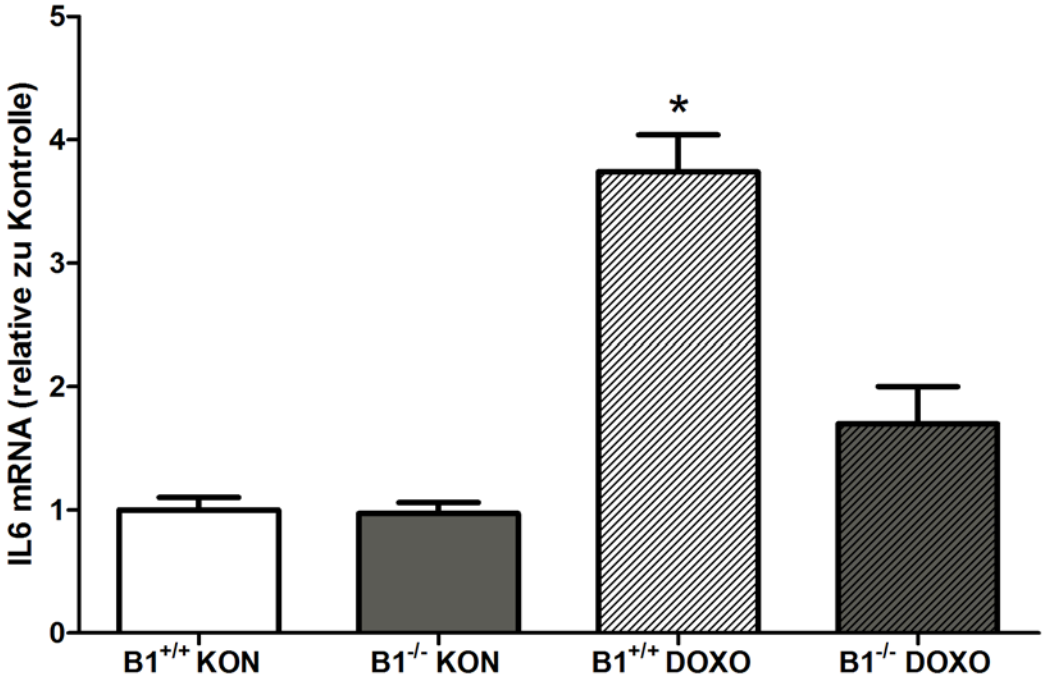
3.3. TUNEL-Färbung

Die Kontrollgruppen $B1^{+/+}$KON und $B1^{-/-}$KON zeigten im Vergleich miteinander keine signifikanten Unterschiede in der Menge der TUNEL-positiv gefärbten Zellen. Eine Behandlung mit Doxorubicin führte bei den Wildtypen ($B1^{+/+}$DOX) zu einer signifikant erhöhten Anzahl der TUNEL-positiv gefärbten Zellen im Vergleich zu den Kontrollgruppen $B1^{+/+}$KON und $B1^{-/-}$KON. Die Behandlung mit Doxorubicin führte bei den B1-Rezeptor-Knockout-Mäusen ($B1^{-/-}$DOX) zu keiner signifikant erhöhten Anzahl der TUNEL-positiv gefärbten Zellen im Vergleich zu den Kontrollgruppen $B1^{+/+}$KON und $B1^{-/-}$KON.



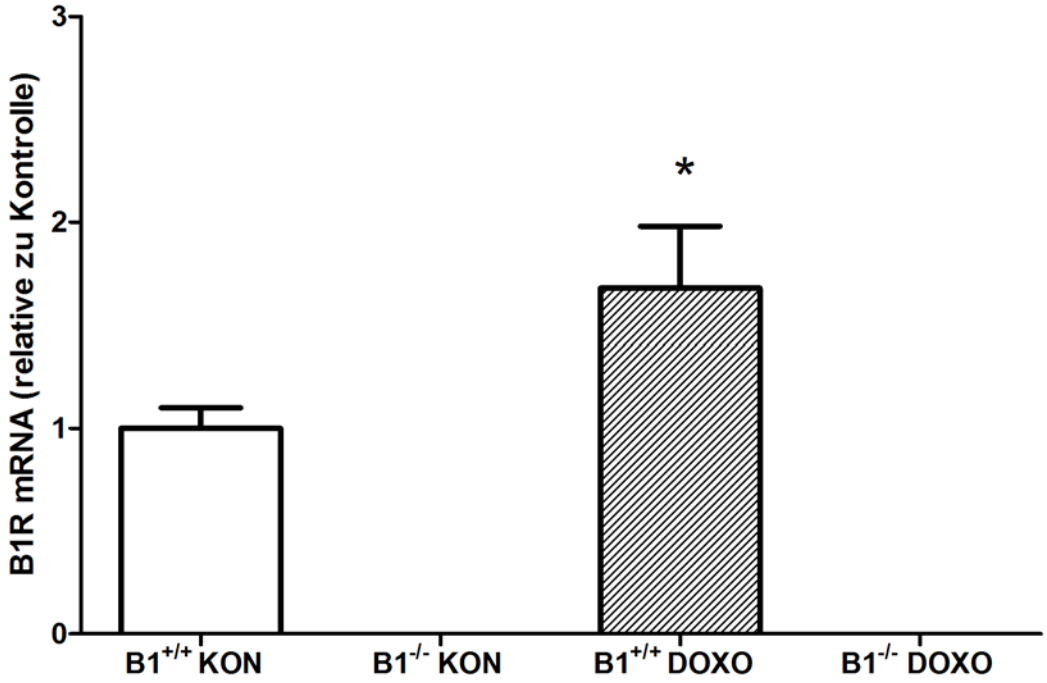
3.4. Il-6 mRNA-Expression

Zwischen den Kontrollgruppen $B1^{+/+}$KON und $B1^{-/-}$KON gab es keinen signifikanten Unterschied in der IL-6 mRNA-Expression. Die Behandlung mit Doxorubicin führte bei den Wildtypen ($B1^{+/+}$DOX), nicht jedoch bei den B1-Rezeptor-Knockout-Mäusen ($B1^{-/-}$ DOX), zu einer signifikant erhöhten Il-6-mRNA-Menge im Vergleich zu den Kontrollgruppen $B1^{+/+}$KON und $B1^{-/-}$KON.



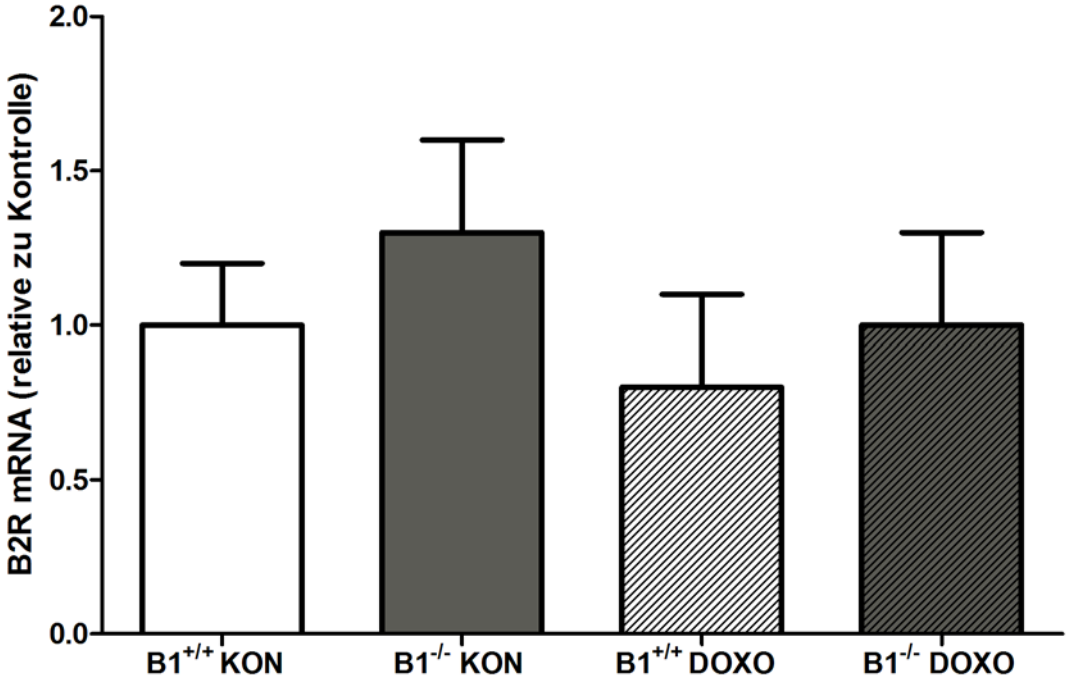
3.5. B1-Rezeptor-mRNA-Regulation

Bei den B1-Rezeptor-Knockout-Mäusen ($B1^{-/-}$KON; $B1^{-/-}$DOX) waren keine signifikanten Mengen des B1-Rezeptors nachweisbar. Bei den Wildtypen führte die Behandlung mit Doxorubicin ($B1^{+/+}$DOX) zu einem signifikanten Anstieg der B1-Rezeptor-mRNA im Vergleich zu den Placebo-behandelten Tieren ($B1^{+/+}$KON).



3.6. B2-Rezeptor-mRNA-Regulation

Die B2-Rezeptor-mRNA-Menge wies im Vergleich zwischen allen vier Gruppen ($B1^{+/+}$KON; $B1^{-/-}$KON; $B1^{+/+}$DOX; $B1^{-/-}$DOX) keine signifikanten Unterschiede auf. Es zeigte sich eine nicht signifikant erhöhte B2-Rezeptor-Menge bei den nicht behandelten Knockout-Mäusen ($B1^{-/-}$KON) gegenüber den Kontrollgruppen ($B1^{+/+}$ KON).



4. Diskussion

4.1. Der methodische Ansatz

Das Konduktanzmessverfahren zu Evaluierung der Herzfunktion

Die Konduktanzmethode in Anwendung beim Menschen ist seit den 80er-Jahren etabliert [96, 99, 100]. Allerdings wird sie aufgrund der Invasivität, des technischen Aufwands, der hohen Kosten und der schwierigen Interpretation der Daten nicht in der klinischen Routine angewandt, sondern eignet sich eher für spezielle wissenschaftliche Fragestellungen [101-103]. Seit der Etablierung der Methode im Kleintiermodell können wissenschaftliche Fragestellungen auch in Tierexperimenten umfassend verfolgt werden [104, 105]. Die Genauigkeit der Methode konnte mit vergleichenden Messtechniken wie Echokardiografie und MRT bestätigt werden [104, 106]. Die Konduktanzmethode erlaubt es, die Herzfunktion *in vivo* in einem dem physiologischen sehr ähnlichen Zustand zu betrachten. Die kardiale Funktion wird hierbei direkt im linken Ventrikel erfasst. Eine große Anzahl an Druck- und Volumenparametern lässt eine sehr genaue Charakterisierung der linksventrikulären Funktion zu. Hierzu zählen auch ESPVR und EDPVR als Vorlastunabhängige Parameter. Sowohl die diastolische als auch die systolische Funktion des linken Ventrikels werden von den Volumen- und Druckverhältnissen im Kreislauf wesentlich beeinflusst. So kann zum Beispiel eine Erhöhung der Vorlast über den Frank-Starling-Mechanismus zu einer gesteigerten Kontraktilität des linken Ventrikels führen. Als diastolischer Parameter kann der LVEDP durch ein vermindertes Kreislaufvolumen gesenkt werden, wodurch eine diastolische Dysfunktion verschleiert würde. Somit erlauben ESPVR und EDPVR eine von den im Kreislaufsystem herrschenden Druck- und Volumenverhältnissen unabhängige Charakterisierung der Herzfunktion.

Narkose

Vor der Anwendung des Konduktanzmessverfahrens müssen die Tiere anästhesiert werden. Eine Beeinflussung des Herzkreislaufsystems durch das Narkotikum muss also berücksichtigt werden. Das in dieser Studie verwendete Thiopental hat bei Menschen keinen Einfluss auf die kardiale Nachlast [107]. Bei Mäusen zeigt sich jedoch eine signifikante Reduktion des kardialen Indexes durch das Narkotikum [108]. Da in dieser Studie die Mäuse der unterschiedlichen Gruppen mit dem gleichen Narkotikum

anästhesiert wurden, ist der Fehler als systematisch zu betrachten und sollte die Relationen der Unterschiede und damit die Ergebnisse nicht verfälschen.

4.2. Die Doxorubicin-Kardiomyopathie im Tiermodell

Um die kardiotoxischen Wirkungen von Doxorubicin zu untersuchen, stehen verschiedene etablierte Tiermodelle zur Verfügung. Bei Langzeitmodellen erhalten die Tiere das Medikament über mehrere Wochen. Diese Modelle simulieren wahrscheinlich eher die Charakteristiken der chronischen Doxorubicin-Kardiomyopathie. Die toxischen Wirkungen auf das Herz treten jedoch schon kurz nach der Gabe des Medikamentes auf und funktionelle Veränderungen können hierbei lange vor den morphologischen Veränderungen auftreten. Deshalb wurden Tiermodelle entwickelt, bei denen das Medikament nur in einem kurzen Zeitraum, über Tage oder auch wenige Wochen, verabreicht wurde [109]. Die einmalige hohe Dosis, die die Tiere in unserem Experiment erhielten, und auch der frühe Untersuchungszeitpunkt simulieren daher die subakut toxische Wirkung von Doxorubicin. Dementsprechend sind die Daten auf Patienten, die das Medikament längere Zeit in geringeren Dosen erhalten, nur bedingt übertragbar. Zu diesem Zweck wäre es sinnvoll, die Ergebnisse unserer Studie an einem chronisch angelegten Tiermodell zu überprüfen. Da die grundsätzlichen Mechanismen der kardialen Schädigung durch Doxorubicin bei Menschen und im Tiermodell jedoch sehr ähnlich sind, kann man von ähnlichen akuten Wirkungen von Doxorubicin bei Menschen ausgehen [1, 109].

4.3. Genetisch veränderte Tiermodelle: Deletion des B1R

B1R-Knockout-Mäuse zeigen in der generellen Morphologie keine Auffälligkeiten. Sie sind fertil und weisen einen normalen Blutdruck im Vergleich zu Wildtypen auf [110]. Ob eine Deletion des B1R kardiale Morphologie und Stoffwechsel beeinflusst, ist umstritten. In einigen Studien konnte keine veränderte Herzgewicht-Körpergewicht-Relation im Sinne einer kardialen Hypertrophie nachgewiesen werden [83, 94]. Andere Untersuchungen konstatieren jedoch veränderte Körper- und Herzgewichte bei B1R-Knockout-Mäusen im Vergleich zu Wildtypen [111] Echokardiografisch wurde in einer Studie eine erhöhte LVDd (*Left ventricular diastolic dimension*) im Sinne einer linksventrikulären Dilatation nachgewiesen [112]. Morphologisch konnte in einer

weiteren Untersuchung eine Hypertrophie der Kardiomyozyten, jedoch keine erhöhte Menge von interstitiellem Kollagen festgestellt werden [85]. Des Weiteren wurde ein veränderter myokardialer Kalziumstoffwechsel bei B1R-Knockout-Mäusen beobachtet [83]. Ein Einfluss der Deletion des Rezeptors auf die basale Morphologie und den kardialen Stoffwechsel kann also nicht ausgeschlossen werden. In unserem Modell konnten wir keinen Einfluss des Rezeptors auf die von uns gemessenen inflammatorischen und apoptotischen Parameter unter physiologischen Bedingungen feststellen. Ob die Deletion des Rezeptors einen Einfluss auf die basale Hämodynamik hat, wird nachfolgend ausführlich diskutiert. In dieser Studie wurden konstituelle Knockout-Mäuse genutzt, d. h. die Mäuse können lebenslang den Rezeptor nicht exprimieren. Das schließt nicht aus, dass das Fehlen dieses Rezeptors eventuell durch andere Systeme ausgeglichen wird. Neuere gentechnische Verfahren erlauben es, Mäuse so zu verändern, dass gemäß eines „On-Off-Prinzips“ ein Gen nach Belieben an- oder ausgeschaltet werden kann [113]. Dies lässt einen noch spezifischeren Einblick bei verschiedenen Pathologien zu. Allerdings gibt es bislang kein Mausmodell, dass diese Technik bei einem Kinin-Rezeptoren einsetzt.

4.4. Basale Hämodynamik

Ob eine Deletion des B1R bei Mäusen zu einer Veränderung der Hämodynamik führt, wird kontrovers diskutiert. In einem *ex-vivo*-Modell nach Langendorff von Lauton-Santos *et al.* zeigen die Herzen von B1R-Knockout-Mäusen eine verminderte systolische Funktion. Dies wird unter anderem auf einen veränderten Kalziumstoffwechsel in den Kardiomyozyten zurückgeführt. [83]. Andererseits zeigt sich gemäß einer Arbeit von Lagneux *et al.* im gleichen Modell keine veränderte basale Herzfunktion bei B1R-Knockout-Mäusen im Vergleich zu den Wildtypen [94].

Ebenso konnten Xu *et al.* und Lagneux *et al.* in *in-vivo*-Experimenten bei B1R-Knockout-Mäusen echokardiografisch keine Veränderung der kardialen Funktion unter Basalbedingungen feststellen [79, 85].

Die Ergebnisse unserer Konduktanzmessung verhalten sich analog zu den anderen *in-vivo*-Studien. Wir konnten keine signifikante Veränderung der systolischen Funktion bei B1R-Knockout-Mäusen ($B1^{-/-}$KON) unter Basalbedingungen im Vergleich zu den Wildtypen ($B1^{+/+}$KON) feststellen. Dies äußert sich in den unveränderten Parametern LVP max., EF, SV, HZV, dP/dt max. und ESPVR. Auch die diastolische Funktion,

erfasst anhand der Parameter LVEDP, Tau, dP/dtmin., LVEDV und EDPVR, war bei den B1R-Knockout-Mäusen ($B1^{-/-}$KON) im Vergleich zu den Wildtypen ($B1^{+/+}$KON) nicht signifikant verändert. In einer weiteren Studie, welche den Einfluss des B1-Rezeptors auf die Diabetische Kardiomyopathie untersucht, konnte unsere Arbeitsgruppe, ebenfalls mittels Konduktanzmethode gemessen, keinen Einfluss des Rezeptors auf die basale Herzfunktion beobachten [95]. Eine veränderte basale Herzfunktion könnte durch unterschiedliche Mausstämme, welche bei dem jeweiligen Tiermodell verwendet wurden, hervorgerufen worden sein. Die Tiere für die jeweiligen Experimente wurden jedoch immer von der Gruppe um Prof. M. Bader zur Verfügung gestellt, was unterschiedliche Mausstämme als Ursache für die diskrepanten Ergebnisse wenig wahrscheinlich macht. Das Alter der in den jeweiligen Experimenten verwendeten Tiere könnte einen Einfluss auf die kardiale Funktion haben. So waren die von unserer Gruppe verwendeten Tiere mit zwei Monaten deutlich jünger als die von Lauton-Santos *et al.* betrachteten Tiere, die vier Monate alt waren. Vor allem aber unterscheiden sich natürlich die Methoden, welche angewandt wurden. *Ex-vivo*-Modelle wie das des isoliert perfundierten Herzens sind eher unphysiologisch. Die *in-vivo*-Modelle stimmen bezüglich der basalen Pumpfunktion überein. Da sie im Vergleich zu den *ex-vivo*-Modellen infolge der stärkeren Annäherung an die physiologischen Gegebenheiten im Organismus eine bessere Charakterisierung der Herzfunktion zulassen, scheint eine Deletion des B1R bei Mäusen eher keinen Einfluss auf die basale Herzfunktion zu haben.

4.5. Hämodynamik nach der Doxorubicin-Behandlung

Patienten, welche Doxorubicin im Rahmen einer Chemotherapie erhalten haben, können danach eine symptomatische Herzinsuffizienz entwickeln. Die Inzidenz dieser Herzinsuffizienz steigt mit der kumulativen Dosis von Doxorubicin. So liegt die Inzidenz der Erkrankung bei 4 %, wenn die kumulative Gesamtdosis 500-550 Milligramm pro Quadratmeter Körperoberfläche (mg/m²) beträgt. Bei einer kumulativen Gesamtdosis von 551-600 mg/m² bzw. ≥ 600 mg/m² steigt die Inzidenz auf 18 % bzw. 36 % [4]. Somit wird eine Gesamtdosis von maximal 450 mg/m² empfohlen, um das Risiko für die Patienten zu minimieren [1].

Als Ausdruckür der Herzinsuffizienz zeigen die Patienten eine reduzierte Ejektionsfraktion und eine linksventrikuläre Dilatation [114-117].

Auch eine diastolische Dysfunktion wird echokardiografisch nach Doxorubicin-Therapie beschrieben [116, 117]. Analog hierzu zeigte sich in Tiermodellen nach Doxorubicin-Behandlung ebenfalls eine systolische und diastolische Dysfunktion. Diese konnte sowohl im Modell des isoliert perfundierten Herzens als auch echokardiografisch und durch linksventrikuläre Katheterisierung nachgewiesen werden [29, 109, 118]. In dieser Arbeit konnten wir mit der Konduktanzmethode ebenfalls eine verschlechterte linksventrikuläre Funktion nach Doxorubicin-Behandlung nachweisen. Systolische Parameter wie LVP max., dP/dt max., SV, HZV, EF und ESPVR waren im Vergleich zu Kontrolltieren signifikant reduziert. Auch dP/dt min. war als diastolischer Parameter signifikant reduziert, Tau als isovolumetrische Relaxationszeit war signifikant verlängert ,und anhand der EDPVR konnten wir eine erhöhte linksventrikuläre Steifigkeit nachweisen. Diese Daten stimmen mit einer vorherigen Studie unserer Arbeitsgruppe und auch mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen überein [47, 119, 120]. Allerdings wies der LVEDP der mit Doxorubicin behandelten Wildtypen ($B1^{+/+}$DOX) keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zu den Kontrolltieren auf ($B1^{+/+}$KON). In den Arbeiten von Pacher *et al.*, die die gleiche Methode anwandten wie wir, war der LVEDP infolge der Doxorubicin-Behandlung signifikant erhöht [119, 121]. Der LVEDP, den wir zum Erfassen einer linksventrikulären diastolischen Dysfunktion verwendeten, ist stark vorlastabhängig. Die Diskrepanz zu den Ergebnissen in anderen Studien lässt sich unter anderem damit erklären. Eine Veränderung der Vorlast kann hierbei vom generellen Hydrierungszustand der Tiere verursacht sein. In diesem Modell führt eine Behandlung mit Doxorubicin zu einem signifikanten Gewichtsverlust. Die Tiere nehmen sowohl weniger Nahrung als auch weniger Wasser auf [122]. Der Gewichtsverlust kann also durchaus von Dehydrierung hervorgerufen sein. Dafür spricht auch, dass EDPVR als vorlastunabhängiger Parameter nach der Behandlung mit Doxorubicin signifikant erhöht ist.

Ebenso könnten Einflüsse des in den jeweiligen Studien verwendeten Mausstammes eine Ursache für die unterschiedlichen Ergebnisse sein.

Bei Patienten mit Doxorubicin-Kardiomyopathie zeigt sich unter anderem eine linksventrikuläre Dilatation, was allerdings in unserer Studie, zu diesem frühen Zeitpunkt nach der Doxorubicin-Behandlung, nich nicht nachweisbar war . In anderen Studien, die ebenfalls auf das akute Modell der Doxorubicin-Kardiomyopathie zurückgriffen,

konnte echokardiografisch und mit der Konduktanzmethode ebenfalls keine linksventrikuläre Dilatation zu diesem Zeitpunkt festgestellt werden [120, 123].
Das in unserer und den anderen Arbeitsgruppen verwendete Tiermodell evaluiert die Herzfunktion zu einem sehr frühen Zeitpunkt nach der Doxorubicin-Behandlung. Hierbei stellt sich letztlich doch die Frage der Übertragbarkeit auf die chronische Doxorubicin-Kardiomyopathie bei den Patienten. In einem Langzeitmodell der Doxorubicin-Kardiomyopathie an Mäusen zeigte sich echokardiografisch nach zwölf Wochen eine deutliche linksventrikuläre Dilatation [120]. Diese morphologische Veränderung scheint also zu einem späteren Zeitpunkt im Verlauf der Erkrankung aufzutreten. Um dies zu verifizieren, müsste die dieser Studie zugrunde liegende hämodynamische Charakterisierung bei einem Modell der chronischen Doxorubicin-Kardiomyopathie angewandt werden.

4.6. Hämodynamik der B1R-Knockout-Mäuse nach der Doxorubicin-Behandlung

Nach Doxorubicin-Behandlung wiesen die B1R-Knockout-Mäuse eine signifikant bessere Herzfunktion im Vergleich zu den Wildtypen auf. Dies zeigte sich sowohl an systolischen Parametern wie EF, SV, HZV, LVP max., dP/dt max. und ESPVR als auch in den diastolischen Parametern dP/dt min., Tau und EDPVR. Eine direkte Vergleichsarbeit zu unserer liegt leider nicht vor. Es gibt aber andere Modelle, welche die Auswirkung des Rezeptors auf die kardiale Funktion untersuchen. Ob der B1R sich kardioprotektiv oder eher negativ auf die Herzfunktion auswirkt, ist jedoch umstritten.
In einem Rattenmodell konnte unsere Arbeitsgruppe nachweisen, dass B1R bei kardioprotektiven Mechanismen eines Angiotensin-Typ-1-Rezeptorantagonisten eine Rolle spielt. Die kardioprotektive Wirkung des Angiotensin-Typ-1-Antagonisten konnte so durch Gabe eines B1R-Antagonisten teilweise aufgehoben werden [92]. In anderen Tiermodellen, die die Wirkung eines ACE-Hemmers und Angiotensin-Typ-1-Rezeptorantagonisten nach Myokardinfarkt untersuchten, ergaben sich ähnliche Ergebnisse. Eine Behandlung mit dem ACE-Hemmer führte bei den Wildtypen nach experimentellem Myokardinfarkt zu einer deutlich verbesserten Herzfunktion. Diese Verbesserung konnte bei den B1R-Knockout-Mäusen nur in geringem Ausmaß erzielt werden [79, 112].
Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Gabe eines B1R-Agonisten vor ventrikulären Arrhythmien nach Ischämie schützt [124]. Auch pro-angiogenetische Effekte nach

Ischämie scheinen durch den Rezeptor vermittelt zu werden [125]. Andererseits ergab eine Studie, die die Wirkung der Rezeptoren in einem Ischämie-Reperfusions-Modell anhand von Rezeptoragonisten prüfte, diskrepante Ergebnisse. So hatte eine Behandlung mit einem B1R-Agonisten keine Auswirkung auf Herzfunktion, kardiale Apoptose oder *Remodeling* [93]. In einem weiteren Modell mit B1R-Knockout-Mäusen zeigten sich nach experimentellem Myokardinfarkt keine signifikanten Unterschiede in der Herzfunktion und dem *Remodeling* im Vergleich zu Wildtypen [85]. Andererseits konnten bei B1R-Knockout-Mäusen nach experimentellem Myokardinfarkt und einem Ischämie-Reperfusionsmodell eine Verringerung der Infarktgrößen nachgewiesen werden [93, 94]. Dies lässt analog zu unserer Studie eher eine schädliche Wirkung des B1R auf das Herz vermuten.

Weiterhin konnten wir nachweisen, dass B1R-Knockout-Mäuse in einem Diabetes-Modell eine bessere Herzfunktion im Vergleich zu den Wildtypen hatten [95]. Diese diskrepanten Ergebnisse sind wahrscheinlich auf die unterschiedlichen Herzinsuffizienzmodelle in den jeweiligen Studien zurückzuführen. So scheint der B1-Rezeptor bei Ischämie eine andere Rolle zu spielen als beim Diabetes Mellitus und bei der Doxorubicin-Kardiomyopathie. Ebenso wenig ist bei kardialer Ischämie die Rolle des B1R abschließend geklärt, da er einerseits kardioprotektive, aber auch gegenteilige Effekte nach sich zieht. Eventuell könnte hierbei auch wichtig sein, ob die Erkrankung eine inflammatorische Komponente – wie die Diabetische-Kardiomyopathie und Doxorubicin-Kardiomyopathie – hat. Weiterhin kann die Expression der jeweiligen Rezeptoren einen Einfluss auf die kardiale Funktion haben. Beide Kinin-Rezeptoren werden in ihrer Expression reguliert und können so in ihrer Wirkungsstärke beeinflusst werden.

4.7. Regulation des B1R und des B2R

Der B2R wird unter physiologischen Bedingungen von vielen Geweben, so auch dem Myokard, konstitutiv exprimiert [52].

Der B1R wird unter Basalbedingungen nur gering exprimiert. Bei Inflammation, aber auch Ischämie-Reperfusion, Aortenstenose und Myokardinfarkt, kommt es zu einer vermehrten Expression des Rezeptors in Herzen [53]. In unserer Studie konnten wir eine signifikant vermehrte Expression des B1R nach Doxorubicin-Behandlung feststellen. Es gibt keine Studie, mit denen wir unsere Ergebnisse vergleichen können.

In anderen Modellen konnte jedoch ebenfalls eine vermehrte Expression des B1R nach Induktion von Herzinsuffizienz festgestellt werden. So konnte nachgewiesen werden, dass der B1R nach Myokardinfarkt bereits nach sechs Stunden vermehrt exprimiert wird. Dieser Anstieg der Expression erreicht nach 48 Stunden ein Maximum; nach sechs Tagen zeigt sich ein Rückgang der Expression des Rezeptors [126].
Auch sechs Wochen nach dem Myokardinfarkt wird der Rezeptor jedoch noch vermehrt exprimiert [127]. Ebenso war in einem Ischämie-Reperfusionsmodell an Mäusen nach der Ischämie eine vermehrte Expression des B1R feststellbar [75]. Andererseits konnte man in einem Ischämie-Modell von Duka *et al.* bei Mäusen keine signifikante Hochregulation des B1R drei Wochen nach Myokardinfarkt im Vergleich zu den *Sham*-operierten Tieren beobachten [79]. Diese diskrepanten Ergebnisse könnten sich mit der Tierart und dem Zeitpunkt der Messung erklären lassen. So wurden in den Experimenten unserer Gruppe Ratten verwendet [126, 127]. Der Zeitpunkt der Messung der Expression bei dem Ischämie-Reperfusionsmodell erfolgte direkt nach den chirurgischen Maßnahmen [75]. Wir konnten nachweisen, dass es im Zeitverlauf zu einem Rückgang der vermehrten Expression des Rezeptors kommt. Es könnte also sein, dass sich der Zeitverlauf in dieser Regulation bei Mäusen unterscheidet und der Rezeptor zu einem früheren Zeitpunkt eventuell vermehrt exprimiert wurde. Auch in einem Diabetes-Modell und einem Modell mit kardialer Hypertrophie konnten wir eine vermehrte Expression des B1R bei Ratten nachweisen [127]. Ebenso konnten Duka *et al.* in einem Hypertensions-Modell an Mäusen eine Hochregulation des B1R beobachten [128]. In einem weiteren Hypertrophie-Modell bei Ratten wurde der B1R nach Induktion der Hypertrophie nicht vermehrt exprimiert [129]. Die kardiale Hypertrophie wurde im Rahmen der Studie unserer Gruppe durch eine chirurgische Obstruktion der thorakalen Aorta hervorgerufen [127]. Yayama *et al.* griffen auf eine operative Obstruktion der abdominellen Aorta in Höhe der *A. renalis* zurück [129]. Bei dem von uns eingesetzten Hypertrophie-Modell ist vor allem eine durch die Stenose der thorakalen Aorta gesteigerte Nachlast charakteristisch. Eine Stenose der Aorta in Höhe der A. renalis führt zu einer starken Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems. Diese unterschiedlichen Mechanismen in den jeweiligen Hypertrophie-Modellen könnten eine Ursache für die diskrepanten Ergebnisse sein. Zusammenfassend kommt es also in den Herzinsuffizienz-Modellen meist zu einer Hochregulation des B1R. Es gibt jedoch auch Modelle, in denen dies nicht der Fall ist.

Unterschiedliche Modelle, Tierstämme und auch der Zeitverlauf in der Regulation des Rezeptors könnten dies erklären.

Der B2R wurde nach der Doxorubicin-Behandlung in unserer Studie nicht vermehrt exprimiert. Auch hier gibt es keine Studie, die wir zu einem direkten Vergleich heranziehen können, und die Regulation des Rezeptors scheint je nach Modell sehr unterschiedlich zu sein. Wir konnten nachweisen, dass der B2R nach Myokardinfarkt bei Ratten vermehrt exprimiert wird. Im Gegensatz zum B1R konnten wir nach sechs Stunden eine Hochregulation des B2R feststellen, die nach 48 Stunden ein Maximum erreicht hatte, und auch nach fünf Tagen kam es zu keinem Rückgang der vermehrten Expression des Rezeptors [126]. Nach drei Wochen wurde der Rezeptor immer noch vermehrt exprimiert, jedoch signifikant weniger im Vergleich zu den frühen Zeitpunkten [127]. In dem Ischämie-Reperfusionsmodell zeigte sich ebenfalls eine vermehrte Expression des B2R kurz nach der Ischämie [75]. In dem Infarkt-Modell von Duka *et al.* war nach drei Wochen jedoch eine verminderte Expression des B2R zu verzeichnen [79]. Auch diese diskrepanten Ergebnisse könnten analog zu jenen bei der Regulation des B1R auf die unterschiedlichen Zeitpunkte und die Tierart zurückzuführen sein. In dem Hypertrophie-Modell, welches auf einer starken Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems basiert, konnten auch Yayama et al. eine verminderte Expression des B2R beobachten [54]. Bei unserem Modell, welches auf einer starken Erhöhung der Nachlast basiert, konnten wir eine vermehrte Expression des B2R feststellen [127]. Auch hier könnten die unterschiedlichen Modelle ursächlich für die diskrepanten Ergebnisse sein. In einem weiteren Hypertonie-Modell konnten Duka *et al.* ebenfalls keinen Anstieg der B2R-Expression verzeichnen [128]. Die Regulation des B2R scheint also ebenfalls stark von dem jeweiligen Modell abzuhängen. Auch scheint sich die Expression des Rezeptors im Zeitverlauf zu verändern.

Bei den von uns verwendeten B1R-Knockout-Tieren ist nicht zuletzt die Regulation des B2R unter Basalbedingungen und nach der Doxorubicin-Behandlung interessant. In der Studie konnten wir unter Basalbedingungen eine tendenzielle, jedoch nicht signifikant höhere Expression des B2R bei den B1R-Knockout-Tieren beobachten. In einer Studie von Duka *et al.* mit einem Myokardinfarkt-Modell konnte bei den *Sham*-operierten B1R-Knockout-Mäusen eine signifikant höhere Expression des B2R festgestellt werden [79]. Hierbei kann natürlich die *Sham*-Operation auf die Expression des Rezeptors Auswirkungen haben. Die unterschiedlichen Ergebnisse könnten jedoch auch durch das

Alter der jeweiligen Tiere bedingt sein. Die Tiere in unserem Experiment waren, wie schon mehrfach erwähnt, zwei Monate alt. Die Tiere des Myokardinfarkt-Modells waren vier Monate alt, mithin deutlich älter. Bei Ratten erwies sich bereits, dass das Alter der Tiere einem Einfluss auf die Expression der Rezeptoren hat [84]. So könnte es bei den B1R-Rezeptor-Knockout-Tieren erst mit steigendem Alter zu einer vermehrten Expression des B2R kommen.

Die Doxorubicin-Behandlung führte bei den B1R-Knockout-Mäusen nicht zu einer Hochregulation des B2R nach fünf Tagen. Es gibt keine Studien, mit denen wir die Ergebnisse unseres Modells vergleichen können. In anderen Herzinsuffizienz-Modellen zeigte sich, abhängig von dem jeweiligen Modell, eine veränderte Expression des B2R [75, 127-129]. Welche genaue Rolle diese spezielle Regulation der Rezeptoren in verschiedenen Modellen spielt, ist jedoch noch unklar. Die Hochregulation des B2-Rezeptors wird fast immer als protektiv angesehen, da der B2-Rezeptor anti-inflammatorische und anti-apoptische Wirkungen zu haben scheint. Es konnte nachgewiesen werden, dass eine Blockade des B2R bei B1R-Knockout-Mäusen nach Myokardinfarkt einen negativen Effekt sowohl in Bezug auf die linksventrikuläre Funktion als auch auf das *Remodeling* nach Ischämie hat [85]. Eine weitere Studie untersuchte die Rolle der Rezeptoren bei der kardioprotektiven Wirkung eines ACE-Hemmers nach Myokardinfarkt. Bei B1R-Knockout-Mäusen konnte nach Myokardinfarkt keine Verbesserung der linksventrikulären Funktion infolge Behandlung mit einem ACE-Hemmer nachgewiesen werden, obwohl der B2R bei den Tieren in seiner Expression hochreguliert war [79]. Dies lässt darauf schließen, dass beide Rezeptoren nötig sind, damit das Medikament seine volle Wirkung entfalten kann. In der gleichen Studie wurden analog zu den B1R-Knockout-Tieren auch B2R-Knockout-Mäuse untersucht. Diese zeigten eine signifikant vermehrte Expression des B1R nach Myokardinfarkt, doch eine Behandlung mit einem ACE-Hemmer verschlechterte die linksventrikuläre Funktion nach Myokardinfarkt [79]. Es könnte also sein, dass der B1R das Fehlen des B2R nicht kompensieren kann und sich eine vermehrte Expression des Rezeptors auch negativ auf die kardiale Funktion nach Myokardinfarkt auswirken könnte. Die Regulation der beiden Rezeptoren ist komplex und differiert in unterschiedlichen Krankheitsmodellen; eine Deletion des einen Rezeptors kann einen Einfluss auf die Regulation des anderen haben. Bei den B1R-Knockout-Tieren in unserer Studie war die B2R-Expression unter Basalbedingungen tendenziell aber nicht signifikant erhöht und

eine Behandlung mit Doxorubicin führte nicht zu einer vermehrten Expression. Welche Rolle der B2R bei der Doxorubicin-Kardiomyopathie spielt, ist noch nicht geklärt. Man könnte dies anhand eines Knockout-Modells und/oder mit entsprechenden Rezeptorantagonisten untersuchen.

4.8. Apoptose

Als ein Mechanismus der kardialen Schädigung bei der Doxorubicin-Kardiomyopathie wird Apoptose, also der programmierte Zelltod, angenommen [23]. Um die Menge an apoptotischen Zellen zu erfassen, führten wir eine TUNEL-Färbung an den histologischen Schnitten durch. In unserer Studie konnten wir bei den Wildtypen ($B1^{+/+}$DOX) gegenüber mit Placebo behandelten Tieren ($B1^{+/+}$KON) eine signifikant erhöhte Menge von TUNEL-positiven Zellen feststellen. In anderen Studien konnte meist ebenfalls eine vermehrte Apoptose nach Doxorubicin-Behandlung anhand der TUNEL-Färbung nachgewiesen werden. In einem Mausmodell, bei dem die Tiere analog zu unserem Experiment eine Injektion der gleichen Dosis erhalten hatten, war auch eine gesteigerte Apoptose nach einem und nach fünf Tagen zu beobachten [28, 123]. Unsere Gruppe konnte in dem gleichen Modell in einer anderen Studie eine vermehrte Apoptose nach fünf Tagen nachweisen [130]. Bei diesen akuten Modellen werden die Tiere mit einer einmaligen hohen Dosis von Doxorubicin behandelt. In einem weiteren Modell an Ratten konnte *Arola et al.* Eine Zeitpunktabhängigkeit und eine Dosisabhängigkeit der Menge an TUNEL-positiven Zellen feststellen. Einen Tag nach der Doxorubicin-Injektion stellte sich eine stark erhöhte Apoptose ein, die sich im Verlauf von fünf Tagen zwar reduzierte, doch war noch nach sieben Tagen eine vermehrte Apoptose vorhanden. Die Menge an apoptotischen Zellen stieg zudem mit der verabreichten Dosis von Doxorubicin [34]. Bei anderen Modellen erhielten die Tiere das Medikament in geringeren Dosen über einen längeren Zeitraum. In einem solchen Modell konnten Arola *et al.* nachweisen, dass es zu Beginn der Doxorubicin-Behandlung zu einem signifkanten Anstieg der apoptotischen Zellen im Myokard kam. Im weiteren Verlauf nahm die Anzahl der apoptotischen Zellen jedoch ab, nach zwei Wochen war keine signifikante Erhöhung der apoptotischen Zellen im Vergleich zu Kontrolltieren mehr zu verzeichnen [34]. In einer weiteren Studie, die ebenfalls mit einer längerfristigen Anwendung von Doxorubicin befasste, zeigte sich ein starker Anstieg der TUNEL-positiven Zellen nach vier Tagen. Nach zwei Wochen waren diese Werte

deutlich niedriger. Nach drei Wochen kam es wiederum zu einem deutlichen Anstieg der apoptotischen Zellen [30].

Bei der akuten myokardialen Schädigung durch Doxorubicin scheint Apoptose demnach eine große Bedeutung zu haben. So kommt es kurz nach der Gabe von Doxorubicin zu einer vermehrten Apoptose, die dann aber wieder rückläufig ist. Bei Modellen, in denen das Medikament über mehrere Wochen gegeben wurde, scheint die Apoptose ebenfalls einem bestimmten Ablauf zu folgen. So könnte es anfangs wegen der Toxizität des Doxorubicins zu einer vermehrten Apoptose kommen, die dann im Lauf der Zeit rückläufig ist. Die dann im weiteren Verlauf nochmals auftretende Apoptose könnte sich im Rahmen der durch Doxorubicin ausgelösten Herzinsuffizienz abspielen. In Tiermodellen konnte bereits gezeigt werden, dass auch geringe Zellverluste durch Apoptose zu einer Herzinsuffizienz führen können [11]. Dies begründet sich unter anderem in der geringen Regenerationsfähigkeit des Herzmuskelgewebes [1]. Die kurz nach der Behandlung auftretende Apoptose kann also durchaus als ein pathophysiologischer Faktor bei der Doxorubicin-Kardiomyopathie angesehen werden.

Weiterhin überprüften wir die Relation der pro- bzw. antiapoptotischen Proteine Bax und Bcl-2 zueinander. Eine Behandlung mit Doxorubicin führte in unserem Experiment zu einer signifikant erhöhten Bax/Bcl-2-Relation. Dass Doxorubicin zu einer derartigen Verschiebung führt, konnte nachgewiesen werden [28, 30, 31]. Es konnte zudem belegt werden, dass sich der Anstieg der Relation analog zu den TUNEL-positiven Zellen verhält [30]. Die Proteine Bax und Bcl-2 scheinen bei dem durch Doxorubicin ausgelösten Zelltod eine Rolle zu spielen.

Weiterhin überprüften wir die Menge an phosphoryliertem Akt als Bestandteil eines antiapoptotischen Signaltransduktionsweges [1]. In unserer Studie führte die Behandlung mit Doxorubicin bei den Wildtypen ($B1^{+/+}$DOX) zu einer signifikanten Reduktion von phosphoryliertem Akt, was mit einigen schon vorliegenden Ergebnissen konform geht [131, 132]. In anderen Studien zeigte sich *in vivo* keine Reduktion oder sogar eine größere Menge des aktivierten Proteins nach Doxorubicin-Behandlung [133, 134]. Die dort verwendeten Modelle überprüften ebenfalls die akute Wirkung von Doxorubicin an Mäusen. Diese Abweichungen in den Ergebnissen können auf unterschiedliche Methoden bei der Quantifizierung von Akt, spezifische Studiendesigns oder unterschiedliche Mausstämme zurückgehen. Wie sich Doxorubicin auf den

antiapoptotischen PI-3K/Akt-Signaltransduktionsweg auswirkt, muss also noch weiter eruiert werden.

Unter basalen Bedingungen konnten wir keinen Einfluss des B1R auf Apoptose feststellen.

Die Menge an TUNEL-positiven Zellen, die Bax/Bcl-2-Relation und die Menge an aktiviertem Akt waren zwischen den Wildtypen ($B1^{+/+}$KON) und den B1R-Knockout-Mäusen ($B1^{-/-}$KON) nicht signifikant unterschiedlich. Allerdings war unter basalen Bedingungen auch fast keine Apoptose nachzuweisen. Andere Ergebnisse ergaben sich nach der Doxorubicin-Behandlung. Im Gegensatz zu den Wildtypen ($B1^{+/+}$DOX) führte die Doxorubicin-Behandlung bei den B1R-Knockout-Mäusen ($B1^{-/-}$DOX) nicht zu einer signifikanten Vermehrung der apoptotischen Zellen. Auch die Bax/Bcl-2-Relation war bei den B1R-Knockout-Mäusen ($B1^{-/-}$DOX) im Vergleich zu den Wildtypen ($B1^{+/+}$DOX) nicht erhöht. Analog hierzu zeigte sich keine Reduktion des phosphorylierten Akt. Dies lässt eine pro-apoptotische Wirkung des B1R bei der Doxorubicin-Kardiomyopathie vermuten.

In vielen Studien konnte die anti-apoptitische Wirkung des KKS nachgewiesen werden [77, 135, 136]. Hierbei scheint eine Aktivierung des anti-apoptotischen Signaltransduktionsweg PI-3K/Akt eine wichtige Rolle zu spielen [77]. Die anti-apoptotischen Eigenschaften des KKS im Herzen sind dabei bisher vor allem durch die Wirkung des B2R belegt. So wird die anti-apoptotische Wirkung eines lokalen Kallikrein-Gentransfers durch Gabe eines B2R-Antagonisten post Ischämie-Reperfusion aufgehoben. Die Gabe dieses Antagonisten verhindert die Aktivierung des PI-3K/Akt Signaltransduktionsweges durch das KKS und führt dadurch zu vermehrter Apoptose [77]. In einem anderen Ischämie-Reperfusionsmodell konnte *in vivo* gezeigt werden, dass ein B2R-Agonist, nicht jedoch ein B1R-Agonist zu reduzierter Apoptose und vermehrter Aktivierung von Akt führte [93]. Andererseits konnten anti-apoptotische Effekte des B1R auf Endothezellen an Extremitäten gezeigt werden [125]. Die Wirkung des B1R scheint also je nach Zelltyp, Gewebeart und Form der Schädigung unterschiedlich zu sein. Im Myokard bei der Doxorubicin-Kardiomyopathie scheint der B1R jedoch apoptotische Funktion zu haben, wie unsere Daten belegen. Dabei könnte durch den B1 direkt oder indirekt AKT inaktiviert werden, sodass unter anderem über Bax/Bcl-2 Apoptose induziert wird. Dieser Mechanismus muss jedoch noch mit einer Studie direkt nachgewiesen werden.

4.9. Inflammation

Bei Herzinsuffizienz, ausgelöst durch ischämische, dilatative oder hypertensive Kardiomyopathie, zeigt sich eine signifikant erhöhte Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen [137-140]. Es konnte nachgewiesen werden, dass Zytokine die kontraktile Funktion, kardiales *Remodeling* und Apoptose beeinflussen und so zu den pathologischen Prozessen bei diversen myokardialen Erkrankungen beitragen können [37]. Ob Inflammation auch bei der Doxorubicin-Kardiomyopathie eine Rolle spielt, wird kontrovers diskutiert. Als ein pro-inflammatroisches Zytokin haben wir in unserer Studie Interleukin-6 analysiert.

In dieser Studie führte die Behandlung mit Doxorubicin bei den Wildtypen ($B1^{+/+}$DOX) zu einer signifikant erhöhten Menge der IL-6 mRNA im Vergleich zu den nicht behandelten Tieren ($B1^{+/+}$KON). Dies spricht für eine inflammatorische Komponente bei der akuten Doxorubicin-Kardiotoxizität. Epirubicin, ebenfalls ein Anthracyclin, gehört mit Doxorubicin zu den häufig angewandten antineoplastischen Anthrazyklinen. Bei Menschen konnte festgestellt werden, dass die Behandlung mit diesem Medikament zu einer signifikanten Erhöhung der IL-6 Plasmalevel führte. Diese Erhöhung korrelierte mit der Verschlechterung der linksventriklulären Pumpfunktion [42]. Es konnte auch gezeigt werden, dass Doxorubicin eine vermehrte Akkumulation von Leukozyten im Myokardgewebe bewirkt [141]. Andererseits konnten Lou *et al.* in einer *in-vivo*-Studie keinen Anstieg von Zytokinen wie TNF-α oder auch IL-6 nachweisen [43]. Die Unterschiede zu unseren Ergebnissen könnten darin begründet sein, dass in unserer Studie ein akutes Modell mit einer hohen einmaligen Dosis verwendet wurde. Bei der Studie von Lou *et al.* erhielten die Tiere das Medikament in einem Zeitraum von über zwei Wochen [43]. Inwieweit Inflammation bei der Doxorubicin-Kardiomyopathie eine Rolle spielt, muss also noch genauer untersucht werden. Bei dem Erfassen von Zytokinspiegeln scheint abermals der Messzeitpunkt und das jeweilige Studienmodell die Ergebnisse zu beeinflussen.

Die Kinine und ihre Rezeptoren vermitteln in unterschiedlichsten Geweben pro-inflammatorische Effekte. Diese Wirkung der Kinine scheint bei Erkrankungen wie Sepsis, Asthma Bronchiale, Angioödem oder auch bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen von hoher Relevanz zu sein [52, 57-60]. Im Myokard scheint das KKS jedoch eine anti-inflammatorische Wirkung zu zeigen. So konnte nachgewiesen

werden, dass eine lokale Infusion von *Tissue*-Kallikrein nach experimentellem Myokardinfarkt anti-inflammatorisch wirkt [135]. Auch in einem Ischämie-Reperfusionsmodell konnte die anti-inflammatorische Wirkung eines Kallikrein-Gentransfers nachgewiesen werden [142]. Bei einem Modell mit experimentellem Diabetes Mellitus zeigten Ratten, welche das humane Kallikrein überexprimieren, weniger Inflammation und Zytokin-Expression [143]. Hierbei scheint vor allem der B2R anti-inflammatorisch zu wirken, da ein B2R-Antagonist diese positiven Effekte des KKS aufhebt [135, 142].

In dieser Studie wiesen die B1R-Knockout-Mäuse ($B1^{-/-}$DOX) nach der Doxorubicin-Behandlung eine signifikant geringere IL-6-Expression im Vergleich zu den Wildtypen ($B1^{+/+}$DOX) auf. Eine direkte Vergleichsstudie der Rolle des B1R bei kardialer Inflammation existiert nicht. In anderen Geweben konnte jedoch auch eine pro-inflammatorische Wirkung des Rezeptors demonstriert werden. So kommt es bei B1R-Knockout-Mäusen zu einer geringeren Leukozyten-Migration in entzündeten Geweben [144]. Auch in einem intestinalen Ischämie-Reperfusions-Modell konnte eine reduzierte Inflammation bei den B1R-Knockout-Mäusen festgestellt werden [145].

Dies lässt analog zu unseren Daten auf eine pro-inflammatorische Wirkung des B1R schließen.

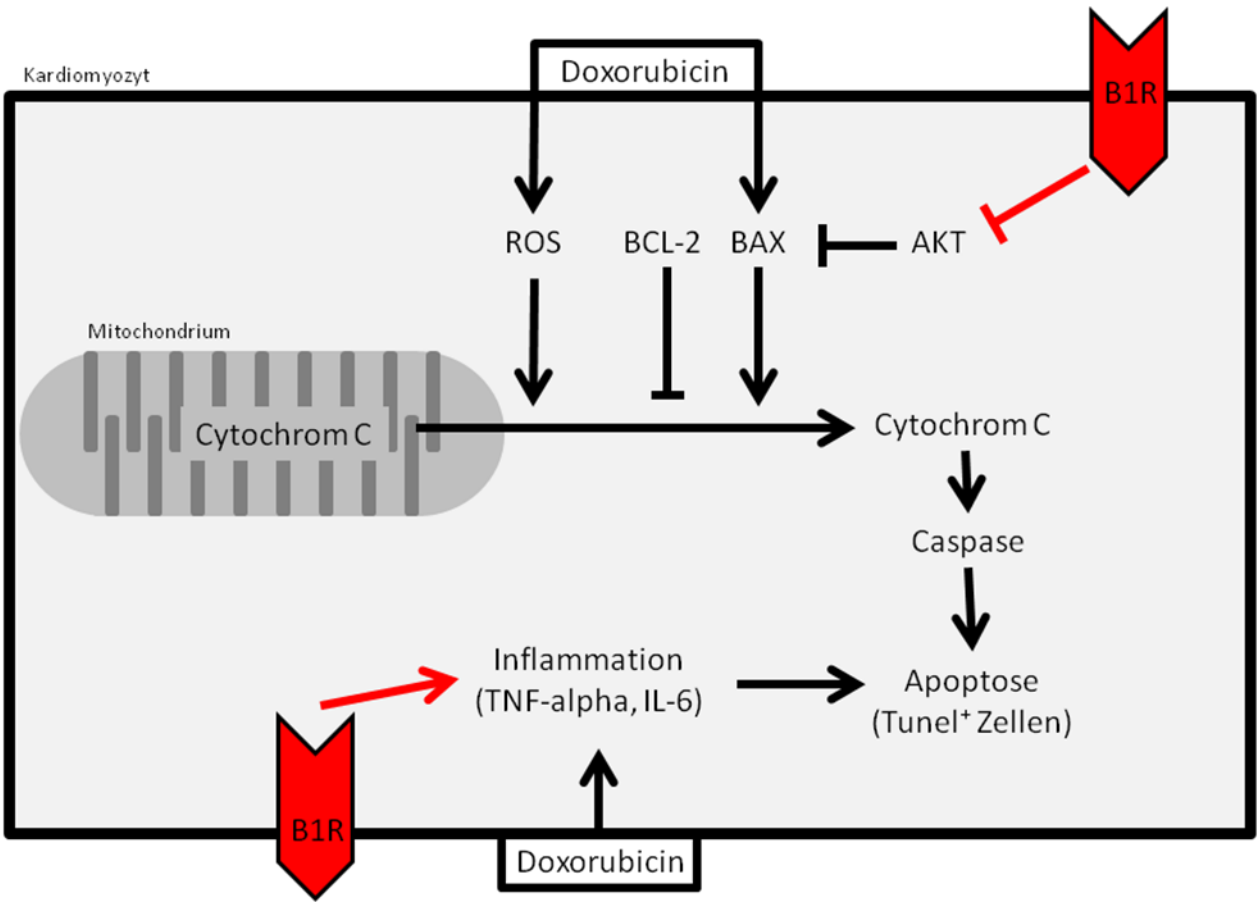


Abb.3 B1R (Bradykinin-Typ-1-Rezeptor) TNF-alpha (Tumornekrosefaktor-alpha), IL-6 (Interleukin-6), ROS (Reactive Oxygen Species), BCL-2 (B-Cell-Lymphoma-2), Akt (Proteinkinase B), Bax (BCL-2 associated Protein X)

4.10. Bedeutung dieser Studie

In dieser Studie konnten wir nachweisen, dass eine Doxorubicin-Behandlung im Tiermodell zu einer Verschlechterung der Herzfunktion führt. Als Ursachen hierfür sind eine vermehrte Apoptose sowie Inflammation im Myokardgewebe zu nennen. Der B1R scheint bei der Entwicklung dieses Krankheitsbildes eine Rolle zu spielen. So zeigte sich, dass eine Deletion des Rezeptors die Verschlechterung der Herzfunktion verhindert. Dies war mit einer reduzierten myokardialen Apoptose und auch Inflammation bei den B1R-Knockout-Tieren verbunden. Diese Daten sollten in weiteren Studien überprüft werden. So wäre es von Interesse, zu hinterfragen, ob eine pharmakologische Antagonisierung des B1-Rezeptors ähnliche Wirkungen hat. Dadurch könnte aus dieser Studie möglicherweise eine Therapieoption für Menschen vor Doxorubicin-Therapie hervorgehen (was selbstverständlich durch weitere Studien

belegt werden muss). So könnte entweder der Herzschaden durch parelelle Gabe eines B1R-Antagonisten reduziert werden oder die Menge von Doxorubicin erhöht werden.

4.11. Einschränkungen dieser Studie

Die Einschränkungen dieser Studie ergeben sich aus der generellen Übertragbarkeit eines Tiermodells auf die menschliche Physiologie und Pathophysiologie. Hämodynamisch könnten hier nicht nur die bei Tieren erheblich höhere Herzfrequenz und die verwendete Narkose die Ergebnisse beeinflussen. Auch scheinen die pathophysiologischen Mechanismen bei der Doxorubicin-Kardiomyopathie im Tiermodell denen beim Menschen zwar zu ähneln, sind aber natürlich nur bedingt übertragbar. Weitere Versuche mit Langzeitmodellen der Doxorubicin-Kardiomyopathie könnten hier unsere Ergebnisse weiter verifizieren. Auch die in vorliegender Studie verwendeten Knockout-Mäuse bringen eine Einschränkung der Übertragung auf eine pharmakologische Inhibition des Rezeptors beim Menschen mit sich. Hier könnten Untersuchungen mit entsprechenden Antagonisten Aufschluss geben.

5. Zusammenfassung

Das Zytostatikum Doxorubicin ist ein bei unterschiedlichsten neoplastischen Erkrankungen mit großem Erfolg eingesetztes Medikament. Dieser Erfolg wird jedoch durch das Auftreten einer Kardiomyopathie limitiert. Als Mechanismen bei dieser Kardiomyopathie werden unter anderem ein erhöhter oxidativer Stress, kardiale Apoptose und Inflammation angenommen. Das Kallikrein-Kinin-System ist ein ubiquitär und auch lokal im Herzmuskelgewebe vorkommendes System. Viele kardioprotektive Wirkungen des KKS wurden beschrieben. Diese scheinen vor allem über den Bradykinin Typ 2 Rezeptor vermittelt zu werden. Die Rolle des Bradykinin Typ 1 Rezeptors ist umstritten. Es konnten einerseits kardioprotektive, andererseits aber auch gegenteilige Wirkungen des Rezeptors beschrieben werden.

Ziel dieser Studie war es, die Rolle des Bradykinin Typ 1 Rezeptors bei der Doxorubicin Kardiomyopathie zu untersuchen.

In dieser Studie wurden Mäuse verwendet, welche eine Deletion des Bradykinin Typ 1 Rezeptors aufwiesen. Die Tiere wurden mit einer einmaligen hohen Dosis von Doxorubicin behandelt, um die kardiotoxische Wirkung des Medikaments zu prüfen. Hierfür wurden hämodynamische Parameter mit der Konduktanzmethode untersucht. Um mögliche Mechanismen der Toxizität des Medikamentes zu erfassen, wurden sowohl kardiale Apoptose als auch intrakardiale Inflammation betrachtet. Es erfolgte eine Quantifizierung der apoptotischen Zellen durch TUNEL-Färbung und die Erfassung der Expression des proapoptotischen Faktors Bax und der antiapoptotischen Faktoren Bcl-2 und Akt. Um eine Aussage über die kardiale Inflammation treffen zu können, wurde die Expression des proinflammatorischen Zytokins Il-6 erfasst.

Die Behandlung mit Doxorubicin führte bei den Wildtypen zu einer signifikant reduzierten Herzfunktion. Als Ursache hierfür fand sich eine vermehrte intrakardiale Apoptose und Inflammation. Im Vergleich zu den Wildtypen wiesen die Mäuse mit einer Deletion des Bradykinin Typ 1 Rezeptors nach der Doxorubicin-Behandlung eine signifikant bessere Herzfunktion auf. Als Ursache hierfür fand sich eine signifikant geringere kardiale Apoptose und Inflammation.

Eine Deletion des Bradykinin Typ 1 Rezeptors wirkt sich in einem Tiermodell der Doxorubicin-Kardiomyopathie kardioprotektiv aus.

6. Literaturverzeichnis

1. Takemura, G.H. Fujiwara. Doxorubicin-induced cardiomyopathy from the cardiotoxic mechanisms to management. Prog Cardiovasc Dis 2007;49:330-52.
2. Weiss, R.B. The anthracyclines: will we ever find a better doxorubicin? Semin Oncol 1992;19:670-86.
3. Outomuro, D., D.R. Grana, F. AzzatoJ. Milei. Adriamycin-induced myocardial toxicity: new solutions for an old problem? Int J Cardiol 2007;117:6-15.
4. Lefrak, E.A., J. Pitha, S. RosenheimJ.A. Gottlieb. A clinicopathologic analysis of adriamycin cardiotoxicity. Cancer 1973;32:302-14.
5. Herman, E., R. Mhatre, I.P. Lee, J. VickV.S. Waravdekar. A comparison of the cardiovascular actions of daunomycin, adriamycin and N-acetyldaunomycin in hamsters and monkeys. Pharmacology 1971;6:230-41.
6. van Acker, S.A., K. Kramer, E.E. Voest, J.A. Grimbergen, J. Zhang, W.J. van der Vijgh, et al. Doxorubicin-induced cardiotoxicity monitored by ECG in freely moving mice. A new model to test potential protectors. Cancer Chemother Pharmacol 1996;38:95-101.
7. Von Hoff, D.D., M.W. Layard, P. Basa, H.L. Davis, Jr., A.L. Von Hoff, M. Rozencweig, et al. Risk factors for doxorubicin-induced congestive heart failure. Ann Intern Med 1979;91:710-7.
8. Kremer, L.C., H.J. van der Pal, M. Offringa, E.C. van DalenP.A. Voute. Frequency and risk factors of subclinical cardiotoxicity after anthracycline therapy in children: a systematic review. Ann Oncol 2002;13:819-29.
9. Kremer, L.C., E.C. van Dalen, M. OffringaP.A. Voute. Frequency and risk factors of anthracycline-induced clinical heart failure in children: a systematic review. Ann Oncol 2002;13:503-12.
10. Lipshultz, S.E., S.R. Lipsitz, S.E. Sallan, V.M. Dalton, S.M. Mone, R.D. Gelber, et al. Chronic progressive cardiac dysfunction years after doxorubicin therapy for childhood acute lymphoblastic leukemia. J Clin Oncol 2005;23:2629-36.

11. Minotti, G., P. Menna, E. Salvatorelli, G. CairoL. Gianni. Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. Pharmacol Rev 2004;56:185-229.
12. Chatterjee, K., J. Zhang, N. HonboJ.S. Karliner. Doxorubicin Cardiomyopathy. Cardiology 2009;115:155-162.
13. Simunek, T., M. Sterba, O. Popelova, M. Adamcova, R. HrdinaV. Gersl. Anthracycline-induced cardiotoxicity: overview of studies examining the roles of oxidative stress and free cellular iron. Pharmacol Rep 2009;61:154-71.
14. Ceconi, C., A. Boraso, A. CargnoniR. Ferrari. Oxidative stress in cardiovascular disease: myth or fact? Arch Biochem Biophys 2003;420:217-21.
15. Doroshow, J.H., G.Y. LockerC.E. Myers. Enzymatic defenses of the mouse heart against reactive oxygen metabolites: alterations produced by doxorubicin. J Clin Invest 1980;65:128-35.
16. Sarvazyan, N. Visualization of doxorubicin-induced oxidative stress in isolated cardiac myocytes. Am J Physiol 1996;271:H2079-85.
17. Konorev, E.A., M.C. KennedyB. Kalyanaraman. Cell-permeable superoxide dismutase and glutathione peroxidase mimetics afford superior protection against doxorubicin-induced cardiotoxicity: the role of reactive oxygen and nitrogen intermediates. Arch Biochem Biophys 1999;368:421-8.
18. Davies, K.J.J.H. Doroshow. Redox cycling of anthracyclines by cardiac mitochondria. I. Anthracycline radical formation by NADH dehydrogenase. J Biol Chem 1986;261:3060-7.
19. Siveski-Iliskovic, N., M. Hill, D.A. ChowP.K. Singal. Probucol protects against adriamycin cardiomyopathy without interfering with its antitumor effect. Circulation 1995;91:10-5.
20. Li, T., I. DanelisenP.K. Singal. Early changes in myocardial antioxidant enzymes in rats treated with adriamycin. Mol Cell Biochem 2002;232:19-26.
21. Doroshow, J.H., G.Y. Locker, J. BaldingerC.E. Myers. The effect of doxorubicin on hepatic and cardiac glutathione. Res Commun Chem Pathol Pharmacol 1979;26:285-95.
22. Kalyanaraman, B., J. Joseph, S. Kalivendi, S. Wang, E. KonorevS. Kotamraju. Doxorubicin-induced apoptosis: implications in cardiotoxicity. Mol Cell Biochem 2002;234-235:119-24.

23. Kumar, D., H. LouP.K. Singal. Oxidative stress and apoptosis in heart dysfunction. Herz 2002;27:662-8.
24. Narula, J., N. Haider, E. ArbustiniY. Chandrashekhar. Mechanisms of disease: apoptosis in heart failure--seeing hope in death. Nat Clin Pract Cardiovasc Med 2006;3:681-8.
25. Reeve, J.L., A.M. Duffy, T. O'BrienA. Samali. Don't lose heart--therapeutic value of apoptosis prevention in the treatment of cardiovascular disease. J Cell Mol Med 2005;9:609-22.
26. Kunapuli, S., S. RosanioE.R. Schwarz. "How do cardiomyocytes die?" apoptosis and autophagic cell death in cardiac myocytes. J Card Fail 2006;12:381-91.
27. Gustafsson, A.B.R.A. Gottlieb. Bcl-2 family members and apoptosis, taken to heart. Am J Physiol Cell Physiol 2007;292:C45-51.
28. Nozaki, N., T. Shishido, Y. TakeishiI. Kubota. Modulation of doxorubicin-induced cardiac dysfunction in toll-like receptor-2-knockout mice. Circulation 2004;110:2869-74.
29. Chen, X., Y. Chen, Y. Bi, N. Fu, C. Shan, S. Wang, et al. Preventive cardioprotection of erythropoietin against doxorubicin-induced cardiomyopathy. Cardiovasc Drugs Ther 2007;21:367-74.
30. Kumar, D., L.A. Kirshenbaum, T. Li, I. DanelisenP.K. Singal. Apoptosis in adriamycin cardiomyopathy and its modulation by probucol. Antioxid Redox Signal 2001;3:135-45.
31. Spallarossa, P., S. Garibaldi, P. Altieri, P. Fabbi, V. Manca, S. Nasti, et al. Carvedilol prevents doxorubicin-induced free radical release and apoptosis in cardiomyocytes in vitro. J Mol Cell Cardiol 2004;37:837-46.
32. van Empel, V.P.L.J. De Windt. Myocyte hypertrophy and apoptosis: a balancing act. Cardiovasc Res 2004;63:487-99.
33. Wu, W., W.L. Lee, Y.Y. Wu, D. Chen, T.J. Liu, A. Jang, et al. Expression of constitutively active phosphatidylinositol 3-kinase inhibits activation of caspase 3 and apoptosis of cardiac muscle cells. J Biol Chem 2000;275:40113-9.
34. Arola, O.J., A. Saraste, K. Pulkki, M. Kallajoki, M. ParvinenL.M. Voipio-Pulkki. Acute doxorubicin cardiotoxicity involves cardiomyocyte apoptosis. Cancer Res 2000;60:1789-92.

35. Torre-Amione, G. Immune activation in chronic heart failure. Am J Cardiol 2005;95:3C-8C; discussion 38C-40C.
36. Abou El Hassan, M.A., H.M. Verheul, A.S. Jorna, C. Schalkwijk, J. van Bezu, W.J. van der Vijgh, et al. The new cardioprotector Monohydroxyethylrutoside protects against doxorubicin-induced inflammatory effects in vitro. Br J Cancer 2003;89:357-62.
37. El-Menyar, A.A. Cytokines and myocardial dysfunction: state of the art. J Card Fail 2008;14:61-74.
38. Hecker, J.F. Survival of intravenous chemotherapy infusion sites. Br J Cancer 1990;62:660-2.
39. Fujihira, S., T. Yamamoto, M. Matsumoto, K. Yoshizawa, Y. Oishi, T. Fujii, et al. The high incidence of atrial thrombosis in mice given doxorubicin. Toxicol Pathol 1993;21:362-8.
40. Deepa, P.R.P. Varalakshmi. Biochemical evaluation of the inflammatory changes in cardiac, hepatic and renal tissues of adriamycin-administered rats and the modulatory role of exogenous heparin-derivative treatment. Chem Biol Interact 2005;156:93-100.
41. Bruynzeel, A.M., M.A. Abou El Hassan, C. Schalkwijk, J. Berkhof, A. Bast, H.W. Niessen, et al. Anti-inflammatory agents and monoHER protect against DOX-induced cardiotoxicity and accumulation of CML in mice. Br J Cancer 2007;96:937-43.
42. Mercuro, G., C. Cadeddu, A. Piras, M. Dessi, C. Madeddu, M. Deidda, et al. Early epirubicin-induced myocardial dysfunction revealed by serial tissue Doppler echocardiography: correlation with inflammatory and oxidative stress markers. Oncologist 2007;12:1124-33.
43. Lou, H., I. DanelisenP.K. Singal. Cytokines are not upregulated in adriamycin-induced cardiomyopathy and heart failure. J Mol Cell Cardiol 2004;36:683-90.
44. Billingham, M.E., J.W. Mason, M.R. BristowJ.R. Daniels. Anthracycline cardiomyopathy monitored by morphologic changes. Cancer Treat Rep 1978;62:865-72.
45. Bristow, M.R., W.S. Sageman, R.H. Scott, M.E. Billingham, R.E. Bowden, R.S. Kernoff, et al. Acute and chronic cardiovascular effects of doxorubicin in the dog:

the cardiovascular pharmacology of drug-induced histamine release. J Cardiovasc Pharmacol 1980;2:487-515.

46. Chatterjee, K., J. Zhang, R. Tao, N. HonboJ.S. Karliner. Vincristine attenuates doxorubicin cardiotoxicity. Biochem Biophys Res Commun 2008;373:555-60.
47. Bien, S., A. Riad, C.A. Ritter, M. Gratz, F. Olshausen, D. Westermann, et al. The endothelin receptor blocker bosentan inhibits doxorubicin-induced cardiomyopathy. Cancer Res 2007;67:10428-35.
48. Riad, A., S. Bien, D. Westermann, P.M. Becher, K. Loya, U. Landmesser, et al. Pretreatment with statin attenuates the cardiotoxicity of Doxorubicin in mice. Cancer Res 2009;69:695-9.
49. Tallaj, J.A., V. Franco, B.K. Rayburn, L. Pinderski, R.L. Benza, S. Pamboukian, et al. Response of doxorubicin-induced cardiomyopathy to the current management strategy of heart failure. J Heart Lung Transplant 2005;24:2196-201.
50. Shaddy, R.E., S.L. Olsen, M.R. Bristow, D.O. Taylor, E.A. Bullock, L.Y. Tani, et al. Efficacy and safety of metoprolol in the treatment of doxorubicin-induced cardiomyopathy in pediatric patients. Am Heart J 1995;129:197-9.
51. Ludke, A.R., A.A. Al-Shudiefat, S. Dhingra, D.S. JassalP.K. Singal. A concise description of cardioprotective strategies in doxorubicin-induced cardiotoxicity. Can J Physiol Pharmacol 2009;87:756-63.
52. Leeb-Lundberg, L.M., F. Marceau, W. Muller-Esterl, D.J. PettiboneB.L. Zuraw. International union of pharmacology. XLV. Classification of the kinin receptor family: from molecular mechanisms to pathophysiological consequences. Pharmacol Rev 2005;57:27-77.
53. Moreau, M.E., N. Garbacki, G. Molinaro, N.J. Brown, F. MarceauA. Adam. The kallikrein-kinin system: current and future pharmacological targets. J Pharmacol Sci 2005;99:6-38.
54. Yayama, K., M. Nagaoka, M. TakanoH. Okamoto. Expression of kininogen, kallikrein and kinin receptor genes by rat cardiomyocytes. Biochim Biophys Acta 2000;1495:69-77.
55. Liesmaa, I., A. Kuoppala, N. Shiota, J.O. Kokkonen, K. Kostner, M. Mayranpaa, et al. Increased expression of bradykinin type-1 receptors in endothelium of

intramyocardial coronary vessels in human failing hearts. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2005;288:H2317-22.

56. Villarreal, F.J., T. BahnsonN.N. Kim. Human cardiac fibroblasts and receptors for angiotensin II and bradykinin: a potential role for bradykinin in the modulation of cardiac extracellular matrix. Basic Res Cardiol 1998;93 Suppl 3:4-7.
57. Frick, I.M., L. BjorckH. Herwald. The dual role of the contact system in bacterial infectious disease. Thromb Haemost 2007;98:497-502.
58. Akbary, A.M., K.J. WirthB.A. Scholkens. Efficacy and tolerability of Icatibant (Hoe 140) in patients with moderately severe chronic bronchial asthma. Immunopharmacology 1996;33:238-42.
59. Bernstein, J.A. Hereditary angioedema: a current state-of-the-art review, VIII: current status of emerging therapies. Ann Allergy Asthma Immunol 2008;100:S41-6.
60. Stadnicki, A., E. Pastucha, G. Nowaczyk, U. Mazurek, D. Plewka, G. Machnik, et al. Immunolocalization and expression of kinin B1R and B2R receptors in human inflammatory bowel disease. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2005;289:G361-6.
61. Sharma, J.N. Role of tissue kallikrein-kininogen-kinin pathways in the cardiovascular system. Arch Med Res 2006;37:299-306.
62. Chao, J., G. Bledsoe, H. YinL. Chao. The tissue kallikrein-kinin system protects against cardiovascular and renal diseases and ischemic stroke independently of blood pressure reduction. Biol Chem 2006;387:665-75.
63. Abelous, J.E. Bardier. Les substances hypotensives de l´urine humaine normale. Cr Soc Biol. 1909:511-512.
64. Sharma, J.N. Cardiovascular activities of the bradykinin system. ScientificWorldJournal 2008;8:384-93.
65. Cockcroft, J.R., P.J. Chowienczyk, S.E. Brett, N. BenderJ.M. Ritter. Inhibition of bradykinin-induced vasodilation in human forearm vasculature by icatibant, a potent B2-receptor antagonist. Br J Clin Pharmacol 1994;38:317-21.
66. Sharma, J.N., J.M. Stewart, S.S. Mohsin, M. KatoriR. Vavrek. Influence of a kinin antagonist on acute hypotensive responses induced by bradykinin and captopril in spontaneously hypertensive rats. Agents Actions Suppl 1992;38 (Pt 3):258-69.

67. Regoli, D.C., F. MarceauJ. Lavigne. Induction of beta 1-receptors for kinins in the rabbit by a bacterial lipopolysaccharide. Eur J Pharmacol 1981;71:105-15.
68. deBlois, D.R.A. Horlick. Endotoxin sensitization to kinin B(1) receptor agonist in a non-human primate model: haemodynamic and pro-inflammatory effects. Br J Pharmacol 2001;132:327-35.
69. Witherow, F.N., A. Helmy, D.J. Webb, K.A. FoxD.E. Newby. Bradykinin contributes to the vasodilator effects of chronic angiotensin-converting enzyme inhibition in patients with heart failure. Circulation 2001;104:2177-81.
70. Spillmann, F., S. Van Linthout, H.P. SchultheissC. Tschope. Cardioprotective mechanisms of the kallikrein-kinin system in diabetic cardiopathy. Curr Opin Nephrol Hypertens 2006;15:22-9.
71. Bledsoe, G., L. ChaoJ. Chao. Kallikrein gene delivery attenuates cardiac remodeling and promotes neovascularization in spontaneously hypertensive rats. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2003;285:H1479-88.
72. Li, H.J., H. Yin, Y.Y. Yao, B. Shen, M. Bader, L. Chao, et al. Tissue kallikrein protects against pressure overload-induced cardiac hypertrophy through kinin B2 receptor and glycogen synthase kinase-3beta activation. Cardiovasc Res 2007;73:130-42.
73. Silva, J.A., Jr., R.C. Araujo, O. Baltatu, S.M. Oliveira, C. Tschope, E. Fink, et al. Reduced cardiac hypertrophy and altered blood pressure control in transgenic rats with the human tissue kallikrein gene. FASEB J 2000;14:1858-60.
74. Wang, T., H. Li, C. Zhao, C. Chen, J. Li, J. Chao, et al. Recombinant adeno-associated virus-mediated kallikrein gene therapy reduces hypertension and attenuates its cardiovascular injuries. Gene Ther 2004;11:1342-50.
75. Griol-Charhbili, V., E. Messadi-Laribi, J.L. Bascands, D. Heudes, P. Meneton, J.F. Giudicelli, et al. Role of tissue kallikrein in the cardioprotective effects of ischemic and pharmacological preconditioning in myocardial ischemia. Faseb J 2005;19:1172-4.
76. Pinto, Y.M., M. Bader, J.B. Pesquero, C. Tschope, E. Scholtens, W.H. van Gilst, et al. Increased kallikrein expression protects against cardiac ischemia. Faseb J 2000;14:1861-3.

77. Yin, H., L. ChaoJ. Chao. Kallikrein/kinin protects against myocardial apoptosis after ischemia/reperfusion via Akt-glycogen synthase kinase-3 and Akt-Bad.14-3-3 signaling pathways. J Biol Chem 2005;280:8022-30.
78. Westermann, D., H.P. SchultheissC. Tschope. New perspective on the tissue kallikrein-kinin system in myocardial infarction: Role of angiogenesis and cardiac regeneration. Int Immunopharmacol 2008;8:148-54.
79. Duka, A., E. Kintsurashvili, I. Duka, D. Ona, T.A. Hopkins, M. Bader, et al. Angiotensin-converting enzyme inhibition after experimental myocardial infarct: role of the kinin B1 and B2 receptors. Hypertension 2008;51:1352-7.
80. Savvatis, K., D. Westermann, H.P. SchultheissC. Tschope. Kinins in cardiac inflammation and regeneration: Insights from ischemic and diabetic cardiomyopathy. Neuropeptides 2009.
81. Tschope, C., T. Walther, J. Koniger, F. Spillmann, D. Westermann, F. Escher, et al. Prevention of cardiac fibrosis and left ventricular dysfunction in diabetic cardiomyopathy in rats by transgenic expression of the human tissue kallikrein gene. Faseb J 2004;18:828-35.
82. Tschope, C., F. Spillmann, U. Rehfeld, M. Koch, D. Westermann, C. Altmann, et al. Improvement of defective sarcoplasmic reticulum Ca2+ transport in diabetic heart of transgenic rats expressing the human kallikrein-1 gene. Faseb J 2004;18:1967-9.
83. Lauton-Santos, S., S. Guatimosim, C.H. Castro, F.A. Oliveira, A.P. Almeida, M.F. Dias-Peixoto, et al. Kinin B1 receptor participates in the control of cardiac function in mice. Life Sci 2007;81:814-22.
84. Kintsurashvili, E., A. Duka, I. Ignjacev, G. Pattakos, I. GavrasH. Gavras. Age-related changes of bradykinin B1 and B2 receptors in rat heart. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2005;289:H202-5.
85. Xu, J., O.A. Carretero, Y. Sun, E.G. Shesely, N.E. Rhaleb, Y.H. Liu, et al. Role of the B1 kinin receptor in the regulation of cardiac function and remodeling after myocardial infarction. Hypertension 2005;45:747-53.
86. Tschope, C., S. Heringer-Walther, M. Koch, F. Spillmann, M. Wendorf, E. Leitner, et al. Upregulation of bradykinin B1-receptor expression after myocardial infarction. Br J Pharmacol 2000;129:1537-8.

87. Su, J.B., R. Houel, F. Heloire, F. Barbe, F. Beverelli, L. Sambin, et al. Stimulation of bradykinin B(1) receptors induces vasodilation in conductance and resistance coronary vessels in conscious dogs: comparison with B(2) receptor stimulation. Circulation 2000;101:1848-53.

88. Drapeau, G., D. deBloisF. Marceau. Hypotensive effects of Lys-des-Arg9-bradykinin and metabolically protected agonists of B1 receptors for kinins. J Pharmacol Exp Ther 1991;259:997-1003.

89. Nakhostine, N., C. Ribuot, D. Lamontagne, R. NadeauR. Couture. Mediation by B1 and B2 receptors of vasodepressor responses to intravenously administered kinins in anaesthetized dogs. Br J Pharmacol 1993;110:71-6.

90. Cruden, N.L., G.H. Tse, K.A. Fox, C.A. Ludlam, I. MegsonD.E. Newby. B1 kinin receptor does not contribute to vascular tone or tissue plasminogen activator release in the peripheral circulation of patients with heart failure. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2005;25:772-7.

91. Lagneux, C., A. AdamD. Lamontagne. A study of the mediators involved in the protection induced by exogenous kinins in the isolated rat heart. Int Immunopharmacol 2003;3:1511-8.

92. Tschope, C., F. Spillmann, C. Altmann, M. Koch, D. Westermann, N. Dhayat, et al. The bradykinin B1 receptor contributes to the cardioprotective effects of AT1 blockade after experimental myocardial infarction. Cardiovasc Res 2004;61:559-69.

93. Yin, H., J. Chao, M. BaderL. Chao. Differential role of kinin B1 and B2 receptors in ischemia-induced apoptosis and ventricular remodeling. Peptides 2007;28:1383-9.

94. Lagneux, C., M. Bader, J.B. Pesquero, P. DemengeC. Ribuot. Detrimental implication of B1 receptors in myocardial ischemia: evidence from pharmacological blockade and gene knockout mice. Int Immunopharmacol 2002;2:815-22.

95. Westermann, D., T. Walther, K. Savvatis, F. Escher, M. Sobirey, A. Riad, et al. Gene deletion of the kinin receptor B1 attenuates cardiac inflammation and fibrosis during the development of experimental diabetic cardiomyopathy. Diabetes 2009;58:1373-81.

96. Baan, J., E.T. van der Velde, H.G. de Bruin, G.J. Smeenk, J. Koops, A.D. van Dijk, et al. Continuous measurement of left ventricular volume in animals and humans by conductance catheter. Circulation 1984;70:812-23.

97. Feldman, M.D., Y. Mao, J.W. Valvano, J.A. PearceG.L. Freeman. Development of a multifrequency conductance catheter-based system to determine LV function in mice. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2000;279:H1411-20.

98. Steendijk, P., E. Staal, J.W. JukemaJ. Baan. Hypertonic saline method accurately determines parallel conductance for dual-field conductance catheter. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2001;281:H755-63.

99. Baan, J., T.T. Jong, P.L. Kerkhof, R.J. Moene, A.D. van Dijk, E.T. van der Velde, et al. Continuous stroke volume and cardiac output from intra-ventricular dimensions obtained with impedance catheter. Cardiovasc Res 1981;15:328-34.

100. Baan, J., E.T. van der VeldeP. Steendijk. Ventricular pressure-volume relations in vivo. Eur Heart J 1992;13 Suppl E:2-6.

101. Tulner, S.A., P. Steendijk, R.J. Klautz, J.J. Bax, M.J. Schalij, E.E. van der Wall, et al. Surgical ventricular restoration in patients with ischemic dilated cardiomyopathy: evaluation of systolic and diastolic ventricular function, wall stress, dyssynchrony, and mechanical efficiency by pressure-volume loops. J Thorac Cardiovasc Surg 2006;132:610-20.

102. Westermann, D., M. Kasner, P. Steendijk, F. Spillmann, A. Riad, K. Weitmann, et al. Role of left ventricular stiffness in heart failure with normal ejection fraction. Circulation 2008;117:2051-60.

103. Meliga, E., P. Steendijk, M. Valgimigli, F.J. Ten CateP.W. Serruys. Effects of percutaneous transluminal septal myocardial ablation for obstructive hypertrophic cardiomyopathy on systolic and diastolic left ventricular function assessed by pressure-volume loops. Am J Cardiol 2008;101:1179-84.

104. Feldman, M.D., J.M. Erikson, Y. Mao, C.E. Korcarz, R.M. LangG.L. Freeman. Validation of a mouse conductance system to determine LV volume: comparison to echocardiography and crystals. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2000;279:H1698-707.

105. Georgakopoulos, D., W.A. Mitzner, C.H. Chen, B.J. Byrne, H.D. Millar, J.M. Hare, et al. In vivo murine left ventricular pressure-volume relations by miniaturized conductance micromanometry. Am J Physiol 1998;274:H1416-22.

106. Winter, E.M., R.W. Grauss, D.E. Atsma, B. Hogers, R.E. Poelmann, R.J. van der Geest, et al. Left ventricular function in the post-infarct failing mouse heart by magnetic resonance imaging and conductance catheter: a comparative analysis. Acta Physiol (Oxf) 2008.

107. Wodey, E., L. Chonow, X. Beneux, O. Azzis, J.Y. BansardC. Ecoffey. Haemodynamic effects of propofol vs thiopental in infants: an echocardiographic study. Br J Anaesth 1999;82:516-20.

108. Janssen, B.J., T. De Celle, J.J. Debets, A.E. Brouns, M.F. CallahanT.L. Smith. Effects of anesthetics on systemic hemodynamics in mice. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2004;287:H1618-24.

109. Robert, J. Preclinical assessment of anthracycline cardiotoxicity in laboratory animals: predictiveness and pitfalls. Cell Biol Toxicol 2007;23:27-37.

110. Pesquero, J.B., R.C. Araujo, P.A. Heppenstall, C.L. Stucky, J.A. Silva, Jr., T. Walther, et al. Hypoalgesia and altered inflammatory responses in mice lacking kinin B1 receptors. Proc Natl Acad Sci U S A 2000;97:8140-5.

111. Xi, L., A. Das, Z.Q. Zhao, V.F. Merino, M. BaderR.C. Kukreja. Loss of myocardial ischemic postconditioning in adenosine A1 and bradykinin B2 receptors gene knockout mice. Circulation 2008;118:S32-7.

112. Xu, J., O.A. Carretero, E.G. Shesely, N.E. Rhaleb, J.J. Yang, M. Bader, et al. The kinin B1 receptor contributes to the cardioprotective effect of angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin receptor blockers in mice. Exp Physiol 2009;94:322-9.

113. Mishina, M.K. Sakimura. Conditional gene targeting on the pure C57BL/6 genetic background. Neurosci Res 2007;58:105-12.

114. Singal, P.K., N. Iliskovic, T. LiD. Kumar. Adriamycin cardiomyopathy: pathophysiology and prevention. Faseb J 1997;11:931-6.

115. Belham, M., A. Kruger, S. Mepham, G. FaganelloC. Pritchard. Monitoring left ventricular function in adults receiving anthracycline-containing chemotherapy. Eur J Heart Fail 2007;9:409-14.

116. Brouwer, C.A., J.A. Gietema, M.P. van den Berg, M.T. Bink-Boelkens, N.J. Elzenga, J. Haaksma, et al. Long-term cardiac follow-up in survivors of a malignant bone tumour. Ann Oncol 2006;17:1586-91.

117. Tassan-Mangina, S., D. Codorean, M. Metivier, B. Costa, C. Himberlin, C. Jouannaud, et al. Tissue Doppler imaging and conventional echocardiography after anthracycline treatment in adults: early and late alterations of left ventricular function during a prospective study. Eur J Echocardiogr 2006;7:141-6.

118. Hou, X.W., J. Son, Y. Wang, Y.X. Ru, Q. Lian, W. Majiti, et al. Granulocyte colony-stimulating factor reduces cardiomyocyte apoptosis and improves cardiac function in adriamycin-induced cardiomyopathy in rats. Cardiovasc Drugs Ther 2006;20:85-91.

119. Pacher, P., L. Liaudet, P. Bai, J.G. Mabley, P.M. Kaminski, L. Virag, et al. Potent metalloporphyrin peroxynitrite decomposition catalyst protects against the development of doxorubicin-induced cardiac dysfunction. Circulation 2003;107:896-904.

120. Neilan, T.G., D.S. Jassal, T.M. Perez-Sanz, M.J. Raher, A.D. Pradhan, E.S. Buys, et al. Tissue Doppler imaging predicts left ventricular dysfunction and mortality in a murine model of cardiac injury. Eur Heart J 2006;27:1868-75.

121. Mukhopadhyay, P., S. Batkai, M. Rajesh, N. Czifra, J. Harvey-White, G. Hasko, et al. Pharmacological inhibition of CB1 cannabinoid receptor protects against doxorubicin-induced cardiotoxicity. J Am Coll Cardiol 2007;50:528-36.

122. Sridhar, R., C. Dwivedi, J. Anderson, P.B. Baker, H.M. Sharma, P. Desai, et al. Effects of verapamil on the acute toxicity of doxorubicin in vivo. J Natl Cancer Inst 1992;84:1653-60.

123. Shizukuda, Y., S. Matoba, O.Y. Mian, T. NguyenP.M. Hwang. Targeted disruption of p53 attenuates doxorubicin-induced cardiac toxicity in mice. Mol Cell Biochem 2005;273:25-32.

124. Chahine, R., A. Adam, N. Yamaguchi, R. Gaspo, D. RegoliR. Nadeau. Protective effects of bradykinin on the ischaemic heart: implication of the B1 receptor. Br J Pharmacol 1993;108:318-22.

125. Emanueli, C., M. Bonaria Salis, T. Stacca, G. Pintus, R. Kirchmair, J.M. Isner, et al. Targeting kinin B(1) receptor for therapeutic neovascularization. Circulation 2002;105:360-6.

126. Tschope, C., S. Heringer-WaltherT. Walther. Regulation of the kinin receptors after induction of myocardial infarction: a mini-review. Braz J Med Biol Res 2000;33:701-8.

127. Spillmann, F., C. Altmann, M. Scheeler, M. Barbosa, D. Westermann, H.P. Schultheiss, et al. Regulation of cardiac bradykinin B1- and B2-receptor mRNA in experimental ischemic, diabetic, and pressure-overload-induced cardiomyopathy. Int Immunopharmacol 2002;2:1823-32.

128. Duka, I., E. Kintsurashvili, I. Gavras, C. Johns, M. BresnahanH. Gavras. Vasoactive potential of the b(1) bradykinin receptor in normotension and hypertension. Circ Res 2001;88:275-81.

129. Yayama, K., S. Matsuoka, M. Nagaoka, E. Shimazu, M. TakanoH. Okamoto. Down-regulation of bradykinin B2-receptor mRNA in the heart in pressure-overload cardiac hypertrophy in the rat. Biochem Pharmacol 2003;65:1017-25.

130. Riad, A., S. Bien, M. Gratz, F. Escher, D. Westermann, M.M. Heimesaat, et al. Toll-like receptor-4 deficiency attenuates doxorubicin-induced cardiomyopathy in mice. Eur J Heart Fail 2008;10:233-43.

131. Xiang, P., H.Y. Deng, K. Li, G.Y. Huang, Y. Chen, L. Tu, et al. Dexrazoxane protects against doxorubicin-induced cardiomyopathy: upregulation of Akt and Erk phosphorylation in a rat model. Cancer Chemother Pharmacol 2008.

132. Lou, H., I. DanelisenP.K. Singal. Involvement of mitogen-activated protein kinases in adriamycin-induced cardiomyopathy. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2005;288:H1925-30.

133. Liu, F.F., J.R. Stone, A.J. Schuldt, K. Okoshi, M.P. Okoshi, M. Nakayama, et al. Heterozygous knockout of neuregulin-1 gene in mice exacerbates doxorubicin-induced heart failure. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2005;289:H660-6.

134. Ichihara, S., Y. Yamada, Y. Kawai, T. Osawa, K. Furuhashi, Z. Duan, et al. Roles of oxidative stress and Akt signaling in doxorubicin cardiotoxicity. Biochem Biophys Res Commun 2007;359:27-33.

135. Yao, Y.Y., H. Yin, B. Shen, L. ChaoJ. Chao. Tissue kallikrein infusion prevents cardiomyocyte apoptosis, inflammation and ventricular remodeling after myocardial infarction. Regul Pept 2007;140:12-20.

136. Yoshida, H., J.J. Zhang, L. ChaoJ. Chao. Kallikrein gene delivery attenuates myocardial infarction and apoptosis after myocardial ischemia and reperfusion. Hypertension 2000;35:25-31.

137. Levine, B., J. Kalman, L. Mayer, H.M. FillitM. Packer. Elevated circulating levels of tumor necrosis factor in severe chronic heart failure. N Engl J Med 1990;323:236-41.
138. Long, C.S. The role of interleukin-1 in the failing heart. Heart Fail Rev 2001;6:81-94.
139. Torre-Amione, G., S. Kapadia, J. Lee, R.D. Bies, R. LebovitzD.L. Mann. Expression and functional significance of tumor necrosis factor receptors in human myocardium. Circulation 1995;92:1487-93.
140. Wollert, K.C.H. Drexler. The role of interleukin-6 in the failing heart. Heart Fail Rev 2001;6:95-103.
141. Saad, S.Y., T.A. NajjarA.C. Al-Rikabi. The preventive role of deferoxamine against acute doxorubicin-induced cardiac, renal and hepatic toxicity in rats. Pharmacol Res 2001;43:211-8.
142. Yin, H., L. ChaoJ. Chao. Nitric oxide mediates cardiac protection of tissue kallikrein by reducing inflammation and ventricular remodeling after myocardial ischemia/reperfusion. Life Sci 2008;82:156-65.
143. Tschope, C., T. Walther, F. Escher, F. Spillmann, J. Du, C. Altmann, et al. Transgenic activation of the kallikrein-kinin system inhibits intramyocardial inflammation, endothelial dysfunction and oxidative stress in experimental diabetic cardiomyopathy. Faseb J 2005;19:2057-9.
144. Araujo, R.C., R. Kettritz, I. Fichtner, A.C. Paiva, J.B. PesqueroM. Bader. Altered neutrophil homeostasis in kinin B1 receptor-deficient mice. Biol Chem 2001;382:91-5.
145. Souza, D.G., E.S. Lomez, V. Pinho, J.B. Pesquero, M. Bader, J.L. Pesquero, et al. Role of bradykinin B2 and B1 receptors in the local, remote, and systemic inflammatory responses that follow intestinal ischemia and reperfusion injury. J Immunol 2004;172:2542-8.

7. Anhang

7.1. Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

7.2. Wissenschaftliche Veröffentlichungen :

Westermann, D., T. Walther, K. Savvatis, F. Escher, **M. Sobirey**, A. Riad, et al. Gene deletion of the kinin receptor B1 attenuates cardiac inflammation and fibrosis during the development of experimental diabetic cardiomyopathy. Diabetes 2009;58:1373-81.

Westermann, D., Lettau, O., **Sobirey, M**., Becher, P., Savvatis, K., Riad, A., Bader, M., Schultheiss, H.P., Tschope, C. Doxorubicin cardiomyopathy induced inflammation and apoptosis is attenuated by gene deletion of the kinin B1 receptor. Biol Chem, 2008. 389(6):713-8

Riad, A., Jäger, S., **Sobirey, M**., Escher, F., Yaulema-Riss, A., Westermann, D., Karatas, A., Heimesaat, M., Bereswill, S., Dragun, D., Pauschinger, M., Schultheiss, H.P., Tschope C. Toll-like receptor-4 modulates survival byinduction of left ventricular remodeling after myocardial infarction in mice. J Immunol. 2008. 180(10):6954-61.

Riad, A., J. Du, S. Stiehl, D. Westermann, Z. Mohr, **M. Sobirey**, W. Doehner, V. Adams, M. Pauschinger, H.P. Schultheiss, and C. Tschope, Low-dose treatment with atorvastatin leads to anti-oxidative and anti-inflammatory effects in diabetes mellitus. European journal of pharmacology, 2007. 569(3): p. 204-11.

Riad, A., D. Unger, J. Du, D. Westermann, Z. Mohr, **M. Sobirey**, M. Dorenkamp, H.P. Schultheiss, and C. Tschope, Chronic inhibition of p38MAPK improves cardiac and endothelial function in experimental diabetes mellitus. European journal of pharmacology, 2007. 554(1): p. 40-5.

Westermann, D., S. Rutschow, S. Van Linthout, A. Linderer, C. Bucker-Gartner, **M. Sobirey,** A. Riad, M. Pauschinger, H.P. Schultheiss, and C. Tschope, Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase attenuates left ventricular dysfunction by mediating pro-inflammatory cardiac cytokine levels in a mouse model of diabetes mellitus. Diabetologia, 2006. 49(10): p. 2507-13.

7.3. Posterpräsentation :

Sobirey, M., A. Riad, D. Westermann, H.P. Schultheiss, C. Tschöpe, Veränderung der extrazellulären Matrix führt zu einer progredienten LV Dysfunktion bei der Diabetischen Kardiomyopthie, 29. Wissenschaftlicher Kongress HYPERTONIE 2005 der Deutschen Hochdruckliga e.V.

7.4. Danksagung

Mein Dank gilt besonders Professor Dr. Carsten Tschöpe für die Überlassung des Themas. Er betreute mich in seiner Arbeitsgruppe und stand mir immer hilfreich zur Seite. Er ermöglichte mir durch seine Anleitung das selbstständige und eigenverantwortliche Arbeiten in einem Forschungslabor zu erlernen.

Zusätzlich möchte ich mich bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe von Professor Tschöpe bedanken. Hier möchte ich insbesondere Dr. Dirk Westermann danken, der mich unterstützt hat und mir bei Fragen und Problemen geholfen hat. Das Arbeiten hat hier immer Spaß gemacht und für die anregenden Kommentare und Hilfestellungen bin ich sehr dankbar.

7.5. Selbstständigkeitserklärung

Ich, Meike Sobirey, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema „Eine Deletion des Bradykinin Typ-1 Rezeptors bewirkt eine reduzierte kardiale Apoptose und Inflammation und eine verbesserte linksventriluläre Pumpfunktion bei der Doxorubicin Kardiomyopathie “ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Berlin, den 31.07.2010

_____

Meike Sobirey