

**Kardioprotektiver Effekt von Cytosin-Phosphoguanin-
Oligonucleotiden in einem murinen "Closed Chest" Modell**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

Grigorij Schleifer geb. Afanasjew
aus Mogiljow/Weißrussland

2017

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: PD Dr. med. Se-Chan Kim
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Christoph Wilhelm

Tag der Mündlichen Prüfung: 22.03.2017

Aus der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und Operative Intensivmedizin
Direktor: Prof. Dr. med. Andreas Hoeft

Für meine Mutter

Anna Schleifer

und meinen Großvater

Grigorij Chleifer

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	7
1. Einleitung	11
1.1 Die angeborene Immunabwehr	11
1.2 Die Familie der Toll-like Rezeptoren	11
1.3 TLR9-Signaltransduktion	14
1.4 Regulation und Funktion der Inflammation	17
1.5 Epidemiologie und Pathophysiologie des Myokardinfarkts	18
1.6 Pathologie des Ischämie-Reperfusionsschadens	19
1.7 Rolle der mitochondrialen Permeabilitäts-Transitions-Pore	21
1.8 Kardiales Remodelling	23
1.9 Myokardiale Postkonditionierung	24
1.10 Signaltransduktion der Postkonditionierung	27
1.10.1 RISK-Signalweg	27
1.10.2 SAFE-Signalweg	28
1.10.3 Postkonditionierung mit CpG-Oligonukleotiden	29
1.11 Fragestellung	31
2. Material und Methoden	32
2.1 Versuchstiere und Haltungsbedingungen	32
2.2 In-vivo-Eingriffe	33
2.2.1 „Closed chest“ Modell	33
2.2.2 Versuchsprotokoll	34
2.2.3 Instrumentierung	36
2.2.4 Ischämie- / Reperfusionsversuche	40
2.2.5 Injektion von Phthaloblue	42
2.2.6 Herzpräparation	43
2.3 Herstellung von 1668-Thioat	44
2.4 TTC-Herstellung	45
2.5 TTC-Färbung	46
2.6 Planimetrie	47
2.7 Molekularbiologische Untersuchungen	48
2.7.1 Quantitative Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion	48
2.7.2 RNA-Isolation	49
2.7.3 cDNA-Synthese	50
2.7.4 Quantitative Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion	50
2.8 Verbrauchsmaterialien	52
2.9 Software	54
2.10 Statistische Analyse	54
3. Ergebnisse	55
3.1 Planimetrische Auswertung	55
3.2 Zytokinexpression	59
4. Diskussion	64
4.1 Einflüsse des Versuchsprotokolls auf die Infarktgröße	64
4.2 Die Bedeutung des TLR9 Ligand CpG-ODN nach I/R	69
4.2.1 Die Bedeutung des TLR9 Ligand CpG-ODN für die Infarktgröße	69
4.3 Zytokine und ihre Bedeutung für den I/R Schaden	70

4.4	„Closed Chest“Modell	73
5.	Zusammenfassung	75
6.	Literaturverzeichnis	77
7.	Danksagung	105
8 .	Lebenslauf	106

Abkürzungsverzeichnis

AAR	„Area at risk“
ACE	Angiotensin-konvertierendes Enzym
ANT	Adenin Nukleotid Translokator
Akt	Proteinkinase B
APAF1	„Apoptotic protease activating factor 1“
AP-1	AP-1 TranskriptionsFactor
APC	Antigen präsentierende Zelle
ATP	Adenosintriphosphat
Bax	Co-Faktor des Tumorsuppressor-Proteins p53
Bcl2	„B-cell lymphoma 2“
C	Celsius
C57BL/6	„C57 black 6“ Labormaus-Inzuchtlinie
cDNA	komplementäre DNA
CD	„Cluster of differentiation“
cGMP	zyklischesGuanosinmonophosphat
cm	Zentimeter
CpG	Cytosin-Phosphat-Guanin-Motiv
CpG-ODN	CpG-Oligodeoxynukleotide
CREB	„cAMP responsive element binding protein“
Ct	„Threshold cycle“
DAMP	„Danger associated molecular patterns“
DD	„Death Domain“
DEPC	Diethyldicarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsRNA	doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure
EF	Ejektionsfraktion
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK	Extrazelluläre signalregulierende Kinase
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid

G	Gauge, Maßeinheit für den Außendurchmesser einer Kanüle
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
GSK3 β	Glykogensynthasekinase-3- β
h	Stunde
HET	Haus für Experimentelle Therapie
HLA	Humanes Leukozyten Antigen
i.p.	intraperitoneal
IKK	I κ B Kinase
IL	Interleukin
IFN- α	Interferon- α
IPC	Ischämische Postkonditionierung
I/R	Ischämie/Reperfusion
IRF	Interferon regulierender Faktor
IRAK	Interleukin-1 Rezeptor-assoziierte Kinase
IS	Infarktgröße
JAK	Januskinase
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
KG	Körpergewicht
kDa	Kilodalton
LAD	„Left anterior descending“
LPS	Lipopolysaccharide
LRR	Leuzinreiche Region
LTA	Lipoteichonsäure
LV	Linker Ventrikel
min	Minute
μ l	Mikroliter
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MCMV	Maus Cytomegalovirus
MEK	„Mitogen-activated protein kinase kinase“
mm	Millimeter
MMP	Matrixmetalloproteinase
MyD88	Myeloider Differenzierungsfaktor 88

mPTP	Mitochondriale Permeabilitäts-Transitions-Pore
mRNA	messenger-RNA
NAAR	„Non-Area at Risk“
NaCl	Natriumchlorid
NAD	Nicotinamidadeninnukleotid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NF- κ B	„Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells“
NK	Natürliche Killerzellen
NO	Stickstoffmonoxid
ODN	Oligodesoxynukleotid
p35	Tumorsuppressorprotein p35
p38	MAPK
PAMP	Pathogen-assoziierte Molekülmuster
PBS	„Phosphate buffered saline“
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDK1	Phosphoinositid-abhängige Kinase 1
PI3K	Phosphoinositol-3 Kinase
PKB	Proteinkinase B
PRR	„Pathogen recognition receptors“
PRSW	„Preload-recruitable stroke work“
RAS	„Rat sarcoma“
RISK	„Reperfusion injury signaling kinase“
RIVA	Ramus interventricularis anterior
RNA	Ribonukleinsäure
RSV	„Respiratory syncytial virus“
RT-PCR	Quantitative Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
RT-qPCR	Quantitative Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion
ROS	„Reactive Oxygen Species“
RVU	Relative Volumeneinheit
RQ	Relativer Quotient
SAFE	„Survivor activating factor enhancement“

Sham	Scheinoperiert
SEM	Standardfehler
sek	Sekunde
SOCS1	„Suppressor of cytokine signaling-1“
SIGIRR	„Single immunoglobulin IL-1 receptor-related molecule“
ssRNA	Einzelstrang RNA
STAT	STAT-Protein, „Signal Transducer and Activator of Transcription“
TAK1	„Transforming growth factor- β associated kinase“
TGF	Transformierender Wachstumsfaktor
TIMP1	„Tissue inhibitor of metalloproteinases“
TIR	Toll/IL-1 Rezeptor Domäne
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF- α	Tumornekrosefaktor α
TNFR	Tumornekrosefaktorrezeptor
TTC	Triphenyltetrazoliumchlorid
TRAF6	Tumornekrosefaktor-Rezeptor-assoziiertes Faktor 6
VDAC	„Voltage-dependent anion channel“
WT	Wildtyp

1. Einleitung

1.1 Die angeborene Immunabwehr

Das Immunsystem wird in angeboren und erworben unterteilt. Das angeborene Immunsystem bildet die erste Instanz der Immunantwort. Das System ist für die Fremd-Eigen Diskrimination unentbehrlich und erkennt mit Hilfe der sogenannten Mustererkennungsrezeptoren (pattern recognition receptors, PRR), v.a. den Toll-like Rezeptoren (TLR) die Pathogen-assoziierten molekularen Muster (pathogen associated molecular patterns (PAMP)), oder die während der Zellschädigung entstehende Gefahr-assoziierte molekulare Muster (danger associated molecular patterns, DAMP). Konsekutiv wird dann eine unspezifische Immunantwort eingeleitet (Medzhitov, 2001). Die Hauptvertreter des angeborenen Immunsystems sind Makrophagen, Granulozyten, Mastzellen und natürliche Killerzellen.

Das erworbene Immunsystem ist evolutionsgeschichtlich deutlich jünger und zeichnet sich durch eine dynamische Anpassungsfähigkeit aus. Die Hauptakteure des erworbenen Immunsystems sind die T-Lymphozyten, die die Immunantwort auf der Zellebene vermitteln und die B-Lymphozyten, die humorale Immunität vertreten.

1.2 Die Familie der Toll-like Rezeptoren

Es ist bekannt, dass die Familie der PRRs, der die Toll-like Rezeptoren (TLR) angehören, eine entscheidende Rolle bei der Erkennung mikrobieller Bestandteile spielen und maßgeblich an der angeborenen Immunantwort beteiligt sind (Medzhitov, 2001; Newton and Dixit, 2012). Die Erkennung der Funktion des Toll Proteins bei der dorsoventralen Achsenbildung und bei der Immunabwehr gegen die Pilzinfektion bei der Fruchtfliege waren die Initialzündung bei der Erforschung der TLR Rezeptoren (Anderson et al., 1985; Lemaitre et al., 1996). Bislang wurden 11 TLRs im menschlichen Organismus gefunden. In der Maus wurden 13 Rezeptoren beschrieben (Akira et al., 2003, 2001; Kumagai et al., 2008; Kumar et al., 2009; Lim and Staudt, 2013). Die TLR1-9 sind sowohl im Menschen als auch in der Maus aktiv. Der TLR10 ist nur im Menschen funktionsfähig. Der TLR11 wiederum besitzt anders als bei der Maus keine Funktion im menschlichen Organismus, da ein Stopp-Codon im TLR11 Gen enthalten ist und der Rezeptor nicht exprimiert wird (Zhang et al.,

2004). Die Rezeptoren sind Glykoproteine und kommen sowohl auf der Oberfläche der Zelle, als auch intrazellulär vor. Auf der Oberfläche kommen die TLR1, 2, 4 und 6 vor. Der TLR2 bildet Homodimere, oder Heterodimere mit TLR1 oder TLR6 und wird von Peptidoglykanen, Lipopeptiden, gram-positiven Bakterien, Mykoplasmen oder Pilzen stimuliert. Die TLR5 und 11 befinden sich ebenfalls auf der Zelloberfläche und erkennen bakterielle Proteine, Flagellin (TLR5), oder Profilin-ähnliche Proteine (TLR11) (Zhang et al., 2004). Intrazellulär sind TLR3, 7, 8 und 9 lokalisiert. Sie sind für die Detektion bakterieller und viraler DNA wichtig. TLR3 erkennt doppelsträngige RNA (dsRNA). TLR7 und der humane TLR8 erkennen Imidazoquinolin-ähnliche Moleküle, oder Einzel-Strang RNA (ssRNA). TLR9 ist für die Detektion bakterieller und viraler DNA sowie Hemozoin zuständig. Interessanterweise kommen TLR auch im Myokard vor und das angeborene Immunsystem spielt eine zentrale Rolle in der Pathogenese kardiovaskulärer Erkrankungen (O. Boehm et al., 2013; Cao et al., 2013b; S. Frantz et al., 1999; S.-C. Kim et al., 2014; Kim et al., 2007; Knuefermann et al., 2004; Lohner et al., 2013; Mathur et al., 2011b). Die Tabelle 1 liefert eine Übersicht über die humanen TLR und ihre bisher bekannten Liganden.

Tab.1: Aufgelistet sind TLR Rezeptoren, ihre Liganden und die zur Signaltransduktion notwendigen Adapter. Weiterhin sind induzierte Zytokine dargestellt. Tabelle nach Kumar et al., 2009.

TLR	Lokalisation	Ligand	Adapter und Transkriptionsfaktoren	Induzierte Zytokine
TLR 1/2	Plasmamembran	Triacyllipopeptide	NF-κB	TNF-α, IL-6 etc.
TLR 2	Plasmamembran	Hitzeschockproteine, Lipopeptide, Peptidoglykane, Hämagglutinine, Glycosylphosphatidyl-inositolAnker	NF-κB	TNF-α, IL-6 etc.
TLR 3	Endosom	ssRNA, dsRNA, RSV, MCMV	NF-κB, IRF3, 7	TNF-α, IL-6, Typ 1 IFN etc.
TLR 4	Plasmamembran	LPS, Mannan, Glycoinositol-phospholipide (Trypanosoma cruzi), Hitzeschockproteine	NF-κB, IRF3, 7	TNF-α, IL-6, Typ 1 IFN etc.
TLR 5	Plasmamembran	Flagellin	NF-κB	TNF-α, IL-6 etc.
TLR 6/2	Plasmamembran	Diacyllipopeptide, LTA	NF-κB	TNF-α, IL-6 etc.
TLR 7	Endosom	ssRNA	NF-κB, IRF7	TNF-α, IL-6, Typ 1 IFN etc.
TLR 8	Endosom	ssRNA	NF-κB, IRF7	TNF-α, IL-6, Typ 1 IFN etc.
TLR 9	Endosom	dsDNA, Hemozoin	NF-κB, IRF7	TNF-α, IL-6, Typ 1 IFN etc.
TLR 11	Plasmamembran	Profilin-ähnliche Moleküle, uropathologische Bakterien	NF-κB	TNF-α, IL-6 etc.

1.3 TLR9-Signaltransduktion

Der TLR9 gehört zu der Familie der Mustererkennungsrezeptoren (pattern recognition receptors (PRRs)) und dient der Erkennung bakterieller und viraler DNA. Lange Zeit galt die bakterielle DNA als immunologisch inert. Krieg et al. (1995) zeigten jedoch eindrücklich, dass bakterielle DNA und synthetisch hergestellte Oligonukleotide, die unmethylierte CpG Dinukleotid-Sequenzen enthielten, einen Immunreiz auslösen können (Krieg et al., 1995). Hemmi et al. zeigten als erster, dass dieser Reiz durch den TLR9 vermittelt wird (Hemmi et al., 2000a). Es ist bekannt, dass das angeborene Immunsystem nicht nur durch Immunzellen repräsentiert wird. Kardiomyozyten selbst interagieren mit ihrer Umgebung und beeinflussen die Expression pro- und antiinflammatorischer Zytokine als Antwort auf äußere Stimuli wie die Ischämie/Reperfusion (I/R) (Boyd et al., 2006; Maria A Brown, 2004). Die Herzmuskelzellen exprimieren eine Vielzahl von TLRs wie TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR7 und TLR9 (Boyd et al., 2006). Einzelne Rezeptoren werden an den Oberflächen exprimiert, andere wie die TLR3, 7, 8 und 9 befinden sich im lysosomalen Kompartiment. Bakterielle DNA ist für Immunzellen initial nicht sichtbar und muss erst im sauren Milieu des Endosoms freigesetzt werden. Dafür muss die CpG-haltige bakterielle DNA in ein Endosom internalisiert werden, wo es nach der Reifung und Ansäuerung des Endosoms als TLR9/CpG-DNA Komplex vom Adapterprotein MyD88 (Myeloider Differenzierungsfaktor 88) erkannt wird und der TLR-Signalweg aktiviert wird (Ahmad-Nejad et al., 2002; Häcker et al., 1998). Der TLR9 hat einen ähnlichen Aufbau wie die anderen Mitglieder der TLR-Familie (Takeshita et al., 2004). Er besteht aus einer N-terminalen leucinreichen Domäne (LRR), die für die Erkennung der PAMP zuständig ist (Lim and Staudt, 2013). Es folgt eine transmembranäre Domäne und eine Toll/IL-1 Rezeptor Domäne (TIR), die dem IL-1-Rezeptor ähnlich ist. Die TIR-Domäne ist schließlich für die Aktivierung des Signalweges verantwortlich (Kumar et al., 2009). Der Rezeptor liegt intrazellulär auf der Oberfläche des Endoplasmatischen Retikulums (ER) und migriert bei Anwesenheit von CpG-ODN zum Endosom wo die Erkennung der ODN stattfindet. Der Rezeptor kommuniziert durch die TIR-Domäne mit dem Adapterprotein MyD88. Dieses Adapterprotein enthält ebenfalls eine TIR Domäne und eine Death Domäne (DD). Die Aktivierung des Rezeptors führt dazu, dass

MyD88 zum Rezeptorkomplex rekrutiert wird. Dieser Komplex ermöglicht die Assoziation der IRAK-1 (interleukin-1 receptor-associated kinase-1) mit der IRAK-4. Die IRAK-4 phosphoryliert die IRAK-1, woraufhin die IRAK-1 dissoziiert und mit der TRAF6 interagiert. Bei diesem Schritt wird die TRAF6 rekrutiert. Ab der TRAF6-Rekrutierung sind zwei Signalwege möglich. Die TRAF6 ist eine Ligase und aktiviert die Kinase TAK1 (transforming growth factor- β associated kinase) (Chao, 2009). Das ist der entscheidende Schritt, der zur Phosphorylierung der IKK (I κ B kinase) führt und die Translokation des NF- κ B (nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells) in den Nukleus bewirkt. Der Transkriptionsfaktor NF- κ B bewirkt vor allem die Expression inflammatorischer Zytokine wie TNF- α , IL-6 und IL-12 (Akira et al., 2003; Kumagai et al., 2008). Weiterhin werden die MAP-Kinasen (mitogen-activated protein kinases) wie die p38, JNK und ERK1/2 aktiviert, wodurch es zur Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors AP-1 kommt und dadurch ebenfalls inflammatorische Zytokine, Interferon und Chemokine freigesetzt werden (Abb. 1). TLR3, 4 und 9 sind weiterhin in der Lage über die Transkriptionsfaktoren IRF3 und IRF7 die Synthese von Interferon 1 zu beschleunigen, was bei der Erkennung von Viren von großer Bedeutung ist (Kumar et al., 2009).

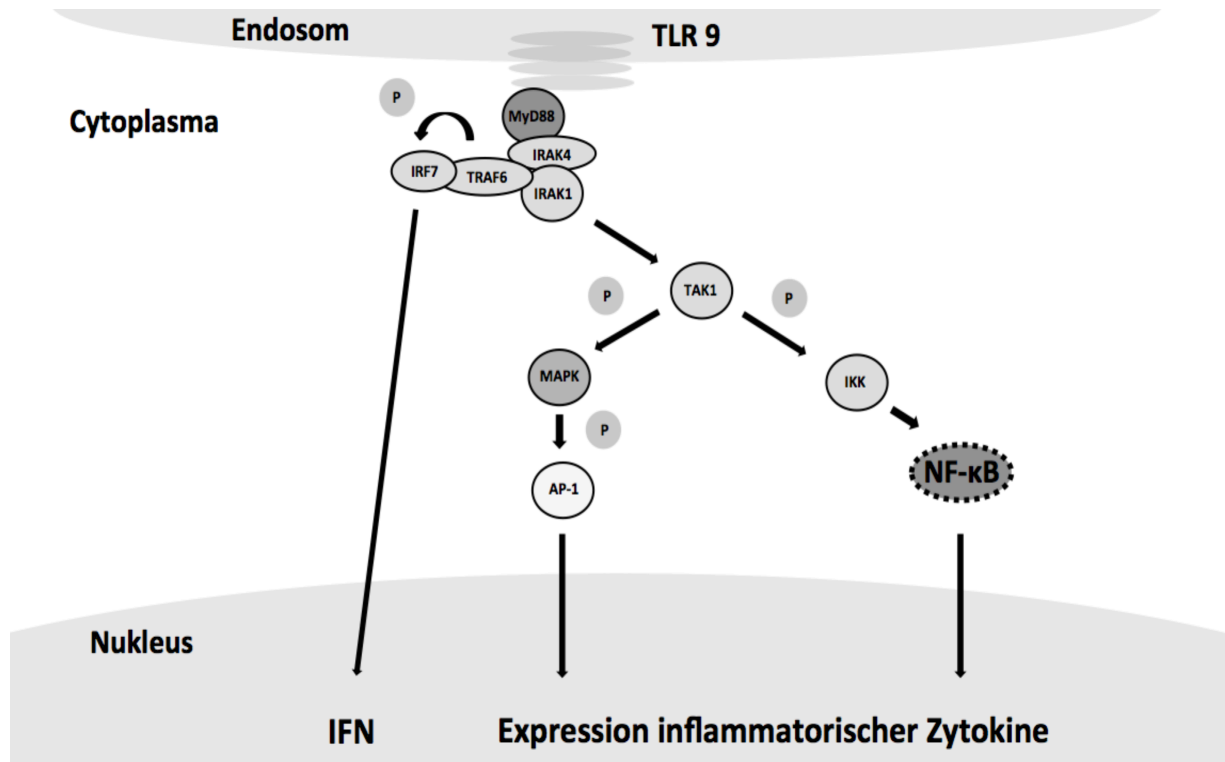


Abb. 1: Dargestellt ist eine Übersicht über den TLR9-Signalweg. Der TLR9 Rezeptor befindet sich im Endosom und aktiviert nach Erkennung der CpG-ODN den MyD88 – abhängigen Signalweg. Am Ende dieses Signalweges werden die Transkriptionsfaktoren AP-1 und NF-κB aktiviert und es kommt zur Modulation des Immunsystems mit Freisetzung von Interferon 1 und inflammatorischer Zytokine. (Modifiziert nach Kawai und Akira et al., 2006).

1.4 Regulation und Funktion der Inflammation

Wird das angeborene Immunsystem durch ein Pathogen stimuliert, können Makrophagen, dendritische Zellen, neutrophile und eosinophile Granulozyten sowie natürliche Killerzellen als Zeichen der Infektion aktiviert werden (Janeway and Medzhitov, 2002). Diese Zellen transformieren sich schnell in kurzlebige Komponenten des Immunsystems, um das Pathogen zu eliminieren. In bestimmten Fällen kooperieren das angeborene und das adaptive Immunsystem miteinander. Dies geschieht durch die Expression ko-stimulatorischer Oberflächenmoleküle, wie CD80 und CD86 auf den antigenpräsentierenden Zellen (APC), die durch den Transkriptionsfaktor NF- κ B reguliert werden. Die APC-aktivierten T-Lymphozyten schaffen dadurch eine Verbindung zum erworbenen Immunsystem (Janeway et al., 2001). Im Laufe der Immunantwort kommt es zur Zytokinfreisetzung und es werden mehr Leukozyten angezogen, indem die Adhäsionsfähigkeit der Abwehrzellen gesteigert wird und die kapilläre Permeabilität zunimmt (Newton and Dixit, 2012). Im Rahmen einer Sepsis kommt es zunächst zu einer exagziierten inflammatorischen Antwort. Bei Zusammenbruch der kapillären Membran und Vasoplegie imponiert dann das klinische Bild eines septischen Schocks. Gesellt sich dann noch ein septisch bedingtes myokardiales Low-Output-Syndrom hinzu, wird dies als eine septische Kardiomyopathie bezeichnet (Celes et al., 2013). Dabei kommt es v.a. zur Verminderung des Herzzeitvolumens als Folge der linksventrikulären Funktionsstörung (Parrillo et al., 1985). Diese entsteht jedoch nicht durch eine koronare Minderperfusion (Cunnion et al., 1986), sondern durch die Wirkung der Endotoxine und inflammatorischen Zytokine auf das Myokard (Balija and Lowry, 2011; Kumar et al., 1996; Zhou et al., 2011). Kumar et al. haben gezeigt, dass erhöhte Zytokinlevel von TNF- α und IL-1 β , sowie der Komplementfaktor wie das C5a zur Reduktion der Verkürzungsgeschwindigkeit kardialer Myofibrillen führen können und so zur Verminderung der myokardialen Kontraktilität beitragen (Kumar et al., 1996). Der Organismus versucht als Gegenreaktion sich der überschießenden Inflammation zu widersetzen. Es resultiert eine Endotoxin-Toleranz, mit verminderter Reaktion auf Pathogene, aber bisher nicht verstandener Wirkungsweise (Beeson, 1947). Die Antiinflammation wird auch durch das IL-10 vermittelt. Es wird von Zellen des erworbenen und des angeborenen Systems freigesetzt und verhindert eine überschießende Inflammation (Iyer and Cheng, 2012; Saraiva and O'Garra, 2010).

Interessanterweise spielt der IL-10 nicht nur in der Peripherie des Organismus eine antiinflammatorische Rolle, sondern auch im Herzen selbst (Iyer and Cheng, 2012; Markowski et al., 2013a). Im reperfundierten Myokard kommt es unter anderem zur Infiltration mit CD5-positiven Lymphozyten und IL-10 Freisetzung. Dies aktiviert die TIMP1 (tissue inhibitor of metalloproteinases) Expression und moduliert die extrazelluläre Matrixbiosynthese (Frangogiannis et al., 2000). Weiterhin zeigt sich, dass IL-10 das kardiale Remodelling modifiziert und die Fibrosierung des Myokardes abschwächt, was die Pumpkraft des Herzens verbessert. Zusätzlich vermindert IL-10 die kapilläre Leckage und reduziert dadurch das unkontrollierte Einwandern von Immunzellen (Krishnamurthy et al., 2009a). Weiterhin wird IL-10 im Rahmen der ischämischen Präkonditionierung freigesetzt und trägt maßgeblich zur Kardioprotektion bei (Markowski et al., 2013a).

1.5 Epidemiologie und Pathophysiologie des Myokardinfarkts

Kardiovaskuläre Erkrankungen und insbesondere der Herzinfarkt spielen eine bedeutende Rolle in der modernen Medizin. Im Jahr 2011 verstarben in Deutschland insgesamt 852328 Personen. Dabei hatten etwa 40% der Verstorbenen eine kardiovaskuläre Erkrankung als Todesursache. Davon waren die ischämische Herzkrankheit mit 127101 Sterbefällen und der Herzinfarkt mit 55286 Toten die beiden häufigsten Ursachen für das Versterben der Patienten (Statistisches Bundesamt, 2011). Nach dem Überleben eines kardialen Ereignisses resultiert häufig eine Herzinsuffizienz, die die Lebensqualität der Patienten deutlich reduziert. Dabei bestimmt vor allem die Infarktgröße die Ausprägung der Herzinsuffizienz und damit die langfristige Prognose. Das Ziel jeder Herzinfarkttherapie sollte daher die Reduktion der Infarktgröße sein.

1.6 Pathologie des Ischämie-Reperfusionsschadens

Eine Myokardischämie kommt in der Regel durch eine kritische Verengung einer Koronararteriezustande. Der entscheidende Faktor zur Reduktion des ischämiebedingten Schadens ist die frühzeitige Wiederherstellung der koronaren Perfusion. Trotz Wiederherstellung der Blutversorgung wurde schon 1960 von Jennings et al. beobachtet, dass es zu weiterem Verlust der Herzmuskelzellen während der Reperfusionsphase kommt und dieser Prozeß wurde als der Reperfusionsschaden bezeichnet (Jennings et al., 1960). Die Gruppe führte histologische Untersuchungen an reperfundierten Kaninchenherzen durch und wiesen Zellschwellungen, Kontrakturen der Myofibrillen, Sarkolemmrupturen und Ansammlungen von Kalzium-Phosphat Partikeln nach. Die Folgen der Reperfusion waren Arrhythmien, myokardiale Dysfunktion und eingeschränkte Wiederherstellung der Blutzirkulation, das sogenannte no-reflow Phänomen (Yellon and Hausenloy, 2007). Weiterhin konnte in Tierstudien gezeigt werden, dass der Reperfusionsschaden selbst bis zu 50% der endgültigen Infarkt Narbe ausmacht (Hausenloy and Yellon, 2013).

Das Herz schöpft bei einer Ischämie schnell die Koronarreserve aus und passt sich initial autoregulatorisch dem verringerten arteriellen Sauerstoffpartialdruck an. Die gefäßverengende Wirkung des Sauerstoffs entfällt und es kommt reflektorisch zu einer Vasodilatation. Durch die Abbauprodukte von ATP kommt es zur Freisetzung des Stickstoffmonoxids (NO) aus dem Gefäßendothel und somit zu einer weiteren koronaren Vasodilatation über die Erhöhung der intrazellulären cGMP (Kim et al., 1997; Quyyumi et al., 1995; Schulz et al., 2004b). Weiterhin kommt es zur Vasodilatation der subendokardialen Gefäße über die katecholaminvermittelte Stimulation der β_2 -Adrenorezeptoren (Böcker et al., 2012).

Bei Sauerstoffmangel wird der Fluß der Reduktionsäquivalente durch die Atmungskette reduziert und die oxidative Phosphorylierung schon nach Sekunden unterbrochen. Der Gehalt an ATP und Kreatinphosphat sinkt (Jafri et al., 2001). Normalerweise wird die anaerobe Glykolyse durch die Produkte der Beta-Oxidation gehemmt. Fette werden bei Sauerstoffmangel jedoch weniger oxidiert und es kommt zur Aktivierung der anaeroben Glykolyse und somit zur intrazellulären Übersäuerung durch Laktat (Klinke et al., 2010). Zum Schluss wird auch die anaerobe

Glykolyse gehemmt und der Zusammenbruch der zellulären Integrität beginnt. Die energieverbrauchenden Kanäle können den Ionenaustausch nicht mehr aufrechterhalten. Es kommt zur Zellschwellung und Zerstörung des Sarkolemm mit nekrotischem Untergang der Zelle (Verma et al., 2002).

Durch den Anstieg der Protonenkonzentration wird der Na^+/H^+ -Antiporter aktiviert. Die intrazelluläre Natriumkonzentration steigt. Ebenso kommt es zur Erhöhung der Kalziumkonzentration über die Aktivierung des $2\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ -Austauschers. Eine Hyperkontraktur der Myofibrillen und die Öffnung der mitochondrialen Permeabilitäts-Transitions-Pore (mPTP) sind Resultate dieser Elektrolytverschiebung (Di Lisa und Bernardi, 2009; Yellon und Hausenloy, 2007).

Weiterhin kommt es zur Aktivierung kalziumabhängiger Proteasen, Nukleasen und Phospholipasen mit Zerstörung der Phospholipidmembranen und Apoptose der Zelle (Bartling et al., 1998; Jordan et al., 1999). Bei der Apoptose handelt es sich um einen kontrollierten, energieverbrauchenden Prozess. Dabei schrumpft die Zelle und zerfällt in kleine Partikel, die von phagozytären Zellen abgeräumt werden, ohne dabei eine überschießende Immunreaktion auszulösen.

Im Gegensatz dazu kommt es bei der Nekrose zu unkontrollierter Freisetzung von DAMPs nach extrazellulär mit einer Immunreaktion, Einwandern von Fibroblasten und Initiierung des Remodellings besonders im Zentrum der Infarktnarbe (Bartling et al., 1998; Eeffing et al., 2004; Jennings et al., 1960; Krijnen et al., 2002; McCully et al., 2004; Medzhitov, 2001). Der überwiegende Teil der Myozyten wird nekrotisch und ein kleinerer Teil geht durch koordinierte Apoptose zugrunde (Frangogiannis, 2012).

Ein weiterer Effekt der Ischämie ist die Freisetzung reaktiver Sauerstoffradikale (reactive oxygen species (ROS)). ROS sind freie Radikale mit ungepaarten Elektronen. Sie sind extrem reaktionsfreudig und entstehen vor allem während der Immunantwort in den neutrophilen Granulozyten und den Gefäßendothelzellen, oder in der Atmungskette des Mitochondriums (Penna et al., 2012; Turrens, 2003; Vinten-Johansen, 2004). Ein entscheidender Grund hierfür ist die Funktionsstörung der Enzyme wie der Xanthinoxidase, der phagozytären NADPH-Oxidase, der mitochondrialen Cytochromoxidase und der Monoaminoxidasen. Hearse et al. zeigten schon 1973, dass die Reoxygenierung der isolierten Rattenherzen mit massiver Freisetzung kardialer Enzyme und Zelltod einherging. Dieses Phänomen bezeichnete er als das "Sauerstoffparadoxon" (Hearse et al., 1973). Die Freisetzung

der Sauerstoffradikale ist in den ersten Sekunden der Reperfusion am stärksten ausgeprägt (Hearse et al., 1973; Zweier, 1988). Dies führt zur weiteren Schädigung der während der Ischämie vorgeschädigten Zellen.

Diese Prozesse sorgen u.a. für eine Freisetzung proinflammatorischer Faktoren durch die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B (Gordon et al., 2011). Es werden Zytokine wie TNF- α , IL-1, IL-6 und IL-8 mit chemotaktischen und proinflammatorischen Eigenschaften freigesetzt und die Inflammation weiter verstärkt (Frangogiannis et al., 1998a; Hiscott et al., 1993; Libermann und Baltimore, 1990). Interleukin 1 verstärkt beispielsweise die Chemokinproduktion im infarzierten Myokard und lockt weitere Leukozyten ins Gewebe (Bujak et al., 2008).

Zusätzlich werden Immunzellen durch Komplementfaktoren angelockt, die von geschädigten Endothelzellen, Myozyten und eingewanderten Mastzellen freigesetzt werden (Crawford et al., 1988; Hill und Ward, 1969). Durch die Aktivierung der Immunzellen kommt es zur Adhäsion der neutrophilen Granulozyten an das Endothel der Koronarien, assoziiert mit progressiver Endotheldysfunktion (Bienvenu und Granger, 1993). Diese Endotheldysfunktion führt zur Vasokonstriktion und verminderter Relaxationsfähigkeit der glatten Gefäßmuskulatur (Ma et al., 1991), die noch zusätzlich durch NO-Mangel während der Reperfusion verstärkt wird. Neben der Endotheldysfunktion kommt es zu Mikroembolisationen kleiner Gefäße und Verklumpung der Granulozyten mit dem Ergebnis des no-reflow Phänomens (Engler et al., 1983). Zhao et al. (2000a) zeigten, dass die Granulozyten in den ersten 6 Stunden intravaskulär verbleiben und anschließend in das Parenchym migrieren (Zhao et al., 2000a). Die Granulozyten setzen Proteasen frei und führen zur Nekrose der Myozyten (Schmid-Schönbein, 1993). Weiterhin werden Thrombozyten aktiviert und ihre Aggregation begünstigt, was zur Aggravation der Ischämie führt.

1.7 Rolle der mitochondrialen Permeabilitäts-Transitions-Pore

Haworth und Hunter fanden 1978 während ihrer Versuche an Rindermitochondrien einen Kanal der inneren Mitochondrienmembran, dessen Öffnung durch hohe Kalziumkonzentrationen ausgelöst werden kann (Haworth and Hunter, 1979). Die mitochondriale Permeabilitäts-Transitions-Pore (mPTP) ist ein unspezifischer Megakanal zwischen der mitochondrialen äußeren und der inneren Membran, die für Teilchen bis zu 1,5 kDa durchlässig ist. Die Pore ist spannungsabhängig, Kalzium- und pH-sensitiv (Di Lisa and Bernardi, 2009; Halestrap, 2009). Die Zusammensetzung dieses Kanals ist immer noch nicht abschließend verstanden. Zum Aufbau gehört ein Porin VDAC (voltage-dependent anion channel) der Außenmembran, das Matrixprotein Cyclophilin D und ein Transporter ANT (adenin nucleotid translocator) der inneren Mitochondrienmembran.

Die mPTP ist während der Ischämie verschlossen. Dabei wird die Bindung des Kalziums an Cyclophilin D durch die Azidose blockiert, und die Formation der Pore dadurch verhindert (Cohen and Downey, 2014). Die intrazelluläre Azidose während der Ischämie wird durch die Reperfusion schlagartig aufgehoben. Die Öffnung der mPTP wird durch die Wiederherstellung des physiologischen pHs initiiert, weil der inhibitorische Effekt der Azidose auf die Pore aufgehoben wird. Ebenfalls führen Kalziumüberladung und Produktion von ROS zur mPTP-Öffnung. Dies führt zur Entkopplung des oxidativen Stoffwechsels, ATP-Ausschöpfung und weiterer ROS-Produktion (Kroemer et al., 2007). Als Folge kommt es zum Influx von Wasser und zur Ruptur des Mitochondriums mit Freisetzung von proapoptotischen Proteinen aus dem intermembranären Raum. Bei ausreichenden ATP-Reserven wird die Apoptose eingeleitet. Steht kein ATP mehr zur Verfügung, zerfällt die Zelle unkontrolliert und wird nekrotisch (Baines, 2010).

1.8 Kardiales Remodelling

Ein Myokardinfarkt führt zur Migration von Makrophagen, Monozyten und neutrophilen Granulozyten in das Ischämiegebiet. Kommt es aufgrund der Ischämie zum Untergang des Herzgewebes, führt das zum Umbau und zur Reparatur der Infarktnarbe, dem kardialen Remodelling. Dabei handelt es sich um einen Prozess, der zu Änderungen der Größe, Form und Funktion des Herzens führt (Cohn et al., 2000). Die erste Phase ist durch die Expansion der Infarktnarbe gekennzeichnet. Dabei kommt es zur Auflösung des kollagenen Stützgerüsts zwischen den Myozyten durch freigesetzte Serin-Proteasen und Aktivierung von Matrix-metalloproteasen (MMP) durch neutrophile Granulozyten (Cleutjens et al., 1995). Die resultierende Dilatation des Ventrikels wird von Mechanorezeptoren erkannt, worauf Hypertrophieprozesse im Myokard durch veränderte Genexpression initialisiert werden (Sadoshima et al., 1992; van Wamel et al., 2000). Weiterhin werden vermehrt Katecholamine vom sympathoadrenergen System ausgeschüttet, was zur Hyperkinesie des nicht infarzierten Myokardgewebes führt und vorübergehend die abnehmende Herzleistung kompensiert (Sutton and Sharpe, 2000a).

In der späten Phase kommt es zur langfristigen Adaptation des Myokardgewebes an die gestiegene Wandspannung. Die Zunahme der Wandspannung und die daraus resultierenden Hypertrophieprozesse führen zur Ausschüttung von Angiotensin II (Ang II), Endothelin und Sympathomimetika mit Aktivierung zahlreicher Proteinkinasekaskaden (Eguchi et al., 1993; LaMorte et al., 1994; Sadoshima et al., 1995; Yamazaki et al., 1995). Dies bewirkt die Produktion zahlreicher Wachstumsfaktoren (fibroblast growth factor, epidermal growth factor, platelet-derived growth factor, insulin und insulin-like growth factor) und Kinasen (p21 ras, MAP-Kinase) (Sutton und Sharpe, 2000b). Die Aktivierung der MAP-Kinase-Signalwege bewirkt eine Stimulation der Hypertrophieprozesse im Myokard (Glennon et al., 1996; Wang, 2007). Die geschädigten Myozyten setzen Zytokine wie den TGF- β 1 frei und stimulieren dadurch die Chemotaxis von Makrophagen und Fibroblasten (Desmoulière et al., 1993). Die aktivierten Makrophagen sezernieren das Angiotensin Converting Enzyme (ACE) und erhöhen damit den Gehalt an Ang II im Ischämiegebiet, das für die Regulation der reparativen Fibrose benötigt wird (Desmoulière et al., 1993). Weiterhin wird durch TGF- β 1 die Transformation der Fibroblasten in Myofibroblasten begünstigt. Die Myofibroblasten wiederum

exprimieren Rezeptoren für Ang II und TGF- β 1 und bilden Kollagenvorstufen, die für die Ausbildung der Infarkt Narbe benötigt werden. Die Kollagensynthese wird wiederum durch Wachstumsfaktoren moduliert, die durch erhöhte Wandspannung freigesetzt wurden. Parallel zur Kollagensynthese wird eine Fibronektinmatrix ausgebildet, an der sich Myofibroblasten befestigen und zur Ausbildung des Narbengewebes beitragen (Knowlton et al., 1992). Wird die Formation der Myokardnarbe abgeschlossen, so wird die Kollagensynthese gestoppt und die Myofibroblasten werden apoptotisch. Die Heilungsprozesse sind nach 2-6 Monaten beim Menschen abgeschlossen. Bei Hunden sind es 6-8, bei Ratten 3-6 und bei Mäusen sind es 2-4 Wochen (Takemura et al., 2009).

1.9 Myokardiale Postkonditionierung

Die Reperfusion bleibt die wirksamste Behandlungsform des ischämischen Myokardinfarkts und des myokardialen Remodellings. Der Reperfusionsschaden schmälert jedoch den Erfolg der Reperfusion und es wurden zahlreiche Strategien definiert, um diesen Schaden zu mindern. Initial wurden v.a. in der Kardiochirurgie die Bedingungen der Reperfusion angepasst. Dazu wurde das Reperfusat in seiner Beschaffenheit (pH, Temperatur, Osmolalität etc.) verändert oder die Dauer der Reperfusion reduziert bzw. ausgedehnt (Okamoto et al., 1986; Sato et al., 1997). Diese Experimente und die bahnbrechende Arbeit von Murry et al., in der die Forschergruppe die kardioprotektive Wirksamkeit der ischämischen Präkonditionierung belegt haben (Murry et al., 1986), motivierten Zhi-Quing Zhao den konditionierenden Stimulus an den Anfang der Reperfusion zu verlegen. Es gelang ihm in einem Hundemodell zu zeigen, dass repetitive I/R-Zyklen während der frühen Reperfusionsphase die Infarktgröße ebenfalls schmälern können und den Reperfusionsschaden reduzieren (Zhao und Vinten-Johansen, 2006; Zhao et al., 2003a). Dieses Phänomen wurde ischämische Postkonditionierung (IPC) genannt und die Wirksamkeit dieser Methode konnte von Staat et al. in einer klinischen Studie an Patienten reproduziert werden (Staat et al., 2005). Die Postkonditionierung wurde in zahlreichen weiteren Spezies bestätigt (Schwartz und Lagranha, 2006a). Der Effekt der Postkonditionierung ist von der Dauer der Indexischämie und dem verwendeten Postkonditionierungsprotokoll abhängig (Iliodromitis et al., 2006;

Manintveld et al., 2007c) und ist besonders in den ersten Minuten der Reperfusion wirksam (Kin et al., 2004; Yang et al., 2004). Bei kleineren Versuchstieren wie Ratten, oder Mäusen scheinen kürzere Zyklen (10-15 Sekunden) der I/R kardioprotektiver zu sein. Bei größeren Spezies sind längere Zyklen zur effektiven Postkonditionierung notwendig (30 Sekunden bei Hunden und Kaninchen) und (60-90 Sekunden beim Menschen) (Laskey, 2005; Staat et al., 2005; Vinten-Johansen et al., 2005a). Zusätzlich sind 3 Faktoren für den Erfolg des Postkonditionierungsalgorithmus wichtig. Die Zeit bis zur ersten Re-Okklusion, die Anzahl der Re-Okklusionen und die Dauer der dazwischen liegenden Reperfusion (Ovize et al., 2010). Es existiert bislang jedoch kein ideales Postkonditionierungsprotokoll. Die Studien zu der Ischämischen Postkonditionierung an Menschen haben bislang keinen eindeutigen Erfolg gezeigt. Zum einen ist die Translation der Tierexperimente an jungen und gesunden Versuchstieren in die Klinik schwierig, da meist Patienten mit multiplen Vorerkrankungen an Herz und Gefäßen therapiert werden müssen. Zum anderen ist bislang das passende Patientenkollektiv noch nicht identifiziert worden, das besonders von der IPC profitieren kann, da die Ischämiezeit im klinischen Alltag beträchtlich variiert und retrospektiv oft schwer einzuschätzen ist (Miura and Miki, 2008; Staat et al., 2005). Weiterhin ist die Zeit, die für die Thrombusaspiration mittels Herzkatheter benötigt wird, immer noch sehr lang und von Patient zu Patient unterschiedlich. Optimal wäre eine sofortige Postkonditionierung nach der Thrombusaspiration. Für die Thrombektomie selbst werden mehrere Minuten benötigt, die das kardioprotektive Potential schwächen können, wie eine Metaanalyse von Favaretto et al. kürzlich gezeigt hat (Favaretto et al., 2014). Im klinischen Alltag liegen häufig mehrere Stunden zwischen dem Symptombeginn und der Reperfusion, wobei das optimale Zeitfenster für die Reperfusion zwischen 30 und 60 min. liegt. Weiterhin kommt es trotz der Wiederherstellung der koronaren Zirkulation in bis zu 50% der Patienten zu keiner ausreichenden Reperfusion. Dieses Phänomen des *no-reflow* wird durch distale Mikroembolisationen und verminderte Mikrozirkulation im Ischämiegebiet hervorgerufen (Guo et al., 2013).

Eine weitere Möglichkeit der Postkonditionierung ist die Verwendung verschiedener pharmakologischer Substanzen. Dazu zählen u.a. Adenosin, Erythropoetin, Opiate,

Insulin, Statine und volatile Anästhetika (Feng et al., 2005; Obal et al., 2005). Die zugrundeliegenden Mechanismen sind zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht endgültig geklärt, ähneln aber denen der ischämischen Präkonditionierung (Zhao et al., 2003b). Kerendi et al. zeigte, dass Okklusions- und Reperfusionenzyklen an der Renalarterie ebenfalls eine reduzierte Herzinfarktgröße bewirken (Kerendi et al., 2005). Dieses Phänomen wird als ischämische Fern-Präkonditionierung (*remote IPC*) bezeichnet und die Kardioprotektion konnte in weiteren Experimenten an anderen Organen reproduziert werden (Gritsopoulos et al., 2009; C.-M. Li et al., 2006). Eine aktuelle Studie von Meybohm et al. konnte jedoch keinen Benefit durch die Fern-Präkonditionierung bei Patienten zeigen, die sich einer Herzoperation unterzogen haben (Meybohm et al., 2015).

Die Kardioprotektion durch die Postkonditionierung wird über multiple Wege vermittelt. Initial wird über die stufenweise Wiederherstellung der koronaren Blutzirkulation ein passiver Weg eingeschlagen (Tsang et al., 2004) und die während der Ischämie herrschende Azidose verzögert aufgehoben. Die Formation der mPTP, die im sauren Milieu inhibiert ist, bleibt aus (Cohen et al., 2007). Des Weiteren wird über die Verzögerung der Reperfusion die Produktion der ROS vermindert und die überschießende Kalziumfreisetzung verhindert (Tsang et al., 2004). Verminderte ROS- und Kalziumkonzentration sorgen ebenfalls für den anhaltenden Verschluss der mPTP (Di Lisa and Bernardi, 2009; Kalogeris et al., 2014). Kin et al. zeigten, dass die Postkonditionierung das Auswaschen von endogenem Adenosin verhindert wird, wodurch ebenfalls eine Kardioprotektion vermittelt werden kann (Kin et al., 2005).

Durch die Postkonditionierung kann die endotheliale Dysfunktion reduziert werden. Dadurch reagieren kleine Gefäße stärker auf den vasodilatatorischen Reiz von Acetylcholin und es werden weniger Leukozyten an der Endotheloberfläche aktiviert (Zhao et al., 2003a). Dies führt dazu, dass die Endstrombahn weniger durch aggregierte Leukozyten verlegt wird und die Migration von Immunzellen ins Gewebe abnimmt. Ein weiterer positiver Effekt ist die geringere Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine wie TNF- α und IL-6 (Hennein et al., 1994; Manukyan et al., 2011; Sun et al., 2006) und vermehrte Produktion von antiinflammatorischen Zytokinen wie dem IL-10 (Y.-H. Kim et al., 2014; Krishnamurthy et al., 2009a; Leng et al., 2011; Yang et al., 2000).

1.10 Signaltransduktion der Postkonditionierung

1.10.1 RISK-Signalweg

Die Postkonditionierung schließt zahlreiche Prozesse ein. Yellon et al. zeigten, dass in den ersten Minuten der Reperfusion Signalkaskaden aktiviert werden, die Moleküle wie die Phosphoinositol-3-Kinase (PI3K), Proteinkinase B (Akt) und extracellular signal regulated kinase (ERK 1/2) involvieren und antiapoptotische Vorgänge auslösen (Hausenloy and Yellon, 2004). Diese Kinasen sind an dem „reperfusion injury signaling kinase“-Signalweg (RISK-Signalweg) maßgeblich beteiligt und werden sowohl während der Präkonditionierung als auch während der Postkonditionierung stimuliert (Hausenloy et al., 2005). Durch die Postkonditionierung werden G-Protein-gekoppelte Rezeptoren stimuliert und es wird die PI3K phosphoryliert und aktiviert (Cross et al., 2000). Es existieren zahlreiche Phosphoinositol-3-Kinase Formen in eukaryoten Zellen. Jedoch sind die Vertreter der Ia-Gruppe dieser Enzyme besonders interessant. Die Aktivierung von PI3K wird über den direkten Kontakt der katalytischen Untereinheit p110 mit Wachstumshormonen oder Adapterproteinen vermittelt. Weiterhin kann eine Verbindung von p110 mit dem aktivierten RAS-Protein ebenfalls die PI3K stimulieren. Dies führt zur Konvertierung von Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (PI(4,5)P₂) zu Phosphatidylinositol-3,4,5-Trisphosphat (PI(3,4,5)P₃). Besonders interessant sind die Serin-Threonin-Kinasen Akt (auch Proteinkinase B) und die Phosphoinositid-abhängige Kinase 1 (PDK1). Die Phosphorylierung der PI3K bringt diese beiden Proteine in Nachbarschaft, was wiederum der PDK1 ermöglicht, die Akt zu phosphorylieren. Die Aktivierung der Akt löst zahlreiche Reaktionen aus, wie das Zellwachstum, den Eintritt in den Zellzyklus und das Überleben der Zelle. Dabei erfolgt auf molekularer Ebene meistens eine Inhibition der von Akt beeinflussten Zielproteine (Cantley, 2002). Die Aktivierung der Akt führt zur Phosphorylierung und Inhibition der Glykogensynthasekinase-3-beta (GSK3 β). Die Inhibition der GSK3 β sorgt für den bleibenden Verschluss der mPTP und verhindert dadurch die Schwellung des Mitochondriums mit konsekutivem Zelluntergang (Gomez et al., 2008; Murphy, 2004; Tong et al., 2002). Weiterhin kommt es zur Inhibition des Tumorsuppressorproteins p53, der proapoptotische Wirkung hat, indem es Bax (Bcl-2 Familie) aktiviert. Dabei kann das Bax-Protein aufgrund seiner veränderten Struktur nicht in die Mitochondrien übertreten, wodurch

der Austritt von Cytochrom c durch geöffnete Poren in der äußeren Mitochondrienmembran verhindert wird (H. Yamaguchi, 2001; Tsuruta et al., 2002). Konsekutiv wird kein proapoptotischer Komplex wie das Apoptosom (APAF-1, Caspase-9) gebildet und die Apoptose findet nicht statt. Zusätzlich bleibt Cytochrom c im intermembranären Raum des Mitochondriums und das Membranpotential wird stabilisiert. Auf der anderen Seite vermag die Aktivierung von Akt die Induktion von zellprotektiven Transkriptionsfaktoren „cAMP responsive element binding protein“ (CREB) und NF- κ B anzuregen. Hierbei phosphoryliert und aktiviert Akt das Protein IKK- α , was zur Translokation von NF- κ B in den Nukleus führt. Dort wird eine Vielzahl an zellprotektiven Signalwegen in Gang gesetzt (Nidai Ozes et al., 1999).

Ein alternativer Weg im RISK Signalweg ist die MEK1/2-ERK1/2-Kinase Kaskade. Hierbei wird die GSK-3 β ebenfalls durch die Phosphorylierung inaktiviert und der Verschluss der mPTP aufrechterhalten (Abb. 2) (Hausenloy et al., 2004).

1.10.2 SAFE-Signalweg

Ein weiterer postulierter Mechanismus der Postkonditionierung ist die Aktivierung der JAK-STAT Signalkaskade in dem SAFE-Signalweg (survivor activating factor enhancement) durch TNF- α (Lacerda et al., 2009; Lecour, 2009). Obwohl TNF- α eindeutig zur kardialen Dysfunktion und Apoptose beiträgt, scheint es in geringen Konzentrationen kardioprotektiv zu sein (Belosjorow et al., 1999; Lecour et al., 2005a, 2002). Es entfaltet sich Rezeptor-spezifisch eine differenzierte Wirkung von TNF- α . Die Aktivierung des TNFR1 vermittelt negative Eigenschaften von TNF- α wie die endotheliale und kontraktile Dysfunktion, die zum Pumpversagen des Herzens führen kann (Schulz et al., 2004a). Nach 60 – 90 min der Reperfusion wird die TNF- α Synthese sogar in den Kardiomyozyten und Fibroblasten initiiert, was die Situation verschlimmern kann (Schulz, 2008). Der TNF Rezeptor 2 (TNFR2) scheint jedoch mit Hilfe von JAK-Kinasen eine Kardioprotektion zu vermitteln (Lacerda et al., 2009; Schulz and Heusch, 2009). JAKs sind Vertreter der Familie der Tyrosinkinasen, die sich an Rezeptoren befinden, welche mit Zytokinen (z.B. IL-6), Wachstumsfaktoren und TNF- α kommunizieren. Nach der Ligandenbindung phosphorylieren JAK-Tyrosinkinasen STAT-Proteine, die entweder in den Nukleus translozieren und auf die Genexpression Einfluß nehmen, oder ins Mitochondrium gelangen und dort den

Elektronentransport regulieren (Lacerda et al., 2009; Levy and Lee, 2002; Wegrzyn et al., 2009). Weiterhin bewirkt STAT-3 die Phosphorylierung der GSK3 β als Effektor des RISK-Signalwegs mit konsekutivem Verschluss der mPTP (Abb. 2) (Lacerda et al., 2009).

ISCHÄMISCHE POSTKONDITIONIERUNG

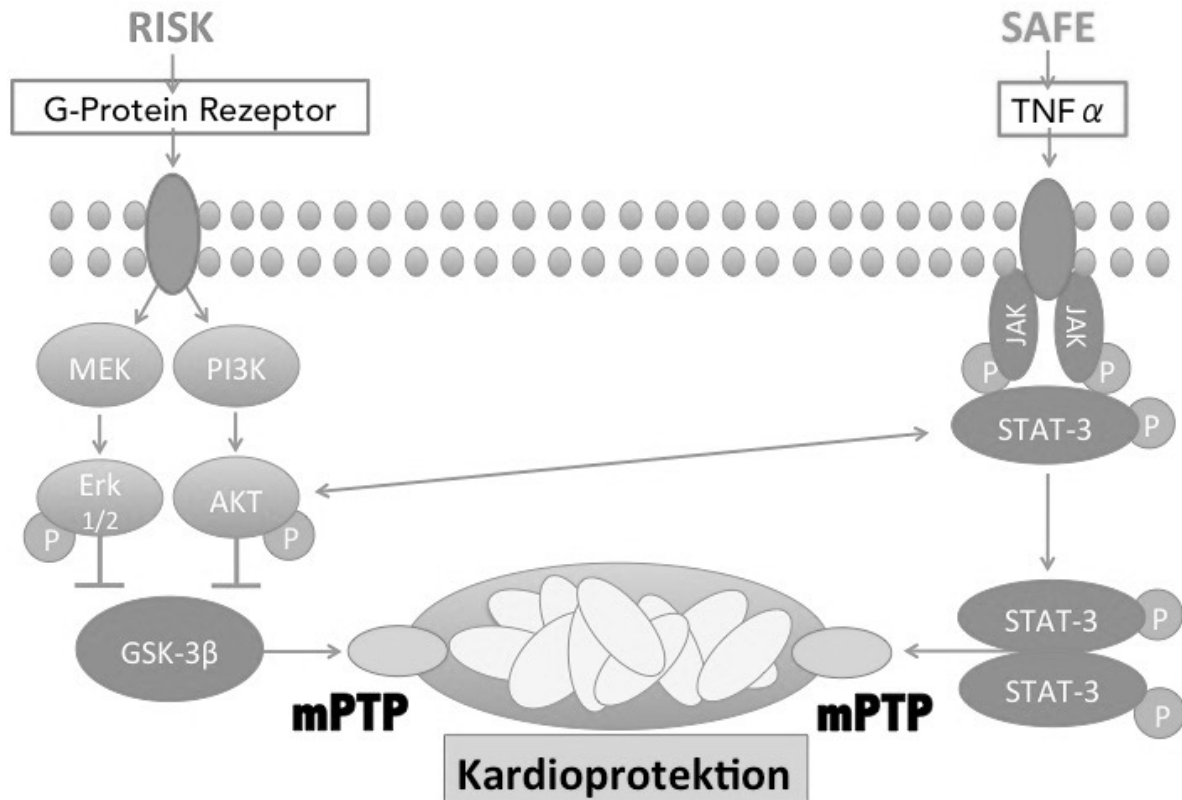


Abb. 2: Dargestellt ist eine Übersicht über die RISK- und SAFE-Signalwege. Trotz unterschiedlicher Signalkaskaden sorgen beide Signalwege für den Verschluss der mPTP. Weiterhin bewirken STAT-3 die Phosphorylierung der GSK3 β und kommunizieren so mit dem RISK Signalweg. Modifiziert nach Lacerda et al., 2009.

1.10.3 Postkonditionierung mit CpG-Oligonukleotiden

Das angeborene Immunsystem und die Familie der Toll-like Rezeptoren spielen eine entscheidende Rolle bei der Entstehung des I/R-Schadens. Es ist bekannt, dass die Stimulation von TLR2 (Boehm et al., 2013; Ha et al., 2010) und TLR4 (Kim et al., 2007; Shimamoto et al., 2006) den I/R-Schaden reduzieren können. In den letzten Jahren rückt der TLR9 zunehmend in den Fokus der Forschung. Der Rezeptor erkennt bakterielle und virale DNA (Bauer et al., 2001; Hemmi et al., 2000b) und scheint im Rahmen der Präkonditionierung durch eine Immunmodulation einen kardioprotektiven Effekt auszuüben (Markowski et al., 2013b; Mathur et al., 2011a). Synthetisch hergestellte Oligonukleotide (CpG-ODN) werden ebenfalls vom TLR9 erkannt und bewirken eine Stimulation des angeborenen Immunsystems (Bauer et al., 2001; Hemmi et al., 2000b). Diese CpG-ODN beinhalten unmethylierte CpG Motive und ahmen den immunstimulatorischen Effekt bakterieller DNA nach. Es existieren mindestens 2 Typen von CpG-ODN. Der B/K Typ ist der klassische Typ der CpG-DNA und wurde zuerst identifiziert. Er führt zu einer robusten Freisetzung von IL-12 und TNF- α . Der A/D Typ CpG-ODN unterscheidet sich strukturell von konventioneller CpG und bewirkt eine robuste IFN- α Produktion (Klinman et al., 2008). TLR9 vermag beide Formen der CpG zu erkennen. Interessant ist, dass TLR9 nicht nur von Immunzellen exprimiert wird, sondern auch auf den Kardiomyozyten vorkommt und dadurch eine Präkonditionierung möglich ist (Boehm et al., 2013; Boyd et al., 2006; Knuefermann et al., 2008; Markowski et al., 2013a). Der positive Effekt synthetischer Oligonukleotide wurde in Tierstudien und im klinischen Rahmen als Impfstoffadjuvans, Antirheumatikum und Antiallergikum bestätigt (Klinman et al., 2008). Aus diesem Grund könnte die Postkonditionierung mit TLR9 Liganden eine vielversprechende therapeutische Option im Kampf gegen den Reperfusionsschaden darstellen.

Vor allem Patienten mit einem Myokardinfarkt, die eine Katheterintervention erhalten, würden von CpG-ODN profitieren. Dabei kann die Postkonditionierung im Vergleich zu der Präkonditionierung leichter im klinischen Alltag umgesetzt werden.

1.11 Fragestellung

Folgende Fragestellungen bildeten die Grundlage dieser Arbeit:

1. Hat der TLR9-Ligand CpG-ODN einen postkonditionierenden Effekt auf die Infarktgröße und die Immunmediatoren im Rahmen der I/R in einem murinen „closed chest“ Modell?
2. Welche Bedeutung haben die freigesetzten Immunmediatoren während der frühen Reperfusion?

2. Material und Methoden

2.1 Versuchstiere und Haltungsbedingungen

Für die Experimente wurden 12 - 13 Wochen alte, männliche C57BL/6 Mäuse (WT, Sulzfeld) verwendet. Die Tiere wurden vom Züchter Charles River geliefert und im Tierhaus des Universitätsklinikums, Haus für Experimentelle Therapie (HET) Sigmund-Freud-Str. 25, 53105 Bonn untergebracht. Die Haltung und Pflege der Tiere erfolgten artgerecht und unter Beachtung gesundheitlicher Kriterien. Gruppen von höchstens 5 Tieren wurden in durchsichtigen, belüfteten Filtertop-Käfigen der Blue Line Linie (Firma Tecniplast Deutschland GmbH, Hohenpeissberg) gehalten. Die Beleuchtung betrug 200 Lux auf 1 Meter Höhe mit Hell/Dunkelphase von 7:00 -19:00 Uhr (Hell) und 19:00 - 07:00 Uhr (Dunkel). Die relative Luftfeuchtigkeit lag bei ~50% (30 bis 70%). Die Luftwechselrate betrug 16 pro Stunde. Die Raumtemperatur wurde bei 22°C (+/- 2°C) gehalten. Ernährt wurden die Tiere mit ssniff-Futter (ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland) und Wasser ad libitum. Als Einstreu wurde Altromin-Tiereinstreu-Granulat verwendet. Futter, Wasser und Einstreu wurden vor Nutzung autoklaviert. Mit vier Wochen wurden die Tiere von ihren Eltern getrennt und nach Geschlecht aufgeteilt. Gruppen von fünf männlichen Tieren pro Käfig wurden gebildet und unter beschriebenen Bedingungen gehalten.

Die Tierversuche dieser Arbeit wurden vom Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein Westfalen unter dem Aktenzeichen 8.87-50.10.35.08.317 genehmigt und unter Beachtung der Tierschutzbestimmungen (NIH, Publikation Nummer 85-23, überarbeitet 1996) durchgeführt.

2.2 In-vivo-Eingriffe

2.2.1 „Closed chest“ Modell

In dieser Arbeit verwendeten wir ein modifiziertes murines „closed chest“ Modell, bei dem ein interkostaler Zugang für die Instrumentierung gewählt wurde. Der Verzicht auf den parasternalen Zugang machte unser Modell weniger invasiv. Jedem operativen Trauma folgt eine Immunreaktion, die von der Invasivität der Operation abhängt (Michael et al., 1985). Die Immunreaktion beeinflusst Mechanismen, die während der I/R eine Rolle spielen. Durch die Inflammation werden Zytokine freigesetzt und Liganden mobilisiert, die die Infarktgröße beeinflussen können (Nossuli et al., 2000). Im Vergleich zu dem „open-chest“ Modell wurde das operative Trauma der Instrumentierung zeitlich vom eigentlichen I/R Experiment getrennt und somit das Zytokin-„Hintergrundrauschen“, ausgelöst durch die erste Operation, minimiert. In der vorliegenden Arbeit war unser Ziel, die systemische und myokardiale Inflammation nach I/R unabhängig vom operativen Trauma zu analysieren. Das erste murine „closed chest“ Modell wurde von Nossuli et al. etabliert. Bei diesem Modell wurde mittels einer parasternalen Thorakotomie und Durchtrennung von mindestens zwei Rippen ein operativer Zugang zum Herzen geschaffen und ein Kunststoffokkluder oberhalb der LAD angelegt (Nossuli et al., 2000). Um die Invasivität der Methode weiter zu reduzieren, wurde in dieser Arbeit ein modifiziertes „closed chest“ Modell verwendet das im Kapitel 2.2.3 ausführlich dargestellt wird. Zusammenfassend wurden für die Instrumentierung keine knöchernen Strukturen durchtrennt (Kim et al., 2012). Hierfür reichte ein Zugang im linken 4. Interkostalraum aus. Dieser wurde mit Retraktoren offengehalten und konnte nach der Okkluderplatzierung mit 2 Nähten leicht verschlossen werden. Nach der Instrumentierung wurden die Versuchstiere extubiert und hatten 5 Tage Zeit sich von der Initialoperation zu erholen, bevor die I/R-Versuche durchgeführt wurden.

2.2.2 Versuchsprotokoll

Die Versuchstiere wurden in 5 verschiedene Gruppen zu 5-10 Tieren eingeteilt. Die Gruppen erhielten am Ende der Ischämie unterschiedliche Interventionen, wobei der Untersucher für die zu applizierende Substanz verblindet wurde. Hierzu wurden die Substanzen von einem anderen Labormitarbeitervorbereitet und entsprechend kodiert. Die CpG-Gruppe erhielt $0,2 \mu\text{mol/kg}$ KG CpG-ODN (1668 Thioat), die PBS-Gruppe erhielt intraperitoneal $250 \mu\text{l}$ PBS (Phosphatpufferlösung). Die dritte Gruppe wurde nach Ablauf der Ischämie mit 3 Zyklen Reperfusion/Okklusion über jeweils 20 Sekunden ischämisch postkonditioniert (IPC). Die Sham-Gruppe wurde nur instrumentiert.

Im Anschluß an die 5-tägige Ruhephase nach der Instrumentierung wurde eine Ischämie von 30 min durchgeführt. Nach Ablauf der Ischämie wurden in der ersten Versuchsreihe nach 2 h Reperfusion die Herzen entnommen und für die TTC-Färbung (Triphenyltetrazoliumchlorid) oder mRNA-Analyse vorbereitet. Die TTC-Färbung demarkiert nekrotisches Gewebe und ermöglicht eine planimetrische Vermessung der Infarktgrößen. In der zweiten Versuchsreihe wurden in den CpG-, PBS- und IPC-Gruppen nach 24 h Reperfusion und 30 min Ischämie die Herzen für die TTC-Färbung entnommen (Abb. 3).

In einer dritten Versuchsreihe verlängerten wir die Ischämiedauer auf 60 min und entnahmen die Herzen nach 24 h Reperfusion (Abb. 4). Dabei wurden ebenfalls die Infarktgrößen bestimmt. Hierbei sollte untersucht werden, ob die Verlängerung der Indexischämiezeit den kardioprotektiven Effekt von CpG-ODN und IPC beeinflussen kann.

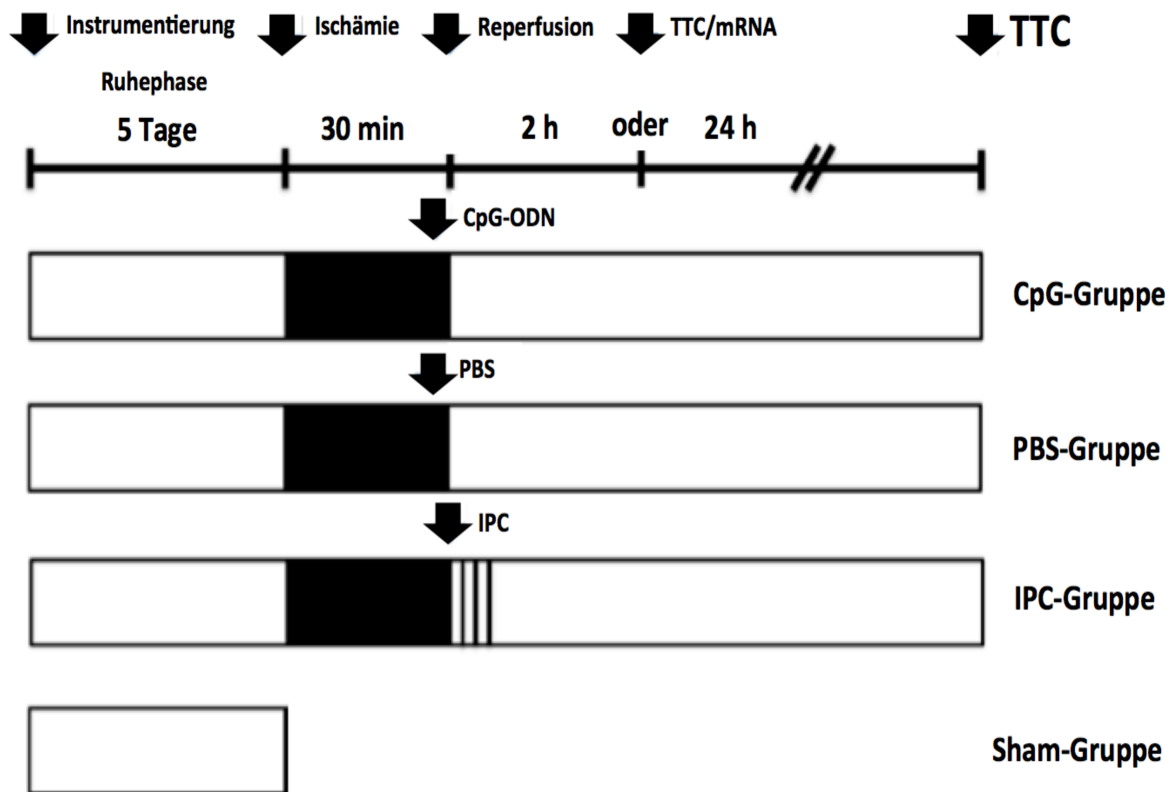


Abb. 3: Dargestellt ist der Versuchsablauf mit 30 min Ischämie und 2 und 24h Reperfusion. Nach erfolgreicher Ruhephase von 5 Tagen wurden die Versuchstiere in 4 Gruppen unterteilt. CpG-, PBS-, IPC-, und Sham-Gruppe. Nach 2 h Reperfusion wurden die Herzen für die TTC-Färbung und molekularbiologische Untersuchungen entnommen. In einem weiteren Versuchsarm wurde die TTC-Färbung nach 24 h durchgeführt. Die Sham-Gruppe wurde nur instrumentiert und molekularbiologisch untersucht.

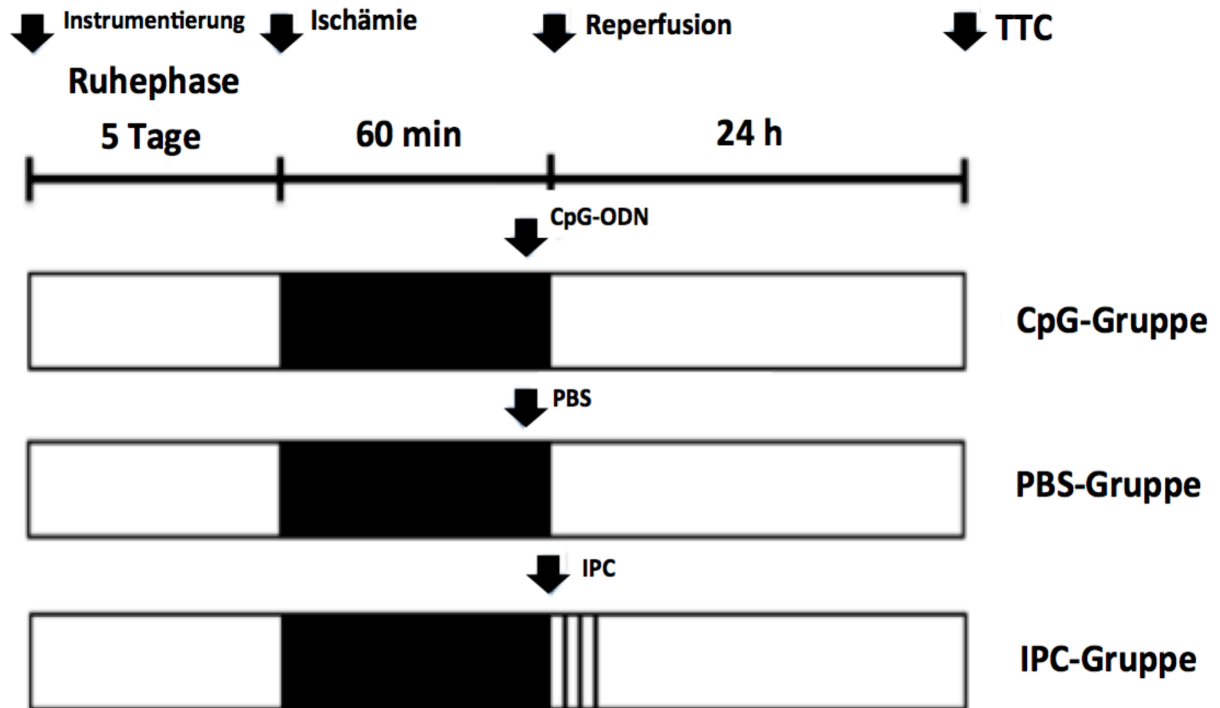


Abb. 4: Dargestellt ist der Versuchsablauf mit 60 min Ischämie und 24 h Reperfusion. Nach erfolgreicher Ruhephase von 5 Tagen wurden die Versuchstiere in 3 Gruppen unterteilt. Die CpG-, die PBS- und die IPC-Gruppe. Nach der Reperfusion wurde in allen 3 Gruppen die TTC-Färbung durchgeführt.

2.2.3 Instrumentierung

Im ersten Schritt des murinen „closed chest“ Modells erfolgte die Fadenanlage um die LAD. Wir verwendeten hierfür männliche, 12-13 Wochen alte C57BL/6N Wildtypmäuse.

Für die Operation wurde eine Inhalationsnarkose mit Isofluran durchgeführt. Der Sauerstofffluß betrug 0,5 Liter pro Minute bei am Vapor eingestellten 3,0 Volumen % Isofluran. Das Narkosegasgemisch wurde in einen Narkose-Einleitungsbehälter geleitet. Die Maus wurde zuvor in den Behälter platziert. Nach etwa 2 min wurde die spontanatmende Maus, die keine Abwehrreaktionen mehr zeigte in Rückenlage auf einem Wärmetisch fixiert. Das Narkosegasgemisch wurde dann über einen nasalen Konus von der Maus inhaliert, um die Narkose aufrechtzuerhalten. Die Extremitäten wurden mit Pflasterstreifen am Tisch fixiert. Eine rektale Temperatursonde wurde eingeführt. Die Temperatur des Tisches wurde konstant bei 37°C gehalten (Abb. 5).

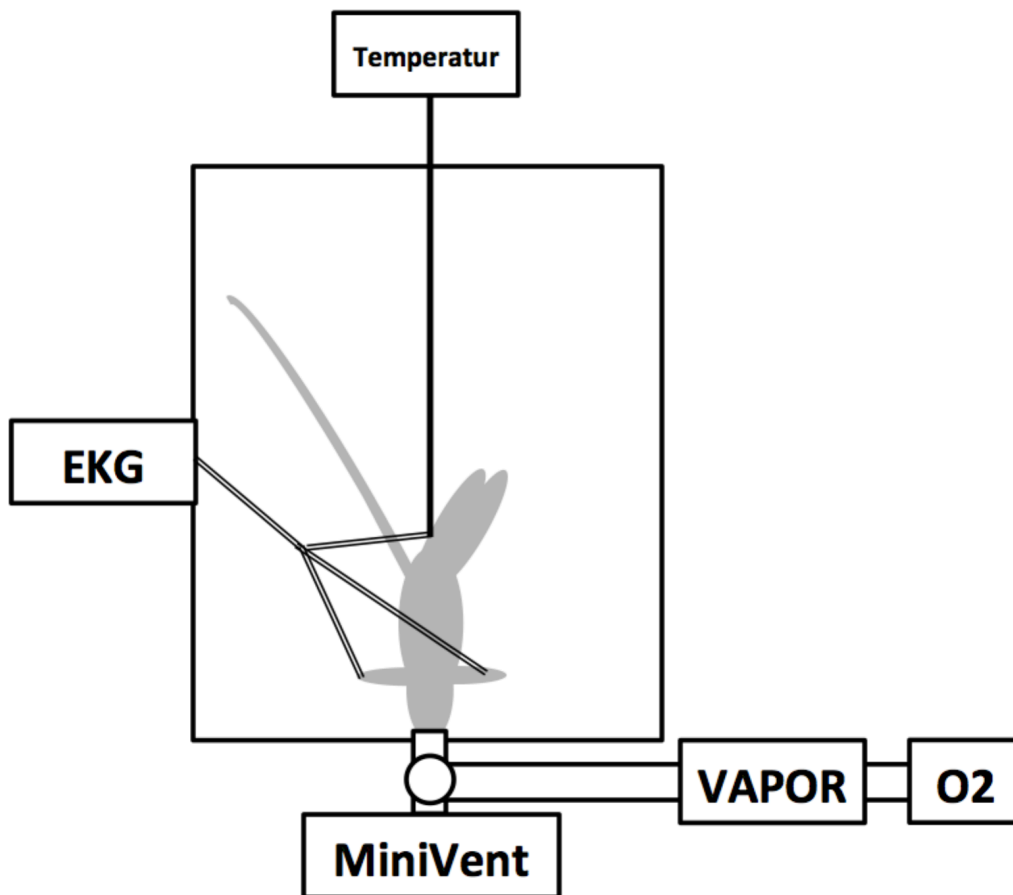


Abb.5: Skizze des Versuchsaufbaus vor Intubation. Das Versuchstier wurde in Rückenlage auf einem Wärmetisch mit rektaler Temperaturmessung und einem EKG fixiert. Die linke untere Extremität wurde über die rechte untere Extremität gekreuzt, damit sich der Interkostalraum besser aufspreizt. Die Narkoseaufrechterhaltung erfolgte zunächst nasal. Über ein Schlauchsystem konnte sowohl Sauerstoff oder das Narkosegasgemisch über den Vapor zugeführt werden. Der Minivent wurde erst nach Intubation zur maschinellen Beatmung der Maus genutzt.

Das OP-Gebiet wurde mit der „Pilca Enthaarungs-Creme extra mild“ (DMV Diedrichs Markenvertrieb GmbH & Co, Deutschland) enthaart und mit Povidon-Jod-Lösung desinfiziert. Anschließend wurde subkutan Buprenorphin 0,05 mg/kg Körpergewicht zur Analgesie verabreicht. Nach einem medianen Hautschnitt über dem Kehlkopf und der Trachea und vorsichtiger stumpfer Dissektion beider Speicheldrüsen wurde die prätracheale Muskulatur freigelegt. Die feine Faszie über den infrahyalen Muskeln wurde vorsichtig gespalten und auseinander präpariert. Mit Hilfe von zwei Knopfpinzetten wurden die infrahyalen Muskeln auseinandergezogen und die Trachea dargestellt. Es erfolgte die orale Intubation. Der 22 G Metalltubus wurde oral

eingeführt, wobei der Schildknorpel mit einer Knopfpinzette fixiert wurde. Der Tubus wurde unter Sicht in der Trachea platziert. Der Beatmungsapparat (Minivent, Hugo Sachs Elektronik, Harvard Apparatus) wurde auf 105 Atemzüge pro Minute und einem Tidalvolumen von 200 µl pro Atemzug eingestellt. Die Narkosegaszufuhr wurde weiter auf 2,0 Volumen % Isofluran reduziert. Es folgte dann die Präparation des interkostalen Zuganges. Die nachfolgenden Operationsschritte fanden unter sterilen Kautelen mit sterilisierten Instrumenten, Naht- und OP-Material statt. Durch einen 5 mm langen Hautlängsschnitt in der linken Medioclavicularlinie wurde der M. pectoralis freigelegt. Die Mm. pectoralis major und minor wurden schonend mobilisiert bis die Thoraxwand und die Interkostalmuskeln sichtbar wurden. Der 4. Interkostalraum wurde mit einer Knopfpinzette stumpf penetriert (Abb. 6 A). Der Interkostalraum wurde durch zwei Retraktoren mit konstantem Zug offen gehalten. Bei einem korrekt präparierten Situs erkannte man den rechten Ventrikel, das linke Herzohr und einen Teil der Aorta ascendens. Die Exkursion der Lunge erschwerte nur selten die Sicht. Die LAD war als hell rötlich schimmernde Linie im Sulcus interventricularis zu erkennen. Wir verwendeten für die Instrumentierung der LAD 8.0 Prolene-Fäden der Firma Ethicon (EVERPOINT™ Cardiovascular Needles, BV175-8, 3/8 Circle, Ethicon EPM8746 Prolene Sutures). Die Nadel wurde zu einem „U“ vorgebogen, um die Unterstechung der LAD zu vereinfachen. Der Einstich erfolgte 1 mm unterhalb des linken Herzohres. Die LAD wurde von links nach rechts unterstochen (Abb. 6 B). Der Faden wurde gekürzt, so dass jeweils 2 cm freie Fadenenden verblieben. Ein 1 mm langes Segment eines PE-10 Plastikschlauchs fand als Okkluder Verwendung. Die Fadenenden wurden durch den Okkluder gefädelt (Abb. 6 C, D). Es folgte ein Okklusionstest unter laufender EKG-Aufzeichnung.

Die EKG-Ableitung erfolgte an den Extremitäten nach Einthoven. Durch kurzes Auseinanderziehen der beiden Fadenenden wurde der Okkluder an das Herzgewebe gedrückt. Es kam zur LAD-Okklusion und bei korrekter Lage zu einer signifikanten ST-Elevation im EKG. Danach wurde sofort reperfundiert. Der Okklusionstest war somit positiv. Die Retraktoren und die Knopfpinzette wurden aus dem Interkostalraum entfernt. Mit einer Nadel (Kalt-Nadel, Größe 3) wurden die Fäden an der linken Thoraxhälfte herausgezogen (Abb. 6 E). Der Okkluder verblieb im Thorax.

Die Fäden wurden zu einer Schleife verknötet und unter der Haut belassen (Abb. 6 F). Die Lunge wurde kurz rekrutiert und der Interkostalraum anschließend mit einem 6.0 Prolene Faden (BV 11mm, 3/8 c, Ethicon 8610, Prolene Sutures) verschlossen. Die Haut der Brust und des Halses wurde nochmals mit Jod-Lösung desinfiziert und mit Einzelknopfnähten verschlossen. Anschließend wurde die Narkosegaszufuhr beendet, die Fixierung der Maus wurde gelöst und nach Rückkehr einer suffizienten Spontanatmung extubiert. Die postoperative Aufwachphase erfolgte unter einer Wärmelampe im eigenen Käfig.

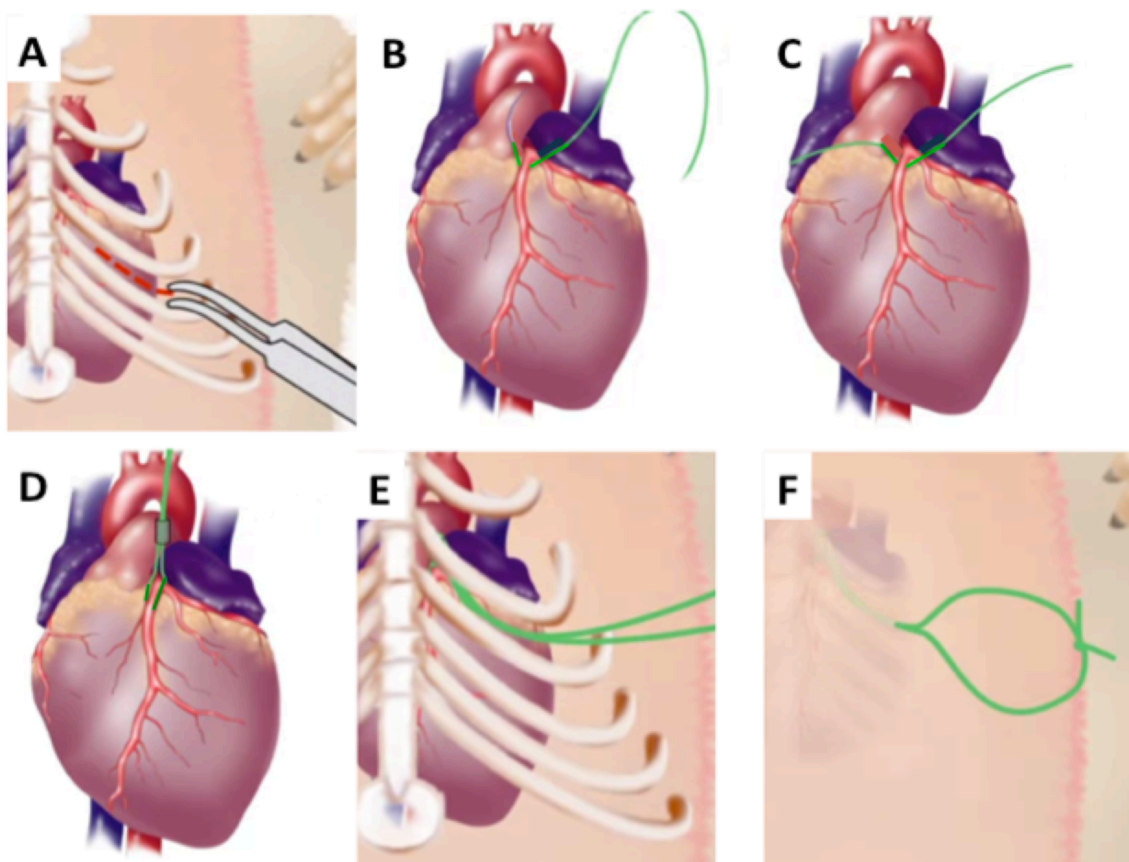


Abb. 6: Dargestellt sind die einzelnen Operationsschritte der Instrumentierung. A) Schnittführung bei der Präparation. B) Nach aufsuchen der LAD wurde diese unterstoichen. C) Der Faden wurde unter der LAD hindurch gezogen. D) Der Okkluder wurde aufgefädelt und bis an die LAD heran gezogen. E-F) Die Fäden wurden durch die Thoraxwand geführt und zu einer Schleife verknötet, die subkutan verblieb. Modifiziert nach Kim et al. 2012 (Genehmigt von JoVE Journal).

2.2.4 Ischämie- / Reperfusionsversuche

Die I/R-Versuche erfolgten fünf Tage nach der Instrumentierung. Das murine „closed chest“ Modell ermöglicht, dass sich die Tiere während dieser 5-tägigen Ruhephase vom operativen Trauma erholen. Vorarbeiten von Nossuli et al. haben gezeigt, dass die Expression inflammatorischer Zytokine schon 3 Tage nach der Instrumentierung auf das Niveau nicht instrumentierter Tiere zurückging (Nossuli et al., 2000). Weiterhin ist bekannt, dass Isofluran eine präkonditionierende Wirkung hat, die bis zu 72 Stunden nachweisbar ist (Feng et al., 2005; Zaugg et al., 2002). Deswegen entschieden wir uns für eine alternative Narkoseform.

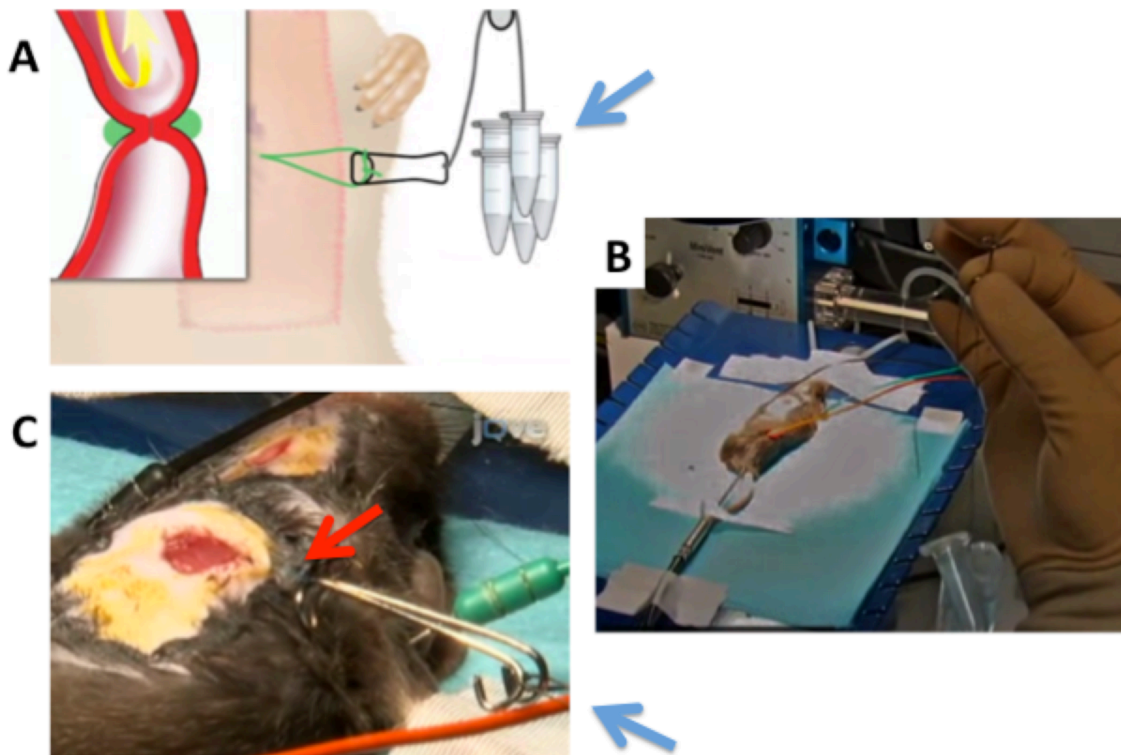


Abb. 7: Dargestellt ist der Ablauf der I/R-Versuche. A) Schematisch: Mithilfe von Gewichten (blauer Pfeil) erfolgte ein konstanter Zug an dem Faden, der mit dem Okkluder die LAD verschloß. Durch eine laufende EKG-Aufzeichnung wurde die ST-Streckenveränderung dokumentiert und überwacht. B) Die Gewichte im originalen Aufbau. C) Gespannter Faden (roter Pfeil) durch angelegte Gewichte. Modifiziert nach Kim et al. 2012 (Genehmigt von JoVE Journal).

Für die Anästhesie wurde während der I/R-Versuche eine Mischung aus Ketamin, Xylazin und Atropin verwendet. Es wurden 0,5 ml/kg KG eines Gemisch aus 10% Ketamin, 2% Xylazin und 0,05% Atropin intraperitoneal verabreicht (Kim et al., 2012). Nach 5 min konnte das Versuchstier auf dem Operationstisch fixiert werden. Die Überwachung der Temperatur erfolgte wieder über eine rektale Sonde, da eine Veränderung der Körpertemperatur die Ausdehnung der Infarktgröße beeinflusst (Chien et al., 1994). Nach Lagerung der Maus wurde die Haut wieder eröffnet und die Intubation erfolgte wie bei der oben beschriebenen Instrumentierung. Die Versuchstiere wurden kontrolliert mit Raumluft beatmet, um den Einfluss von hochprozentigem Sauerstoff zu vermeiden und eine kontrollierte Beatmung sicherzustellen. Anschließend wurde der Zugang zum Thorax präpariert. Nach Eröffnen des ehemaligen thorakalen Hautschnittes konnte die subkutan befindliche Fadenschleife in der Regel prompt aufgefunden werden. Die Fadenschleife wurde nach außen mobilisiert. Der Zug an der Fadenschleife erfolgte mittels eines Retraktors (Abb. 7 A und C, roter Pfeil) und 3 Wasser-befüllten 2ml-Mikroreaktionsgefäßen (Eppendorf Tubes®, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) (Abb. 7 A und B, blauer Pfeil). Die myokardiale Ischämie wurde mittels EKG-Ableitung (PowerLab, ADInstruments, Spechbach, Deutschland) über die Extremitäten kontinuierlich verifiziert. Eine ST-Strecken-Hebung im EKG die größer als das 0,5-fache der R-Zacke war, wurde als signifikant definiert und markierte den zeitlichen Beginn der 30-minütigen bzw. 60-minütigen Ischämie (Abb. 8). Die Hautwunden wurden feucht gehalten.

Fünf Minuten vor Beginn der Reperfusion wurden 250 µl PBS (Phosphatpufferlösung) respektive 0,2 µmol/kg KG CpG-ODN (1668 Thioat) intraperitoneal verabreicht. Die dritte Gruppe wurde nach Ende der Ischämie mit 3 Zyklen Reperfusion/Okklusion über jeweils 20 Sekunden ischämisch postkonditioniert (IPC). Die Substanzen wurden wie unter 2.2.2 beschrieben geblindet verabreicht. Nach Ende der Ischämie wurden die Tiere bei ausreichender Spontanatmung und vorhandener Willkürmotorik extubiert und unter einer Wärmelampe im Käfig verbracht.



Abb. 8: Abgebildet sind die EKG Aufzeichnungen während der Ischämieversuche. A) zeigt ein normales EKG vor der Ischämie. B) zeigt die infarkttypische ST-Streckenhebung unmittelbar nach der LAD-Okklusion. C) zeigt das EKG nach 25 min Ischämie.

2.2.5 Injektion von Phthaloblue

Für die planimetrische Auswertung der Infarktgröße musste das Risikoareal (Area at Risk) vom restlichen Myokard demaskiert werden. Das Risikoareal entspricht dem Versorgungsgebiet der LAD distal der Okklusionsstelle. Nach 2 Stunden Reperfusion wurde die Maus erneut narkotisiert und reintubiert. Die Narkose erfolgte wie oben beschrieben mit Isofluran. Eine konditionierende Wirkung von Isofluran ist zu diesem Zeitpunkt nicht mehr zu erwarten. Der prätracheale Hautschnitt wurde bis zum Xiphoid und zu beiden Seiten bis in die Axilla erweitert.

Die Abdominalhöhle wurde am Rippenbogen entlang zu beiden Seiten eröffnet. Das Diaphragma wurde von den Rippen gelöst. Der Knoten der durch die Thoraxwand geführten Fadenschleife wurde durchgeschnitten. Die Thoraxwand wurde beidseits lateral bis zur Axilla durchtrennt, anschließend nach rostral geklappt und mit einem

Faden fixiert. Der Okkluder wurde vorsichtig von der Thoraxwand mobilisiert und die Fadenenden der durchtrennten Fadenschleife durch die Thoraxwand gezogen.

Vor der intrakardialen *in vivo* Injektion von 10 % Phthalo-Blue (Phthalocyaninblau, Pigmentfarbstoff) wurden die Fadenenden fest verknotet, um die LAD zu okkludieren. Die Phthalo-Blue-Lösung wurde langsam in den linken Vorhof injiziert. Die Herzareale, die nicht von der okkludierten LAD versorgt wurden, färbten sich blau. Die AAR verblieb farblos. Anschließend erfolgte die Injektion von 0,5 ml einer 7,45% Kaliumlösung (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) in den linken Vorhof, um einen Herzstillstand in der Diastole zu induzieren.

2.2.6 Herzpräparation

Das Herz wurde herauspräpariert und in einer PBS-Lösung gewaschen. Der Okklusionsfaden wurde entfernt, das Herz leicht abgetupft und mit flüssigem Stickstoff angefroren, damit es anschliessend besser geschnitten werden konnte. Für das Zuschneiden der Herzen wurde ein spezielles Schneidegerät verwendet, womit Herzschnitte entlang der Herzachse mit konstanter Dicke von 1 mm hergestellt wurden (Abb9). Nach dem Zuschneiden der Herzen erfolgte die TTC-Färbung und anschließend die Formalinfixierung.

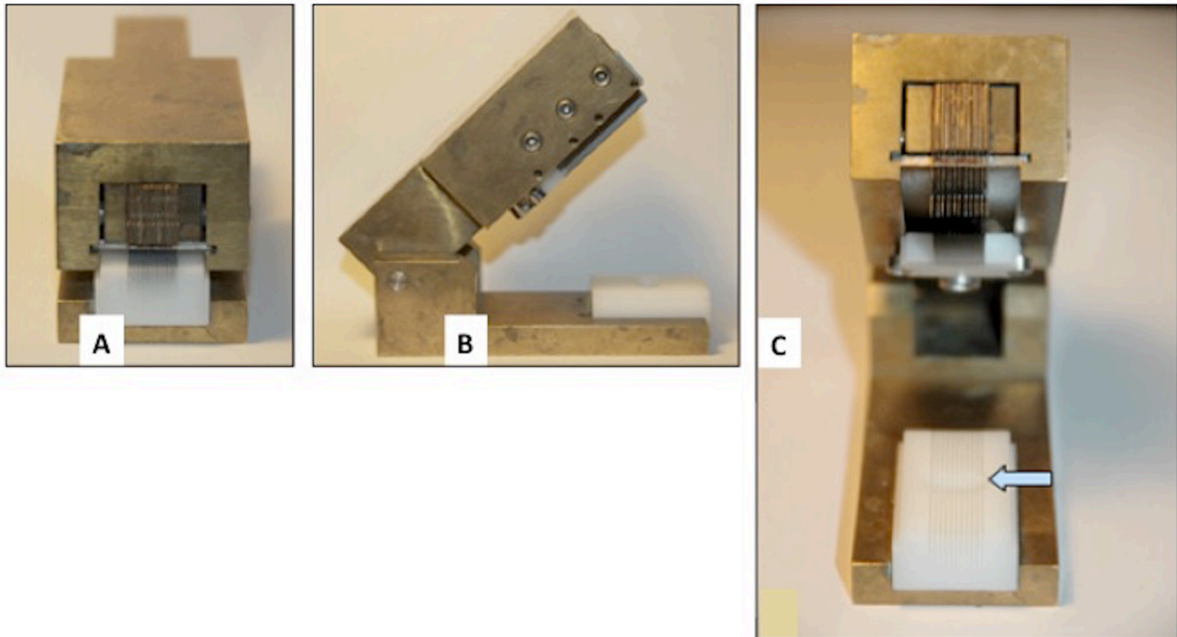


Abb. 9: Dargestellt ist ein Herzschnidegerät. A zeigt die Frontalansicht im geschlossenen Zustand. Die Rasierklingen passen sich nahtlos in die Kunststoffschlitzte ein. B) zeigt das Schneidegerät seitlich im geöffneten Zustand. C) zeigt die Frontalansicht des geöffneten Schneidegeräts. Man erkennt gut die Kunststoffschlitzte in die die Rasierklingen eingeführt werden. Der Pfeil zeigt die Position, wo das Herz platziert wird. Modifiziert nach Kim et al. 2012 (Genehmigt von JoVE Journal).

2.3 Herstellung von 1668-Thioat

Die Thioat-stabilisierten Oligonukleotide (500 nmol lyophilisiertes, ungelöstes 1668-Thioat) (5'-TCC-ATG-**ACG**-TTC-CTG-ATG-CT, Thioat 1668, TibMolBiol, Berlin, Germany) wurden von der Firma TibMolBiol geliefert. Diese wurden bei +4 °C im Kühlschrank aufbewahrt. Der Inhalt wurde mit 1 ml Aqua ad injectabilia mittels Vortex aufgelöst. In der Zwischenzeit wurden 4 ml Aqua ad injectabilia in einen 15 ml Zentrifugenröhrchen zugegeben und anschließend mit der Thioatlösung vermischt. Diese 5 ml wurden wieder mittels Vortex gemischt und auf 5 Eppendorf-Reaktionsgefäße zu jeweils 1 ml aliquotiert. Die Endkonzentration der Stammlösung betrug 100 nmol Thioat in 1 ml Lösung. Für die Postkonditionierung wurde eine Konzentration von 5 nmol in 200 µl PBS verwendet. Dafür wurden 250 µl der Stammlösung (100 nmol/ml) entnommen (entsprechen 25 nmol 1668 Thioat) und mit

750 µl PBS mittels Vortex gemischt. Bei dieser Verdünnung sind in 200 µl PBS 5 nmol Thioat enthalten. Sie wurden mit einer Insulinspritze intraperitoneal injiziert.

2.4 TTC-Herstellung

Die TTC-Färbung (Triphenyltetrazoliumchlorid) erlaubt eine frühzeitige Darstellung des myokardialen Infarktgewebes. Die Methode beruht auf der Fähigkeit der Dehydrogenaseenzyme mit Tetrazoliumsalzen Formazan-Pigmente zu bilden. Gewebe, das sich nicht anfärben lässt, verfügt über keine funktionsfähigen Dehydrogenaseenzyme, ist nicht vital und hat eine helle Farbe. Das vitale Gewebe stellt sich als leuchtend rot dar und kann vom Infarktgewebe gut unterschieden werden. Es existieren 2 Formen der Tetrazoliumlösung. Die Nitroblue- und die Triphenyllösung. Wir haben uns für das Triphenyltetrazolium entschieden, die von Downey et al. beschrieben wurde. Es ist geeignet, Herzschnitte anzufärben, da es gut gewebebegänglich ist (Downey et al., 1994).

Für die Herstellung von TTC wurde ein Puffersystem bestehend aus dem Na_2HPO_4 (0,1 M) und dem NaH_2PO_4 (0,1 M) benötigt. Na_2HPO_4 hat eine molare Masse von $142 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ und die molare Masse von NaH_2PO_4 beträgt $120 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$. Wir setzten 100 ml Pufferlösung mit dem pH von 7,4 an. Um diese Konstellation zu erreichen, wurden 1,09908 mg Na_2HPO_4 und 0,2712 mg NaH_2PO_4 in 100 ml destilliertem Wasser gelöst. Der pH wurde mit einem pH-Meter kontrolliert und es wurde eine Lösung mit dem pH von 7,4 hergestellt. Als nächstes wurde das Tetrazoliumsalz hinzugefügt. 100 ml Puffer enthielten 1 mg TTC. Die lichtempfindliche Lösung wurde in einer mit Alufolie umwickelten Glasflasche lichtgeschützt im Kühlschrank gelagert.

2.5 TTC-Färbung

Zur TTC-Färbung der Herzschnitte wurden jeweils 1 ml 1,5% Triphenyltetrazoliumchlorid Salz (TTC, Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland) in acht Vertiefungen einer 96-well Platte hineingegeben und in einem Wärmeschrank bei 37°C vor Beginn der Ischämie vorgewärmt.

Die Herzschnitte wurden vorsichtig einzeln und in ihrer Schnittrihenfolge in jeweils eine Vertiefung der 96-well Platte hineingegeben und für 20 min bei 37°C im Wärmeschrank inkubiert. Anschließend wurden die Herzschnitte in eine 96-well Platte, die mit 4 % Formalin-Lösung befüllt war, korrespondierend überführt und für 24 Stunden fixiert. Die Formalinfixierung bewirkt eine Kontrasterhöhung und verbessert dadurch die Differenzierung des vitalen Gewebes von nekrotischen Arealen. Dabei bleicht das Formalin insbesondere das extravasal befindliche Blut und bewirkt eine Braunfärbung des Blutes. Das erleichtert die Differenzierung des haemorrhagischen Infarktgewebes von vitalen TTC-gefärbten Arealen. Zusätzlich entfernt Formalin die fettige Oberfläche auf den Herzschnitten und erhöht somit noch mehr den Kontrast (Bohl et al., 2009).

Nach der Formalinfixierung wurden die Herzen auf einem Objektträger in einer Reihe angeordnet und durch einen weiteren Objektträger mit Hilfe von Abstandshaltern auf eine Schichtdicke von 1 mm komprimiert. Dies war notwendig, da der Färb- und Fixierprozess zu einer Verformung der Herzschnitte führt und die Herzschnitte infolgedessen nicht mehr plan aufliegen. Die Herzschnitte wurden von beiden Seiten digital fotografiert (Openlab, Improvision, Coventry England). Zuerst wurde der größte Herzschnitt fotografiert. Danach wurde der Zoomfaktor nicht mehr verändert und alle folgenden Schnitte bei gleichem Zoom abgelichtet. Einstellungen des Mikroskops wie Helligkeit und Kontrast wurden für alle Herzen übernommen und konstant belassen.

2.6 Planimetrie

Die planimetrische Auswertung erfolgte verblindet mit der Software ImageJ (Version 1.29, NIH, Bethesda, MD). Dem Untersucher wurde eine Datei mit kodierten Namen und den Bildern von Herzschnitten übermittelt. Es konnten während der Auswertung keine Rückschlüsse auf die postkonditionierende Substanz, oder die Intervention aus der untersuchten Bilddatei bzw. der einzelnen Herzschnitten gezogen werden.

Für die Auswertung musste das Herz initial in 1 mm dicke Scheiben zugeschnitten werden (s. Kap. 2.2.6) und jede Scheibe wurde von beiden Seiten fotografiert. Es wurden zuerst die blau gefärbten Areale planimetrisch quantifiziert (NAAR). Dann wurde die durch das TTC rot gefärbte Area-at-risk einschließliches Infarktareals planimetrisch bestimmt. Anschließend wurde das nicht gefärbte Infarktareal vermessen. Die planimetrische Quantifizierung wurde für jeweils beide Seiten aller Herzschnitte durchgeführt und abschließend die Summe für die folgenden Flächen berechnet:

- Area at Risk (AAR): das von der okkludierten LAD versorgte Myokardgewebe, dass neben dem Infarkt vitales Gewebe enthält und rot gefärbt ist (Abb. 10 C, grüne Markierung)
- Infarkt (IS): Infarktgewebe innerhalb der AAR, welches sich nicht rot färbt (Abb. 10 B und C, gelbe Markierung)
- Non-Area at Risk (NAAR): Das Gebiet ausserhalb der Okklusionsstelle der LAD, dass den Blaufarbstoff Phtalo-Blue enthielt (Abb. 10 C, blaue Markierung)
- Gesamtfläche aller Herzscheiben: Wurde aus der Summe der AAR und NAAR berechnet.

Ausgehend von diesen Angaben wurden die Quotienten von AAR zur Gesamtfläche aller Herzscheiben und IS zu AAR nach den folgenden Formeln berechnet.

$$\text{AAR zur Gesamtfläche (\%)} = \left(\frac{\text{AAR}}{\text{Gesamtfläche}} \right) * 100$$

$$\text{IS zur AAR (\%)} = \left(\frac{\text{IS}}{\text{AAR}} \right) * 100$$

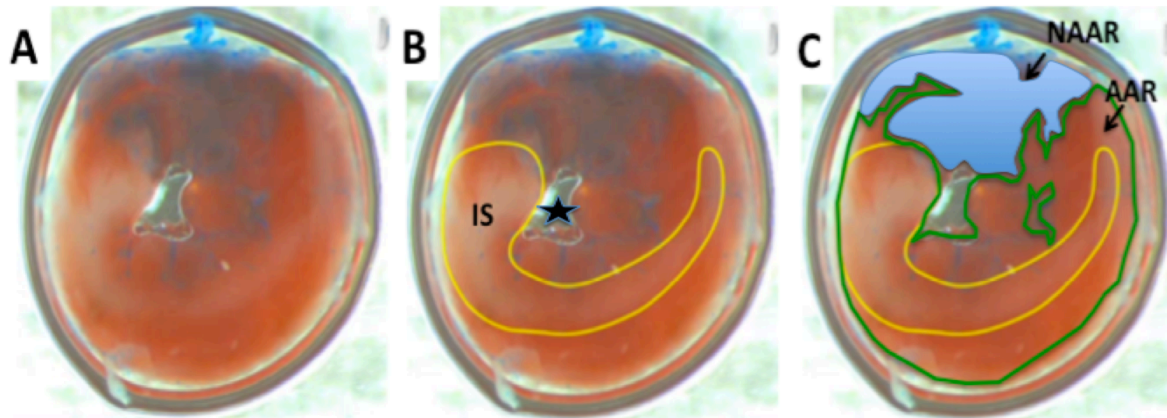


Abb. 10: Dargestellt ist die mikroskopische Sicht auf einen Herzschnitt. A) Herzschnitt nach der TTC Färbung. B) Eine schematische Markierung des Infarktgebiets in gelb und das Gebiet mit intakter Perfusion, das den blauen Farbstoff enthielt (NAAR). C) Die Markierung der AAR in grün und eine schematische Markierung der NAAR. Schwarzer Stern markiert das Myokardlumen, das nicht mitausgewertet wurde. Modifiziert nach Kim et al. 2012.

2.7 Molekularbiologische Untersuchungen

2.7.1 Quantitative Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion

Mit Hilfe der RT-PCR wurde das mRNA-Expressionsmuster von $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, IL-6 und IL-10 im murinen Herzgewebe untersucht.

Aufgrund der geringen intrazellulären Menge der Nukleinsäuren, bedient man sich der Polymerasekettenreaktion zur Vervielfältigung der spezifischen DNA- und RNA-Abschnitte. Um die Menge der RNA zu bestimmen, muss die RNA aus dem Gewebe extrahiert werden und anschließend photometrisch auf Konzentration und Reinheit untersucht werden. Im Anschluss wird die RNA in cDNA umgeschrieben und weiter analysiert.

Dabei wird in mehreren Zyklen die doppelsträngige cDNA zerlegt. Anschließend lagern sich die spezifischen Oligonukleotidprimer an die zu untersuchenden Areale der cDNA an. Die Primer werden durch die thermostabile DNA-abhängige DNA-Polymerase an dem 3'-Hydroxyende verlängert, was zu exponentieller Vervielfältigung der DNA Menge führt und die Analyse ermöglicht.

2.7.2 RNA-Isolation

Vor der RNA-Isolation wurde der Homogenisator mit GIT und DEPC-Wasser gereinigt. Drei ml Trizol Lösung wurden in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen gegeben und danach das Organ aus dem -80 °C Tiefkühlschrank geholt. Dabei wurden 1 ml Trizol für 100 mg Gewebe benutzt.

Die Herzen wurden homogenisiert bis keine groben Gewebstücke vorhanden waren und 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde 200 µl Chloroform pro 1 ml Trizol zugegeben und dreimal bei 4000 rpm zentrifugiert. Es folgten weitere 10 min Inkubation auf Eis. Nach der Inkubation wurde 30 min bei 4000 rpm zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand (RNA-Phase) vorsichtig mit einer 200 µl Pipette entnommen und in ein 15 ml Tube überführt. Die beiden unteren Phasen mit Proteinen und Trizol wurden verworfen.

Die wässrige Phase, in der die RNA enthalten ist, wurde mit 1,5 ml Isopropanol (0,5 ml pro ml Trizol) gemischt und bei -20 °C über Nacht inkubiert.

Am nächsten Tag wurde die Lösung wieder 30 Minuten bei 4000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde entsorgt und das Pellet vorsichtig mit 6 ml 75% EtOH gewaschen und anschließend 10 min bei 4000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet luftgetrocknet und in 200 µl DEPC-Wasser resuspendiert. Nach dieser Prozedur erfolgte die RNA-Konzentrationsbestimmung am Nanodrop.

Tab. 2: Es sind Materialien aufgelistet, die zur RNA-Isolation verwendet wurden.

Material	Firma	Nummer und Menge
Chloroform	Sigma	C2432, 500ml
Trizol	Ambion	AM9738, G6639
4 M Guanidine thiocyanat	Sigma	G6639
2 Propanol	Merck	1.09634.2511, 2,5L
75% EtOH		
DEPC-Wasser		

2.7.3 cDNA-Synthese

Für die cDNA-Synthese wurde 2000 ng Gesamt-RNA eingesetzt. Zu der Lösung wurde das Reaktionsgemisch für die cDNA-Synthese gegeben. Das Gemisch bestehend aus: 5 µl reverse Transkriptase Puffer, 2 µL Desoxyribonukleosid-triphosphate (dNTPs), 5 µl Random Primer, 2,5 µl MultiScribe® reverse Transkriptase 50 U/µl, 0,25 µl RNase Inhibitor 2000 U/µl und 10,25 µl DEPC-Wasser umfasst 25 µl Reaktionslösung. Zu jeder RNA-Probe á 25 µl wurden diese 25 µl Mastermix hinzugegeben, zentrifugiert und 2 h im Thermocycler inkubiert (1. 25 °C für 10 min, 2. 37 °C für 2 h, 3. 85 °C für 5 Sek., 4. 4 °C ∞). Die fertigen Proben wurden bis zur anstehenden PCR Analyse bei 4°C gelagert.

Der Mastermix enthielt 10x reverse Transkriptionspuffer (5 µl), 25x DNTPs (2 µl), 10x random Primer (5 µl), Multi Scribe reverse Transkriptase (2,5 µl), RNase Inhibitor (0,25 µl) und nukleasefreies Wasser (10,25 µl).

2.7.4 Quantitative Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion

Wir benutzen für unsere Untersuchungen den ViiA7 von Applied Biosystems, 384 Well Platten und folgende Primer-Sonden.

Tab. 3: Verwendete Primer in der RT-qPCR zur Detektion von TNF- α , IL-1 β , IL-6 und IL-10.

Primer-Sonde	Produkt-Nummer
mouse IL-1 β	Mm01336189_m1
mouse IL-6	Mm00446190_m1
mouse TNF- α	Mm00443258_m1
mouse IL-10	Mm00439616_m1

Als Housekeeping Gen für die PCR Untersuchung wurde 18S verwendet. Alle einzelnen Proben mussten dreifach für jedes Ziel-Gen analysiert werden. Das Reaktionsgemisch pro Reaktion für eine Probe wurde wie folgt gewählt.

5,61 μ l PCR-Mastermix (2x)
 2,83 μ l DEPC-Wasser
 0,56 μ l jeweiliger Primer-Sonde.
 2,22 μ l spezifische cDNA pro Well

Die so hergestellte Lösung ergab 11,22 μ l. Daraus wurden 10 μ l in ein Well pipettiert. Alle Versuchsschritte wurden auf Eis durchgeführt. Die RTqPCR durchlief 40 Zyklen. Die Analyse der Daten wurden mit der ViiA™7 Version 1.2 Software durchgeführt. Anschließend wurde eine $\Delta\Delta C_T$ Auswertung durchgeführt. Der C_T -Wert ist der Zeitpunkt in der PCR-Analyse, an dem sich alle gemessenen Werte in einem exponentiellen Produktzuwachs befinden. Die C_T -Werte einzelner Proben konnten so miteinander verglichen werden. Am Anfang wurde für die Berechnung der $\Delta\Delta C_T$ der ΔC_T -Wert bestimmt, indem der C_T -Wert des Housekeeping-Gens (18S) vom C_T -Wert des gesuchten Gens subtrahiert wurde. Anschließend wurde der C_T -Mittelwert der Kontrollen gebildet. Als Kontrolle dienten jeweils die Mittelwerte unbehandelter WT Tiere. Mithilfe des $\Delta\Delta C_T$ -Wertes konnte der Relative Quotient (RQ) jeder Probe bestimmt werden.

$$\Delta C_T = C_{T_{\text{Zielgen}}} - C_{T_{\text{Housekeeping-Gen}}}$$

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_{T_{\text{SHAM WT}}} - \Delta C_{T_{\text{Kontrolle WT}}}$$

$$RQ = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

2.8 Verbrauchsmaterialien

Tab. 4: Geräte, die zur RNA-Isolation, cDNA-Synthese und RTqPCR verwendet wurden.

Geräte	Firma	Typ
Dispergier-Aggregat	Kinematica AG	Polytron® PT2100
NanoDrop	Thermo Scientific	NanoDrop 2000 Spectrophotometer
Via7 Software	Applied Biosystems™	Via™7 Software Version 1.2

Tab. 5: Materialien und Substanzen, die zur RNA-Isolation, cDNA-Synthese und qRT-PCR verwendet wurden.

Materialien	Firma	Typ
384 Well Platte	Brand	384-well PCR-Platte 781347
DEPC	Sigma	Diethylpyrocarbonate LotBCBD3923V
GIT	Sigma	Guanidine thiocyanate ≥ 97 % LotBCBK5190V
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems	reverse Transkriptase Puffer, Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs), Random Primer, Multi Scribe reverse Transkriptase Lot1207126
Kryoröhrchen	Thermo Scientific	2 ml
Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich	2-Mercaptoethanol 98 % Lot125K0165
PCR Tubes	Axygen	PCR-02-C thin wall, clear 32102051
PCR-Mastermix (2x)	Applied Biosystems	TaqMan® Gene Expression Master Mix
Proteinase K	Qiagen®	Proteinase K 10ml Lot145013159
RNase Inhibitor	Qiagen	RNase Inhibitor 2000units Cat.No129916
RNeasy mini Kitt	Qiagen	Cat. No. 74106 (250rxn) mit RLT-Puffer, RW1-Puffer, RDD-Puffer, RPE-Puffer, Rnase freies Wasser

Tab. 6: Materialien und Substanzen, die für die Tierhaltung verwendet wurden.

Gerät	Firma	Adresse
Käfige Makrolon, Typ II L	Charles River Deutschland GmbH	D-Sulzfeld
Altromin-Tiereinstreu-Granulat	Altromin GmbH und Co. KG	D-Lage-Lippe
Altromin-Standarddiätfutter Maus und Ratte	Altromin GmbH und Co. KG	D-Lage-Lippe
Objektträger Super Flos Frost Plus	Menzel-Gläser	D-Braunschweig
Kardiotom	Eigenbau	D-Bonn
Millar-Katheter-System	Millar	Neuseeland
Zentrifuge Model 5415R	Eppendorf AG	D-Hamburg
Heparin-Natrium-25.000-ratiopharm[®]	Ratiopharm	Ratiopharm GmbH, D-Ulm
Endotrachealkanüle Durchmesser 1,0 mm und 1,2 mm	Hugo Sachs Elektronik	D-March-Hugstetten
Minivent Typ 845	Hugo Sachs Elektronik	D-March-Hugstetten
Mikro-Tip Pressure Katheter	Millar	Neuseeland
Kaltnadeln, Größe 3	Ethicon	D-München
Betaisodona Lösung[®]	Mundipharma GmbH	D-Limburg
Isofluran: Forene[®]	Abbott GmbH & Co. KG	D-Wiesbaden
Augenschere	Fine Science Tools, Inc	San Francisco, USA
Pinzetten	Fine Science Tools, Inc	San Francisco, USA
Castroviejo-Nadelhalter	Allgaier Instrumente	D-Frittlingen
Klemmen	Allgaier Instrumente	D-Frittlingen
Wund-Retraktoren	Allgaier Instrumente	D-Frittlingen
Operationsmikroskop OpMi-191294	ZEISS	D-Oberkochen
OP-Tisch	Eigenbau	D-Bonn
Wärmebad (42 °C)	Rhema-Labortechnik	D-Hofheim
Temgesic-Lösung[®]	Fa. Essex Pharma	D-München
6.0 Prolene[®] Fäden BV-1	Ethicon GmbH	D-Norderstedt
8.0 Prolene[®] Fäden BV-1	Ethicon GmbH	D-Norderstedt
Seidenfäden	Serag Wiessner	D-Naila
1668 Thioat; 5-TCCATGACGTTCTGATGCT 3`	TibMolBiol	D-Berlin
Phthaloblau-Lösung 5 %	Heubach Dispersionsfarbe	D-Heubach
PBS Pufferlösung	Gibco	D-Darmstadt
Formalin 4%	Merck	D-Darmstadt

2.9 Software

Chart for Windows ADInstruments, Castle Hill, Australien

Prism 3.0 GraphPad Software, San Diego, USA

Image J Version 1.29, Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA

Fine Science Tools, Inc. - Datenverarbeitung durch Power Lab Data Acquisition System; ADInstruments

Millar Instruments Inc., Houston, USA - Datenverarbeitung durch Power Lab Data Acquisition System; ADInstruments

Openlab, Improvision, Coventry England

2.10 Statistische Analyse

Bei allen Tiergruppen wurden die Mittelwerte (MW) und Standardfehler des arithmetischen Mittels (SEM) errechnet. Mit dem Statistikprogramm Prism wurden die Daten mittels einfaktorieller Varianzanalyse und anschließendem Posthoc-Test nach Bonferroni analysiert und die Signifikanzen ermittelt. Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $P < 0,05$ galt der Unterschied als statistisch signifikant.

3. Ergebnisse

3.1 Planimetrische Auswertung

Vitales Myokardgewebe wird von TTC leuchtend rot gefärbt und ermöglicht so die Darstellung von Infarktarealen. Die AAR ist das Perfusionsareal, das distal der okkludierten LAD versorgt wird. Eine Okklusion der LAD zu weit distal führt zu entsprechend kleineren AAR mit konsekutiv kleineren Infarktgrößen. Umgekehrtes gilt entsprechend für eine zu weit proximal okkludierte LAD. Daher ist eine konstante Position der LAD-Instrumentierung unabdingbar für die Vergleichbarkeit der Infarktgrößen. Daher wurde planimetrisch die AAR bestimmt und zwischen den PBS, IPC- und CpG-ODN-Gruppen nach 30 min Ischämie und 2 h Reperfusion verglichen.

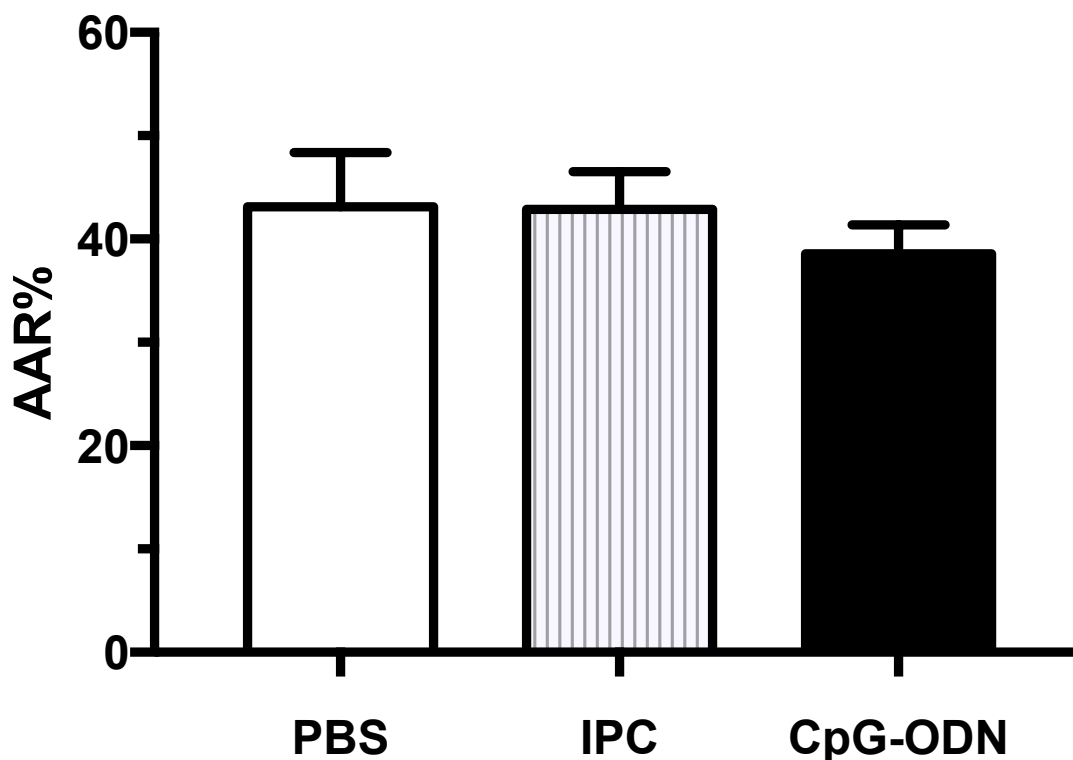


Abb. 11: Area at Risk in prozentualer Relation zur Gesamtfläche aller Herzscheiben in den Gruppen PBS, IPC und CpG-ODN. Die AAR waren in allen Gruppen annähernd gleich. $n = 12-20$, $p < 0,05$.

In der PBS-Gruppe betrug die AAR/Herz% ($41,34 \pm 2,89$, $n = 20$), in der IPC-Gruppe ($41,35 \pm 2,22$, $n = 12$). In der CpG-ODN Gruppe betrug die AAR/Herz% ($37,67 \pm$

2,43, n = 13). Es zeigten sich keine Unterschiede in der Größe der AAR. Die LAD-Okklusion wurde bei allen Tieren konstant an der gleichen Stelle durchgeführt. Dadurch wurde sichergestellt, dass der ischämische Bereich des Myokardes nicht in seiner Ausdehnung variiert und das Experiment reproduzierbar ist (Abb. 11).

Als nächstes führten wir Postkonditionierungsversuche mit dem TLR 9-Ligand CpG-ODN, um zu klären, ob CpG-ODN einen Einfluß auf die Infarktgröße im Rahmen der I/R in einem murinen „closed chest“ Modell hat. Die Ergebnisse wurden mit der PBS-Gruppe und der IPC-Gruppe verglichen.

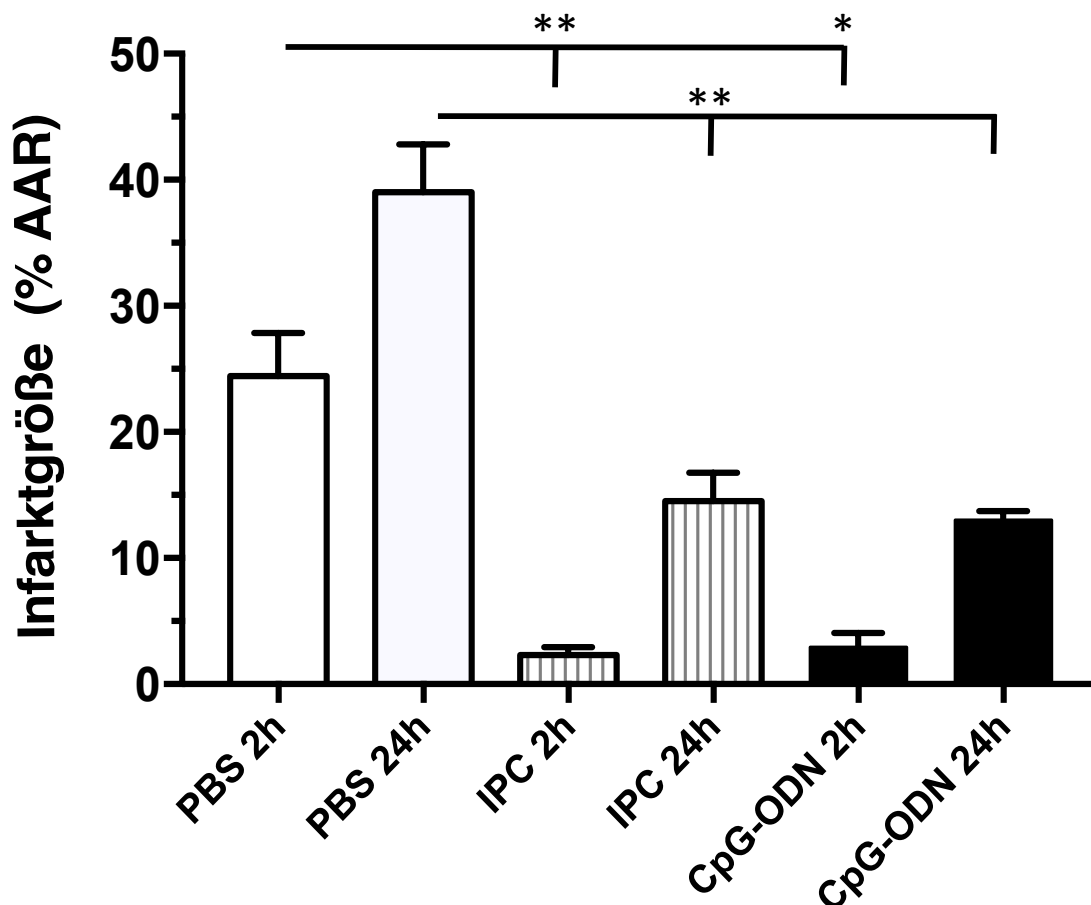


Abb. 12: Infarktgröße (IS) in Prozent der AAR (IS/AAR%) für die Gruppen PBS, IPC, CpG-ODN. Alle 3 Gruppen wurden mit einer Ischämiedauer von 30 min, gefolgt von 2h oder 24 h Reperfusion behandelt. Sowohl nach 2 h als auch nach 24 h Reperfusion führte die IPC und die Postkonditionierung mit CpG-ODN zu einer signifikanten Reduktion der IS im Vergleich zu der PBS-Gruppe. ** = P < 0,001, * = P < 0,01.

Nach einer 30-minütigen Ischämie und 2 Stunden Reperfusion betrug die Infarktgröße in der PBS-Gruppe $23,16 \pm 3,97$ IS/AAR% (MW \pm SEM, n = 10). Die Infarktgröße in der IPC-Gruppe war hingegen um 91,5% kleiner ($1,98 \pm 1,03$ n = 6, P < 0,001) und in der CpG-ODN reduzierte sich die IS/AAR% um 89,9% auf $2,35 \pm 1,54$ IS/AAR% (n = 5, P < 0,01). Nach 24 Stunden Reperfusion wurden größere Infarkte in allen Gruppen beobachtet. In der PBS-Gruppe betrug die Infarktgröße $39,49 \pm 3,34$ IS/AAR% (n = 10), in der CpG-ODN-Gruppe war der Infarkt $12,49 \pm 1,11$ IS/AAR% (n = 7) groß und in der IPC-Gruppe $13,92 \pm 2,06$ (n = 7). Nach 24 Stunden Reperfusion war die Infarktgröße der mit PBS behandelten Tiere signifikant größer als die der CpG- und IPC-Gruppe (P < 0,001) und es kam zu einer signifikanten Größenzunahme in der PBS-Gruppe (P < 0,01). Die Infarktgrößen in den Gruppen CpG-ODN und IPC haben nach 24h Reperfusion nicht signifikant zugenommen (P > 0,05) (Abb. 12).

Um den Einfluss der Ischämiedauer auf die Postkonditionierung zu untersuchen wurde in einem weiteren Experiment die Ischämiezeit auf 60 min und die Reperfusionzeit auf 24 h ausgedehnt.

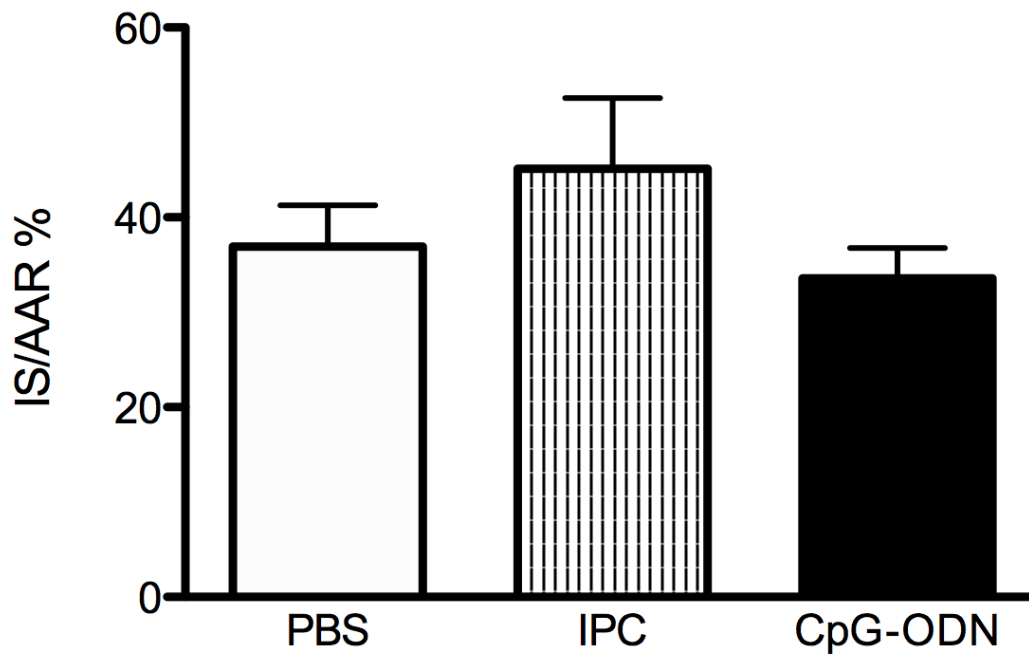


Abb. 13: Infarktgröße in Prozent der AAR (IS/AAR%) der Gruppen PBS, IPC und CpG-ODN. In alle Gruppen betrug die Index-Ischämiezeit 60 min, gefolgt von einer 24-stündigen Reperfusion. Es konnte kein signifikanter Unterschied der IS festgestellt werden.

Es wurde in allen Gruppen eine Zunahme der Infarktgröße beobachtet. In der IPC-Gruppe betrug die Infarktgröße $45,12 \pm 7,47$ IS/AAR% ($n = 5$), in der PBS-Gruppe $36,90 \pm 4,39$ IS/AAR% ($n = 5$) und in der CpG-ODN Gruppe $33,56 \pm 3,23$ IS/AAR% ($n = 6$). Zwischen den einzelnen Gruppen bestand kein signifikanter Unterschied ($P > 0,05$). Die Verlängerung der Ischämiezeit hob den kardioprotektiven Effekt von CpG-ODN und IPC auf (Abb. 13).

3.2 Zytokinexpression

Myokardischämie, Reperfusion und die Postkonditionierung mit dem TLR9 Liganden CpG-ODN bewirken eine Modulation des Immunsystems und eine veränderte Zytokinexpression. Aus diesem Grund wurde die Veränderung der myokardialen Zytokinexpression in den Gruppen PBS, IPC und CpG-ODN nach 30 min Ischämie und 2 h Reperfusion untersucht. Die Quantifizierung der mRNA-Expression im Herzen erfolgte mittels RT-PCR.

Es konnte gezeigt werden, dass die Postkonditionierung mit CpG-ODN eine 8-fache Erhöhung der TNF- α Expression ($11,54 \pm 1,98$ RQ; TNF- α mRNA/GAPDH mRNA, n = 8) im Vergleich zu der IPC-Gruppe ($1,93 \pm 0,338$ RQ, n = 7) oder der PBS-Gruppe ($1,41 \pm 0,42$ RQ, n = 6) bewirkte (Abb. 14).

Die IL-1 β Expression war 2,3-fach höher in der mit CpG-ODN behandelten Gruppe ($15,09 \pm 1,94$ RQ (IL-1 β mRNA/GAPDH mRNA), n = 8, P < 0,05) als in der IPC-Gruppe ($6,48 \pm 2,41$ RQ, n = 7). Es wurde eine geringe, nicht signifikante Erhöhung in der PBS-Gruppe ($9,90 \pm 2,90$ RQ, n = 7) beobachtet. Es konnte dabei kein signifikanter Unterschied zwischen CpG-ODN und PBS festgestellt werden (Abb. 15).

Die IL-6 Expression war um den Faktor 1,8 in der CpG-ODN Gruppe ($630,40 \pm 49,29$ RQ (IL-6 mRNA/GAPDH mRNA), n = 8) verglichen mit der PBS behandelten Gruppe ($335,40 \pm 50,90$ RQ, n = 6, P < 0,05) erhöht (Abb. 16).

Die IL-10 Expression wurde durch die CpG-ODN Postkonditionierung 2,4-fach im Vergleich mit PBS und IPC erhöht (P < 0,05) (Abb. 17).

TNF- α

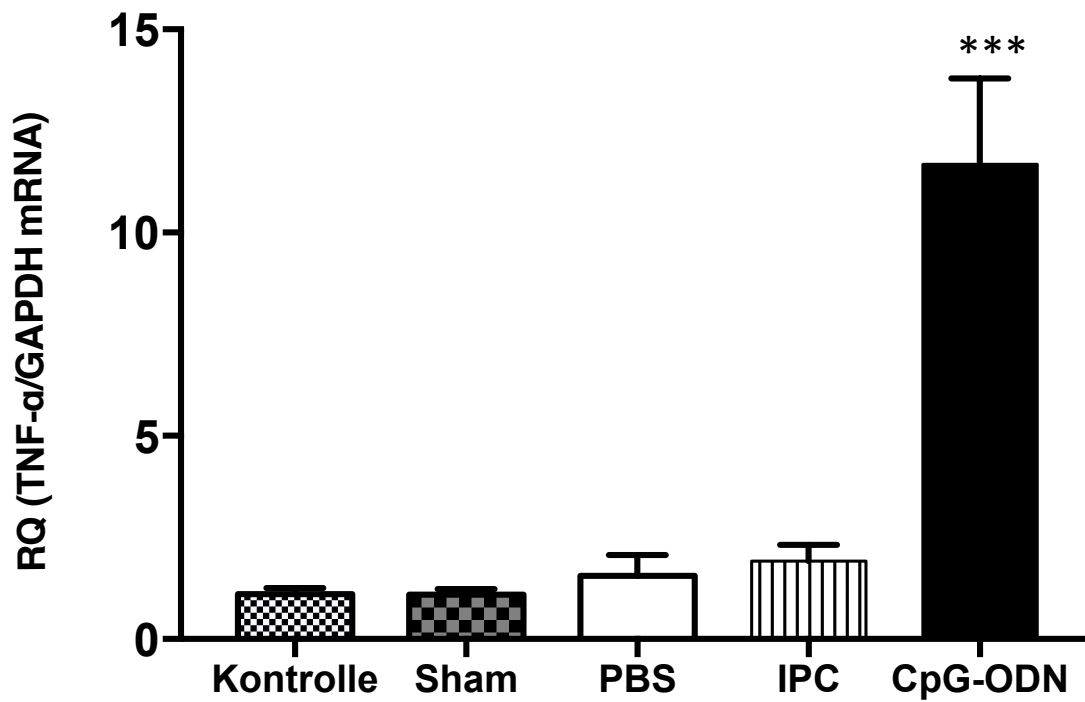


Abb. 14: mRNA-Expression der inflammatorischen Zytokine TNF- α in den Gruppen PBS, IPC und CpG-ODN. Als housekeeping Gen für die Berechnung des RQ wurde die GAPDH verwendet. Die TNF- α Expression war in der CpG-Gruppe 8-fach höher als in den PBS- und IPC-Gruppen. *** $P < 0,001$.

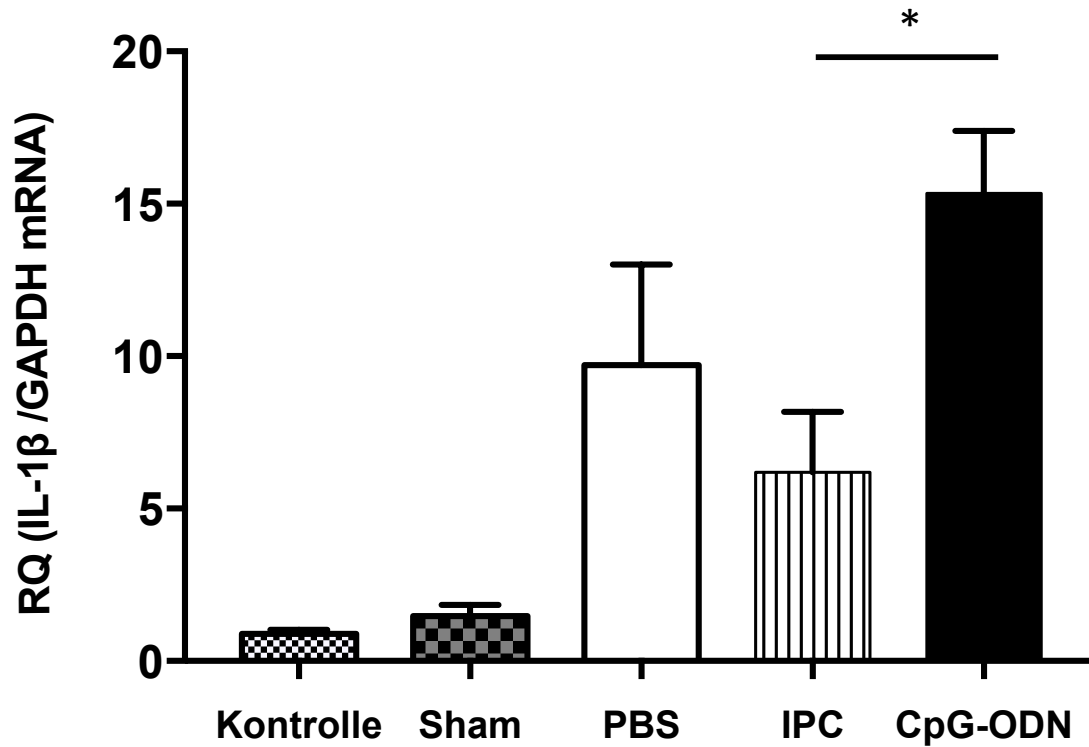
IL-1 β 

Abb. 15: mRNA-Expression der inflammatorischen Zytokine IL-1 β in den Gruppen PBS, IPC und CpG-ODN. Als housekeeping Gen für die Berechnung des RQ wurde die GAPDH verwendet. Die IL-1 β Expression war 2,3-fach höher in der CpG-ODN-Gruppe im Vergleich zur IPC-Gruppe. * P < 0,05.

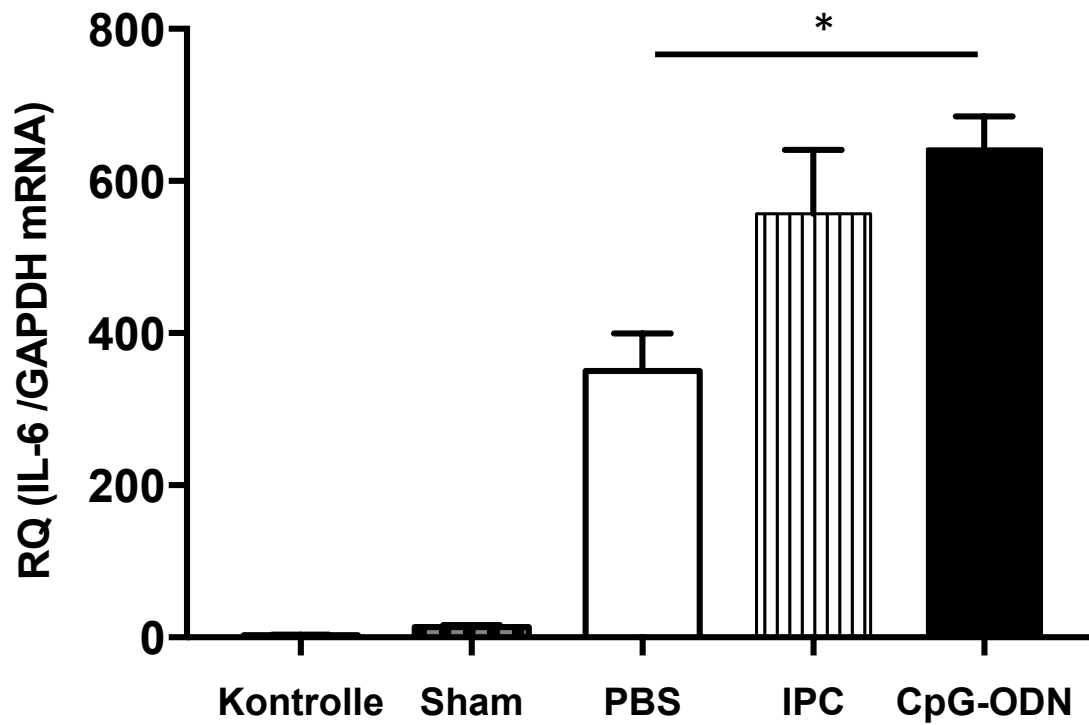
IL-6

Abb. 16: mRNA-Expression der inflammatorischen Zytokine IL-6 in den Gruppen PBS, IPC und CpG-ODN. Als housekeeping Gen für die Berechnung des RQ wurde GAPDH verwendet. Die IL-6 Expression war um den Faktor 1,8 in der CpG-ODN Gruppe verglichen mit der PBS behandelten Gruppe erhöht. * $P < 0,05$.

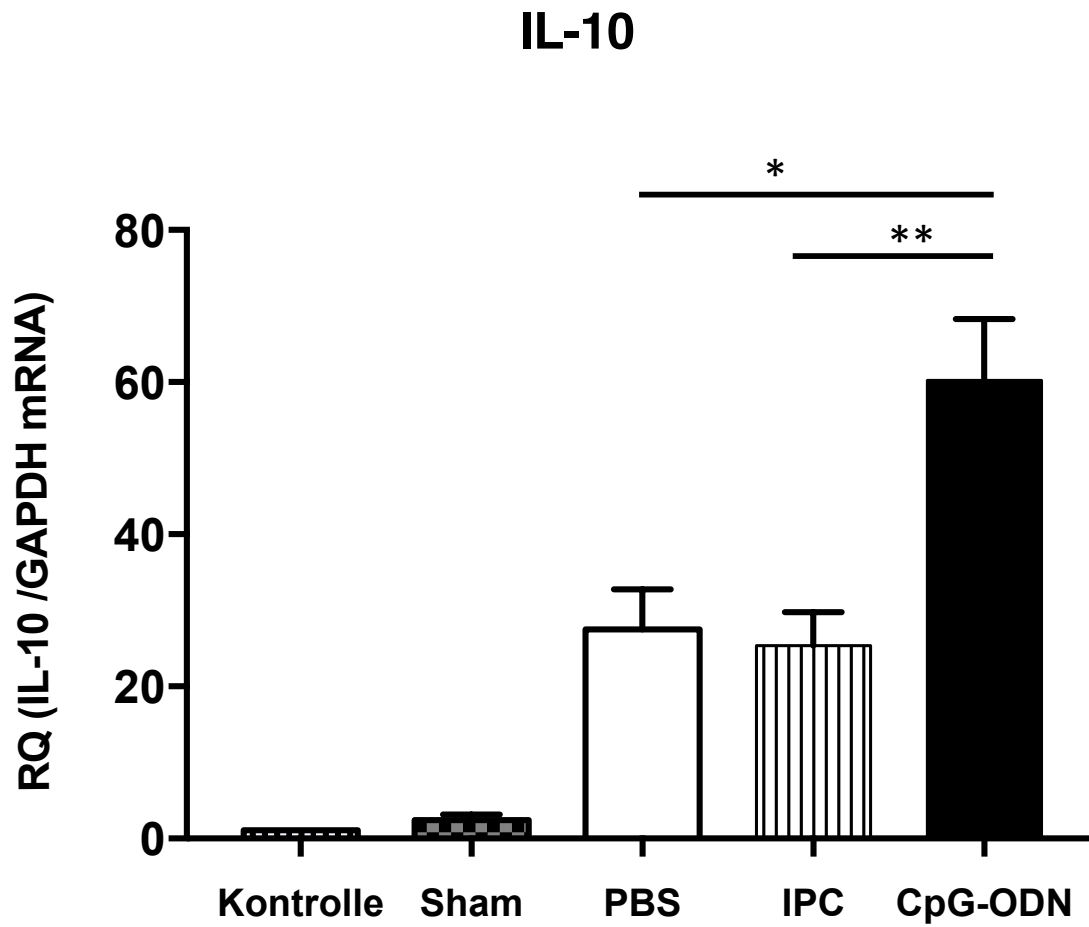


Abb. 17: mRNA-Expression der inflammatorischen Zytokine IL-10 in den Gruppen PBS, IPC und CpG-ODN. Als housekeeping Gen für die Berechnung des RQ wurde GAPDH verwendet. Die IL-10 Expression wurde durch die CpG-ODN Postkonditionierung 2,4-fach im Vergleich mit PBS und IPC erhöht. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$.

4. Diskussion

Die vorliegende Arbeit untersucht die Bedeutung des TLR9-Liganden CpG-Oligonukleotid für die myokardiale Postkonditionierung im murinen „closed chest“ Modell. Wir haben demonstriert, dass die Postkonditionierung mit CpG-ODN zur ausgeprägten Infarktreaktion führt. Das Ausmaß der Infarktreaktion war vergleichbar mit den Ergebnissen der ischämischen Postkonditionierung, die in der Literatur als der Goldstandard gilt. Die Postkonditionierung führte zu einer differenzierten Immunantwort im Myokard, die besonders in der CpG-Gruppe ausgeprägt war.

4.1 Einflüsse des Versuchsprotokolls auf die Infarktgröße

In der vorliegenden Arbeit wurde zum ersten Mal gezeigt, dass die Applikation von CpG-ODN im Rahmen von myokardialer Postkonditionierung zur Reduktion der Infarktgröße nach einer Ischämie führt.

Es wurden 3 verschiedene Versuchsprotokolle angewendet (Kapitel 2.2). Die 30 minütige Ischämiedauer wurde von mehreren Arbeitsgruppen bei den Post- und Präkonditionierungsversuchen verwendet und wurde in dieser Arbeit als Referenzischämiezeit gewählt (Boengler et al., 2008; Fisher and Marber, 2002; Lim et al., 2007; Michael et al., 1995). Um zu untersuchen, ob die kardioprotektive Wirkung von CpG-ODN und IPC durch die veränderte Indexischämiezeit beeinflusst werden kann, wurde ein weiteres Versuchsprotokoll mit längerer Ischämiezeit angewendet (Abb.4).

Die Infarktgröße nach 10-60 min Ischämie variiert in der Literatur zwischen 3,5 - 42% der AAR. Dreißig Minuten Ischämie führten zu Infarktgrößen von $18 \pm 5\%$ der AAR bei einer Reperfusionzeit von 2 h. (Eckle et al., 2006; Fisher und Marber, 2002; Redel et al., 2008). Indexischämiezeit, Reperfusionsdauer und die Infarktgrößen in der PBS-Gruppe in unserer Arbeit stimmten mit diesen Beobachtungen überein. Die Infarktausdehnung korreliert dabei eng mit der Ischämiedauer. Eine kurze Ischämiezeit von 10 min bei Hunden, Schweinen und Pavianen bewirkte eine vorübergehende myokardiale Kontraktilitätsstörung, die man auch myokardiales

stunning nennt. Diese Störung kam im Okklusionsgebiet vor, führte nicht zur Ausbildung eines Infarktes und wurde während der Reperfusionphase beobachtet (Shen and Vatner, 1996). Fünfzehn Minuten Ischämie löstenebenfalls keinen Infarkt mit makroskopischem Korrelat in einem Mausmodell aus (Cai et al., 2011).

Bei der Untersuchung wie unterschiedliche Ischämie- und Reperusionszeiten die Ausdehnung der Infarktgröße beeinflussen, definierten Redel et al. die optimale Ischämiezeit zwischen 30 und 45 min und bezeichneten es als den „submaximalen ischämischen Stimulus“. Bei einer Ischämiedauer innerhalb dieses Zeitfensters, war die Infarktgröße sowohl von der Ischämiezeit, als auch von der Reperusionsdauerabhängig (Redel et al., 2008). Diese Beobachtung konnten wir bestätigen und sahen bei einer Ischämie von 30 min und der Veränderung der Reperfusion von 2 h auf 24 h Reperfusion einen signifikanten Anstieg der Infarktgröße in der PBS-Gruppe. Diese Beobachtung stützt die Bedeutung des Reperusionsschadens, das sich zusätzlich zum Ischämieschaden negativ auf die Infarktausdehnung auswirkt. Durch die Postkonditionierung mit CpG-ODN oder IPC und einer Ischämie von 30 min konnte die Infarktzunahme sowohl nach 2 h als auch nach 24 h Reperfusion verhindert werden, was die kardioprotektive Potenz der Postkonditionierung verdeutlicht und den Einfluss der Postkonditionierung auf den Reperusionsschaden zeigt. Die kardioprotektive Potenz war jedoch stark von der Ischämiedauer abhängig.

Die Ausdehnung der Ischämie auf 60 min in dieser Arbeit hob den kardioprotektiven Effekt von CpG-ODN und IPC auf. Unsere Beobachtungen stimmen hier mit den Ergebnissen von Cai et al. überein. Die Arbeitsgruppe hat ebenfalls festgestellt, dass durch die Verlängerung der Indexischämiezeit von 30 min auf 60 min der kardioprotektive Effekt der IPC nicht mehr nachzuweisen war (Cai et al., 2011).

Die Gründe für das Versagen der Kardioprotektion durch die Postkonditionierung nach einer langen Ischämiezeit sind noch nicht hinreichend geklärt.

Cai et al. stellten fest, dass nach 60 min Ischämie der regionale Blutfluss im Infarktgebiet stark eingeschränkt blieb und die IPC keinen Einfluss mehr auf die postischämische Durchblutung nehmen konnte (Cai et al., 2011). Mehrere weitere Arbeitsgruppen konnten an unterschiedlichen Tiermodellen ebenfalls bestätigen, dass bei einer Indexischämiezeit von 60 min die Kardioprotektion durch die

Postkonditionierung aufgehoben ist (Eckle et al., 2006; Létienne et al., 2009; Schwartz and Lagranha, 2006b; Vinten-Johansen et al., 2005b).

Es ist nicht auszuschließen, dass aufgrund der stark eingeschränkten Durchblutung nach einer prolongierten Ischämie die schrittweise Wiederherstellung der Zirkulation, des pH-Wertes und des Elektrolythaushaltes im Ischämiegebiet nicht mehrmöglich ist, obwohl eine IPC durchgeführt wurde. Die fehlende Wirksamkeit von CpG-ODN nach 60 min Ischämie könnte ebenfalls durch die fehlende Wiederherstellung der Durchblutung in Zusammenhang stehen.

Der Wirkungsverlust der Postkonditionierung nach 60 min Ischämie könnte auch dadurch entstehen, dass mehr Zellen unwiderruflich nekrotisch wurden (Eefting et al., 2004). Redel et al. stellte eine Hypothese auf, dass bei 60 min Ischämie der Zelluntergang vorrangig durch Nekrose stattfindet (Redel et al., 2008). So sind nach 60 min Ischämie weniger Zellen, die von der Postkonditionierung profitieren, da es weniger vitales Gewebe gibt. Mit verlängerter Ischämiezeit nimmt auch die Nekrose bedingte Freisetzung von intrazellulären Bestandteilen zu, mit konsekutiver Stimulierung der Inflammation und Schädigung benachbarter Zellen und somit weiterer Ausdehnung des Infarktgebietes (Efting et al., 2004). Nach 60 min Ischämie war die Mortalität bei den Versuchstieren sehr hoch und das deutet darauf hin, dass die Postkonditionierung nach einer prolongierten Ischämie nicht mehr wirksam ist. Eckel et al. stellten fest, dass eine Infarktgröße von 50% der AAR noch überlebt wird. Bei größeren Infarkten überleben die Versuchstiere oft nicht bis zum Ende der Reperfusion und der Effekt der Postkonditionierung kann nicht erfasst werden (Eckle et al., 2006).

Von den Nekrosevorgängen während der Ischämie sollte die Apoptose pathophysiologisch getrennt betrachtet werden. Redel et al. stellten fest, dass bei einer Ischämiedauer von 60 min die Apoptoseprozesse eine untergeordnete Rolle spielen und Zellen vor allem nekrotisch werden (Redel et al., 2008). Wir haben in der vorliegenden Arbeit die Prozesse, die für den Zelltod verantwortlich sind nicht untersucht. Weitere Studien zur Untersuchung der Apoptoseprozesse in Abhängigkeit von der Ischämiedauer müssen noch durchgeführt werden, um zu klären, wieso nach einer bestimmten Ischämiedauer die Postkonditionierung nicht mehr wirksam ist und ob Apoptosevorgänge dabei eine Rolle spielen.

Bei einer Ischämiedauer, die dem „submaximalen ischämischen Stimulus“ entspricht, könnte es möglich sein, dass ein großer Teil der Zellen, die sich noch im Initialstadium der Apoptose befinden, auf postkonditionierende Stimuli reagieren und so Myokardgewebe gerettet werden kann. In diesen Prozess greift die Postkonditionierung ein und kann somit kardioprotektiv wirken (Etling et al., 2004).

Weiterhin bestimmt die Dauer der Reperfusion die Infarktgröße. Eckle et al. zeigten, dass die Ausdehnung der Reperfusion von 30 auf 120 min bei gleichbleibender Ischämiedauer zu einer Zunahme der Infarktgröße führt. Eine Reperfusion von 240 min bewirkte keine weitere Vergrößerung (Eckle et al., 2006).

In der vorliegenden Arbeit konnten wir zeigen, dass bei 30 min Ischämie die Ausdehnung der Reperfusion von 2 auf 24 h zu einem signifikanten Anstieg der Infarktgröße in allen Gruppen führte. Eine ausreichend lange Reperusionszeit trägt maßgeblich dazu bei, dass noch intaktes NADH aus dem infarzierten Myokardgewebe komplett ausgewaschen wird und so die valide Demarkierung der Infarktzone durch die TTC Färbung sichergestellt wird. Die in dieser Arbeit angewandte Reperusionszeit von 2 h reichte hinlänglich aus, um die Infarktgröße verlässlich planimetrisch beurteilen zu können. Bei zu kurzer Reperusionszeit würden sich die Infarkte fälschlicherweise kleiner darstellen, da absterbende Zellen noch Reste vom NADH hätten (Ito et al., 1997). Eckle et al. sahen nach 60 min Ischämie und 2h bzw. 4 h Reperfusion keine weitere Zunahme der IS, so dass die Reperusionszeit mindestens 2 h betragen muss, um die Infarktgröße mittels der TTC-Färbung valide zu bestimmen (Eckle et al., 2006). Andere Laboratorien konnten ebenfalls bestätigen, dass 2 h ausreichend sind, um mit Hilfe der TTC-Färbung die Infarktgröße valide zu bestimmen (Boengler et al., 2008; Chong et al., 2004; Lim et al., 2007). Wir konnten bestätigen, dass nach 30 min Ischämie und 24h Reperfusion die Infarktgröße auf Grund der voranschreitenden Myokardnekrose expandiert. Ohne Postkonditionierung führte die Verlängerung der Reperusionszeit in der PBS-Gruppe in unserer Arbeit zu einem signifikant größeren Infarkt. Da wir im Vergleich zu Eckle et al. zu einem späteren Reperusionszeitpunkt die Infarktgröße bestimmt haben, können wir nicht mit Sicherheit sagen, wann während der Reperusionsphase die Infarktausbreitung abgeschlossen ist. Wieso die Verlängerung der Reperfusion bei gleichbleibender Ischämie zu einer Zunahme der Infarktgröße führt ist nicht

abschließend geklärt. Mit der Dauer der Reperfusion scheint aber die inflammatorische Komponente zuzunehmen. Während der I/R-Versuche an Katzen konnte Tsao et al. zeigen, dass mit der Zunahme der Reperfusionsdauer die Endothelfunktion stark abnimmt (Tsao and Lefer, 1990). Es ist bekannt, dass die Verschlechterung der Endothelfunktion zu neutrophiler Infiltration führt, die von der Dauer der Reperfusion abhängt und die Inflammation verstärkt (Engler et al., 1986; Hearse and Bolli, 1992; Horwitz et al., 1994). Ohne Reperfusion kommt es laut Reimer et al. erst nach 12 bis 24 h zu einer Infiltration neutrophiler Granulozyten, die nach 2 bis 4 Tagen ihren Höhepunkt erreicht (Reimer et al., 1989). Tsao et al. stellten fest, dass bei sehr kurzer Reperusionszeit erst wenige neutrophile Granulozyten ins ischämische Gewebe einwanderten und dementsprechend weniger Zellschädigung auslösten. Eine längere Reperusionszeit hingegen war mit vermehrter Infiltration neutrophiler Granulozyten assoziiert und führte so zur Inflammation (Tsao et al., 1990). Redel et al. konnten diese Beobachtung reproduzieren und haben gezeigt, dass eine verlängerte Reperfusion zur vermehrten Infiltration von Leukozyten führt (Redel et al., 2008).

Im Gegensatz dazu haben Dreyer et al. festgestellt, dass die Akkumulation der Neutrophilen in der AAR in den ersten Stunden der Reperfusion stattfindet (Dreyer et al., 1991). Frangiogannis et al. zeigten, dass durch die Reperfusion aktivierte Mastzellen vor allem in der ersten Stunde Histamine und TNF- α freisetzen. TNF- α begünstigte wiederum die Infiltration von mononuklearen Zellen in das Myokardgewebe (Frangogiannis et al., 1998b). Es wird hier deutlich, dass der ischämischen Schädigung eine Immunreaktion folgt, die von der Reperfusionsdauer abhängig ist. Die genaue zeitliche Abfolge des Reperfusionsschadens durch die Inflammation ist unklar und muss weiter untersucht werden. Die beste Kardioprotektion bleibt die so früh wie möglich wiederhergestellte Perfusion des ischämischen Myokards.

4.2 Die Bedeutung des TLR9 Ligand CpG-ODN nach I/R

4.2.1 Die Bedeutung des TLR9 Ligand CpG-ODN für die Infarktgröße

Die Funktion und Struktur des TLR9 Ligand CpG-ODN ist im Kapitel 2.1.2 ausführlich dargestellt worden. Die Daten in dieser Arbeit belegen die kardioprotektive Wirkung von CpG-ODN bezogen auf die Infarktgröße nach myokardialer I/R.

CpG-ODN konnte im Rahmen der Postkonditionierung nach 30 min Ischämie eine fast 90% Infarktreduktion gegenüber der Kontrollgruppe PBS nach 2 h Reperfusion erzielen. Diese Daten belegen zum ersten Mal die kardioprotektive Wirkung synthetischer CpG-ODN im Rahmen einer Postkonditionierung nach I/R. Auch nach 24 h Reperfusion war die Infarktgröße fast 70% kleiner im Vergleich zu unserer Kontrollgruppe.

Präkonditionierungsversuche mit dem Klasse B CpG-ODN von Cao et al. zeigten nach 60 min Ischämie eine Infarktreduzierung von 31,4% und eine verbesserte Herzfunktion nach 3 und 14 Tage nach Ischämie (Cao et al., 2013a). Weiterhin zeigen Ergebnisse aus den Präkonditionierungsversuchen unserer Arbeitsgruppe ebenfalls, dass die Gabe von CpG-ODN 16 h vor einer 60 minütigen Ischämie eine Infarktgrößenreduzierung von 75% im Vergleich zur Kontrollgruppe bewirkte (Markowski et al., 2013b). Diese Resultate konnten wir nach 60 min Ischämie und Postkonditionierung mit CpG nicht reproduzieren. In der vorliegenden Arbeit hob die Verlängerung der Ischämiedauer auf 60 min den postkonditionierenden Effekt von CpG-ODN auf. Es ist nicht klar, wieso die Postkonditionierung mit CpG-ODN im Vergleich zur Präkonditionierung nach einer längeren Ischämie nicht mehr wirksam ist. Markowski et al. stellten fest, dass das antiinflammatorische IL-10 bis zum Beginn der Ischämie hochreguliert war und dadurch möglicherweise eine kardioprotektive Wirkung während und nach der Ischämie ausgeübt hat (Markowski et al., 2013b). Diese Protektion fehlt im Rahmen der Postkonditionierungsversuche und könnte die fehlende Wirkung der CpG Postkonditionierung nach 60 min Ischämie erklären. Weiterhin führte die Präkonditionierung mit CpG-ODN zur Hochregulation bestimmter Signalstoffe wie INF- γ und TNF- α . Für beide Proteine wurden protektive Eigenschaften im Rahmen der Ischämie/Reperfusion beobachtet (Markowski et al., 2013b; Stevens et al., 2011; Belosjorow et al., 1999; Kin et al., 2008). In unserer Arbeit verwendeten wir Versuchstiere, die keine Vorbehandlung erhielten und somit

keine Kardioprotektion während der Ischämie hatten. Die unterschiedlichen Ergebnisse können auch damit erklärt werden, dass in der Arbeit von Cao et al. das „open chest“-Modell verwendet und anstatt 1668 Thioat 1626 Thioat appliziert wurde. Weiterhin verzichteten wir für die I/R-Versuche auf Isofluran, da es nachgewiesenermaßen kardioprotektive Eigenschaften besitzt (Ge et al., 2010).

Interessant scheint aber auch die Beobachtung, dass nach einer Stunde Ischämie in der IPC-Gruppe im Vergleich mit der CpG-Gruppe größere Infarkte gemessen wurden. Der Unterschied ist jedoch nicht signifikant und weitere Untersuchungen sind notwendig, um eine Überlegenheit der Postkonditionierung mit CpG in Vergleich mit der IPC nach einer längeren Ischämiedauer zu zeigen.

Wie Vorarbeiten aus unserer Arbeitsgruppe zeigten, ist die Wirkung der CpG-ODN stark konzentrationsabhängig. Bei einer Dosis von 0,5 – 1nmol/gKG 1668 Thioat überwogen systemische Nebenwirkungen und es resultierte eine erhöhte Sterblichkeit der Versuchstiere (Knuefermann et al., 2008; Sparwasser et al., 1997). Bei zu niedriger Konzentration ergab sich jedoch kein Einfluss auf die Infarktgröße. Wir applizierten aus diesem Grund 20% der Dosis, die in den Vorarbeiten eine klinische Sepsis bei den Versuchstieren hervorgerufen hatte (Knuefermann et al., 2008; Velten et al., 2012).

4.3 Zytokine und ihre Bedeutung für den I/R Schaden

Der I/R-Schaden führt zu einer überschießenden Immunantwort. Durch die Verwendung des „closed chest“ Modells ist es möglich die Zytokinexpression zu analysieren, die nur durch die I/R verursacht wurden und nicht durch das Trauma der Instrumentierung. Die Stimulation mit CpG-ODN führte zu einer robusten myokardialen Expression aller gemessenen Zytokine. Insbesondere waren TNF- α , IL-6 und IL-10 im Vergleich zu der mit PBS behandelten Gruppe erhöht. Diese Beobachtung wurden von vorausgegangenen Studien aus unserer Arbeitsgruppe bestätigt. Dabei führt die Stimulation mit CpG-ODN in isolierten Kardiomyozyten zur robusten Freisetzung von TNF- α , IL-6 und IL-1 β (Knuefermann et al., 2008). Ähnliche Ergebnisse konnten auch in vivo gezeigt werden (Markowski et al., 2013a).

Die CpG-ODN Stimulation führte in unserer Arbeit zu einem robusten Anstieg der TNF- α -Konzentration. Es ist bekannt, dass TNF- α sowohl zu einer reversiblen kontraktile und endothelialen Dysfunktion beiträgt, als auch zu einem irreversiblen Reperfusionsschaden führt. Es gibt jedoch zunehmend Hinweise, dass TNF- α kardioprotektiv wirkt (Gilles et al., 2003; Schulz, 2008; Teoh et al., 2003). Lacerda et al. konnten auch zeigen, dass die Gabe von TNF- α eine Infarktreaktion bewirkt und die Wirkung über den SAFE-Signalweg vermittelt wird (Lacerda et al., 2008). Weiterhin wurde in der Arbeit die Kardioprotektion der ischämischen Postkonditionierung bei TNF- α -/- am Herzen aufgehoben (Lacerda et al., 2009). Der im Kapitel 3.5.1.2 beschriebene SAFE-Signalweg scheint neben dem klassischen RISK-Signalweg ein weiterer potenter Vermittler der Kardioprotektion zu sein.

Interessanterweise scheint TNF- α nicht nur kardial protektiv zu sein. Stevens et al. konnten zeigen, dass eine Präkonditionierung mit CpG-ODN nach cerebraler I/R eine Infarktreaktion bewirkt und ebenfalls zum Anstieg des TNF- α führt. Bei TNF- α -/- Mäusen konnte die Arbeitsgruppe keine Infarktreaktion mehr reproduzieren. TNF- α abhängige Neuroprotektion wurde auch nach LPS-Präkonditionierung gesehen, was die Bedeutung von TNF- α für den I/R-Schaden unterstreicht und auf die Möglichkeit eines gemeinsamen Signalweges hindeutet (Rosenzweig et al., 2007; Stevens et al., 2008).

Es stellt sich die Frage, wieso TNF- α gleichzeitig schädigende aber auch protektive Eigenschaften vermittelt. Mehrere Arbeitsgruppen zeigten, dass die Reduktion der TNF- α Expression durch die ischämische Prä- und Postkonditionierung kardioprotektiv wirkt (Belosjorow et al., 1999; Kin et al., 2008). Andere Studien belegten, dass TNF- α in niedrigen Konzentration kardioprotektiv wirkt, in höheren Konzentration hingegen schädigend (Lecour et al., 2005b, 2002). Lacerda et al. (2008) konnten an isolierten Mausherzen zeigen, dass IPC an TNF- α -/- Mäusen unwirksam war und erst die Gabe von TNF- α 24 h vor I/R die Kardioprotektion der IPC wiederherstellt (Lacerda et al., 2008). Die genaue Bedeutung von TNF- α bleibt noch unklar und muss in weiteren Experimenten weiter erforscht werden.

Die Expression von IL-1 β war in der CpG-ODN Gruppe ebenfalls hoch reguliert und zeigte einen signifikanten Unterschied zu der IPC-Gruppe. Es ist bisher nicht geklärt, ob IL-1 β zur Kardioprotektion beiträgt. Die proinflammatorische Wirkung ist jedoch

belegt und IL-1 β -/- Tiere zeigten eine verminderte inflammatorische Reaktion auf eine Ischämie (Furuichi et al., 2006; Wanderer, 2008). Eine interessante Arbeit von Souza et al. (2003) zeigt, dass die Blockade von IL-1 β den intestinalen Reperfusionsschaden verringert. Dabei stellte die Arbeitsgruppe fest, dass nach IL-1 β Inhibition die TNF- α Expression reduziert wurde und es zur Erhöhung des antiinflammatorischen IL-10 kam (Souza et al., 2003). Diese Daten wurden jedoch nicht im Rahmen der myokardialen I/R überprüft und wären zukünftig noch zu untersuchen.

Die Postkonditionierung mit CpG-ODN führt zu einer signifikant höheren Expression von IL-6 in der CpG-ODN-Gruppe verglichen mit der PBS-Gruppe. Der Unterschied zur IPC-Gruppe ist nicht signifikant. Es wurden sowohl pro-, als auch antiinflammatorische Effekte von IL-6 nachgewiesen. Gonzales et al. zeigten, dass die Abwesenheit von IL-6 die Entwicklung von kardialer Dysfunktion, Fibrose und myokardialer Inflammation abwendet (González et al., 2015). Zusätzlich vermochte IL-6 als ein Akut-Phase-Zytokin die Bildung von Akut-Phase-Proteinen in der Leber anzuregen mit dem Ziel der Begrenzung und Verhinderung der Ausbreitung der Inflammation. Mizuhara et al. haben gezeigt, dass IL-6 in niedriger Dosierung die TNF- α Produktion in der Leber reduziert und so eine T-Zell vermittelte Immunreaktion im Rahmen einer Hepatitis abschwächt (Mizuhara et al., 1994). IL-6 schwächt den I/R Schaden in der Leber, indem es ebenfalls die TNF- α Bildung reduziert (Camargo et al., 1997). Sanchez et al. (2003) zeigten dies für die retinale I/R (Sanchez et al., 2003). Diese Effekte wurden bisher nicht für den myokardialen I/R-Schaden untersucht und könnten einen interessanten Ansatz für weitere Experimente liefern.

Bei IL-10 handelt es sich um ein antiinflammatorisches Zytokin. Wir konnten in der CpG-ODN-Gruppe die höchste Expression verglichen mit IPC und PBS nachweisen. Präkonditionierungsstudien aus unserer Arbeitsgruppe konnten eindeutig zeigen, dass IL-10 kardioprotektiv wirkt und die Blockade mit einem spezifischen IL-10 Antikörper den kardioprotektiven und antiinflammatorischen Effekt aufhebt (Markowski et al., 2013a). Krishnamurthu et al. konnten im Mausmodell zusätzlich zeigen, dass die subkutane Gabe von IL-10 nach I/R zu einer verbesserten Herzfunktion, Infarktreaktion führt und die Bildung eines Herzwandaneurysmas

verhindert. Weiterhin waren in der Arbeit die proinflammatorischen Zytokine nach IL-10 Gabe reduziert (Krishnamurthy et al., 2009b).

Die Ergebnisse in unserer Arbeit deuten daraufhin, dass IL-10 ein Gegengewicht zu den proinflammatorischen Zytokinen bildet. Welche Mechanismen genau die Kardioprotektion vermittelt, muss noch weiter geklärt werden.

Die positive Beeinflussung der Remodellingprozesse durch die Reduktion proinflammatorischer Zytokine scheint eine wichtige Rolle zu spielen (Y. Li et al., 2006; Mayer et al., 2005). Yang et al. zeigten ebenfalls, dass IL-10 nach I/R endogen produziert wird und dadurch die Infiltration von Immunzellen in das Ischämiegebiet reduziert wird (Yang et al., 2000).

4.4 „Closed Chest“Modell

Aufgrund wissenschaftlicher, ethischer und wirtschaftlicher Kriterien und nicht zuletzt wegen der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse wurde in dieser Arbeit ein Mausmodell verwendet. Die Erfahrung unserer Arbeitsgruppe im Umgang mit den Versuchstieren spielte ebenso eine entscheidende Rolle bei der Wahl des Modells.

Die Herzanatomie der Maus ähnelt v.a. im Ventrikelsystem und dem Koronarsystem dem menschlichen Herz, so dass pathophysiologische Vorgänge gut simuliert und analysiert werden können (Doevendans et al., 1998; Thüroff et al., 1984; Webb et al., 1996). Es ist jedoch einleuchtend, dass die Ergebnisse aus den Tierversuchen nicht ohne weiteres auf den Menschen übertragbar sind. Die Gründe hierfür sind vielfältig und beruhen meist darauf, dass im kranken und alterndem Organismus des Menschen viele Faktoren gleichzeitig die Pathophysiologie beeinflussen. Im Tiermodell jedoch sind die Umweltbedingungen kontrollierbar und die Einflussfaktoren können gering gehalten werden.

Für die Durchführung der Ischämie und Reperfusion wurde in dieser Arbeit ein modifiziertes murines „closed chest“ Modell verwendet. Diese Methode wurde initial von Nossuli et al. etabliert (Nossuli et al., 2000). Sie erlaubt jederzeit nach der Instrumentierung die Durchführung der I/R-Versuche. Hierdurch ist die Analyse der systemischen und myokardialen Inflammation nach I/R unabhängig vom operativen Trauma möglich und wird nicht von der Inflammation nach der Initialoperation

verfälscht (Nossuli et al, Dewald et al., 2003; S.-C. Kim et al., 2014). Vorarbeiten aus unserer Arbeitsgruppe zeigen auch, dass 3-4 Tage nach der Instrumentierung die Zytokinspiegel vergleichbar mit den Sham-operierten Tieren sind.

Weiterhin führten wir im Gegensatz zu anderen Arbeitsgruppen (Nossuli et al., 2000) eine laterale Thorakotomie durch. Hierbei wurde zur Minimierung des chirurgischen Traumas auf die Durchtrennung der parasternalen Rippen verzichtet. Die seitliche Thorakotomie schont die linke A. mammaria interna. So kam es zu keinen relevanten Blutungen. Weiterhin ermöglicht das freie Intervall zwischen Instrumentierung und I/R die Verwendung volatiler Anästhetika und Opioiden, für die prä- und postkonditionierende Eigenschaften nachgewiesen wurden. Die kardioprotektiven Effekte der Narkosegase und der Opiate sind von limitierter Dauer und zu Beginn der I/R nicht mehr nachweisbar (Tonkovic-Capin et al., 2002).

Das in dieser Arbeit verwendete Modell ist durch das 5-tägige freie Intervall jedoch zeit- und pflegeintensiver. In diesem freien Intervall verstarben vereinzelt Versuchstiere, oder entwickelten Wundinfektionen, die zum Ausschluss des Versuchstieres aus demnachfolgenden Experimenten führten.

5. Zusammenfassung

Das angeborene Immunsystem und die Familie der Toll-like Rezeptoren spielen eine entscheidende Rolle bei der Entstehung des I/R-Schadens. In der vorliegenden Arbeit haben wir die Bedeutung der bakteriellen DNA für den myokardialen Reperfusionsschaden untersucht. Besonderes Interesse wurde der Frage gewidmet, ob durch die Applikation des TLR9-Liganden CpG-ODN eine Kardioprotektion im Sinne einer Postkonditionierung möglich ist. Der TLR9 ist für die Erkennung von bakterieller DNA zuständig, die spezielle Sequenzen, sogenannte CpG-Motive beinhaltet. In der vorliegenden Arbeit wurde der postkonditionierende Effekt anhand der Infarktgröße und der veränderten myokardialen Zytokinexpression bestimmt und quantifiziert.

Bei der Initialoperation wurde ein Okkluder auf die LAD platziert. Im Rahmen des „closed chest“ Modells erfolgte die Ischämie erst nach einer Rekonvaleszenzphase von 5 Tagen. Nach 30 min bzw. 60 min Ischämie und 2 h bzw. 24 h Reperfusion wurden die Herzen entnommen und die Infarkte planimetrisch vermessen. Fünf Minuten vor Ischämieende wurde mit dem TLR9-Liganden CpG-ODN und separat mit der Kontrollösung PBS postkonditioniert. Weiterhin wurde unmittelbar vor der Reperfusion eine ischämische Postkonditionierung mit 3 Zyklen je 20 Sekunden durchgeführt.

Um die Auswirkungen der Postkonditionierung mit CpG-ODN auf das angeborene Immunsystem im Mausherz zu untersuchen, wurde in einem separaten Versuchsarm nach 30 min Ischämie und 2 h Reperfusion die Expression sowohl pro- als auch antiinflammatorischer Zytokine im Mausherz bestimmt.

Es kam nach der Postkonditionierung mit CpG-ODN zur ausgeprägten Infarktreaktion im Vergleich zu unserer Kontrollgruppe (PBS). Das Ausmaß der Infarktreaktion war vergleichbar mit den Ergebnissen der ischämischen Postkonditionierung, die in der Literatur als der Goldstandard gilt. Die Verlängerung der Ischämiezeit hob den kardioprotektiven sowohl von CpG-ODN als auch der ischämischen Postkonditionierung auf. Die Postkonditionierung führte zu einer differenzierten Immunantwort im Myokard, die besonders in der CpG-Gruppe im Vergleich zu PBS und IPC ausgeprägt war. Hier imponierte die Expression des antiinflammatorischen Zytokins IL-10.

Die Resultate der vorliegenden Arbeit demonstrieren zum ersten Mal die kardioprotektive Potenz des TLR9-Liganden CpG-ODN im Rahmen der myokardialen Postkonditionierung. Da eine Postkonditionierung mit CpG im klinischen Alltag leicht zu etablieren ist, könnte sie in der Zukunft einen wichtigen therapeutischen Ansatz in der Behandlung des Herzinfarktes und des Reperfusionsschades liefern.

6. Literaturverzeichnis

Ahmad-Nejad P, Häcker H, Rutz M, Bauer S, Vabulas RM, Wagner H. Bacterial CpG-DNA and lipopolysaccharides activate Toll-like receptors at distinct cellular compartments. *Eur J Immunol* 2002; 32: 1958–1968

Akira S, Takeda K, Kaisho T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol* 2001; 2: 675–680

Akira S, Yamamoto M, Takeda K. Role of adapters in Toll-like receptor signalling. *Biochem Soc Trans* 2003; 31: 637–642

Anderson KV, Bokla L, Nüsslein-Volhard C. Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: the induction of polarity by the Toll gene product. *Cell* 1985; 42: 791–798

Baines CP, The Cardiac Mitochondrion: Nexus of Stress. *Annual Review of Physiology* 2010; 72: 61–80

Balija TM, Lowry SF. Lipopolysaccharide and sepsis-associated myocardial dysfunction. *Curr Opin Infect Dis* 2011; 24: 24–253

Bartling B, Holtz J, Darmer D. Contribution of myocyte apoptosis to myocardial infarction? *Basic Res Cardiol* 1998; 93: 71–84

Bauer S, Kirschning CJ, Häcker H, Redecke V, Hausmann S, Akira S, Wagner H, Lipford GB. Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition. *PNAS* 2001; 98: 9237–9242

Beeson PB. Tolerance to bacterial pyrogen. *J Exp Med* 1947; 86: 29–38

Belosjorow S, Schulz R, Dörge H, Schade FU, Heusch G. Endotoxin and ischemic preconditioning: TNF- α concentration and myocardial infarct development in rabbits. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 1999; 277: 2470–2475

Bienvenu K, Granger DN. Molecular determinants of shear rate-dependent leukocyte adhesion in postcapillary venules. *Am J Physiol* 1993; 264: 1504–1508

Boehm O, Knuefermann P, Plueck J, Schwederski M, Ehrentraut H, Kebir S, Lohner R, Velten M, Morath S, Koch A, Zacharowski K, Grohe C, Hoefft A, Baumgarten G, Meyer R. TLR2 stimulation induces cardiac inflammation but not cardiac depression in vivo. *J Inflamm Lond* 2013; 10: 33

Boehm O, Markowski P, van der Giet M, Gielen V, Kokalova A, Brill C, Hoefft A, Baumgarten G, Meyer R, Knuefermann P. In Vivo TLR9 Inhibition Attenuates CpG-Induced Myocardial Dysfunction. *Mediators Inflamm* 2013; 217297: 1–9

Boengler K, Buechert A, Heinen Y, Roeskes C, Hilfiker-Kleiner D, Heusch G, Schulz R. Cardioprotection by Ischemic Postconditioning Is Lost in Aged and STAT3-Deficient Mice. *Circulation Research* 2008; 102: 131–135

Bohl S, Medway DJ, Schulz-Menger J, Schneider JE, Neubauer S, Lygate CA. Refined approach for quantification of in vivo ischemia-reperfusion injury in the mouse heart. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 2009; 297: 2054–2058

Boyd JH, Mathur S, Wang Y, Bateman RM, Walley KR. Toll-like receptor stimulation in cardiomyocytes decreases contractility and initiates an NF- κ B dependent inflammatory response. *Cardiovascular Research* 2006; 72: 384–393

Bujak M, Dobaczewski M, Chatila K, Mendoza LH, Li N, Reddy A, Frangogiannis NG. Interleukin-1 Receptor Type I Signaling Critically Regulates Infarct Healing and Cardiac Remodeling. *Am J Pathol* 2008; 173: 57–67

Cai M, Li Y, Xu Y, Swartz HM, Chen CL, Chen YR, He G. Endothelial NOS activity and myocardial oxygen metabolism define the salvageable ischemic time window for ischemic postconditioning. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 2011; 300: 1069–1077

Camargo CA, Madden JF, Gao W, Selvan RS, Clavien P. Interleukin-6 protects liver against warm ischemia/reperfusion injury and promotes hepatocyte proliferation in the rodent. *Hepatology* 1997; 26: 1513–1520

Cantley LC. The Phosphoinositide 3-Kinase Pathway. *Science* 2002; 296: 1655–1657

Cao Z, Danyang Ren, Ha T, Liu L, Wang X, Kalbfleisch J, Gao X, Kao R, Williams D, Li C. CpG-ODN, the TLR9 agonist, attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury: involving activation of PI3K/Akt signaling. *Biochim Biophys Acta* 2013a; 1832: 96–104

Cao Z, Ren D, Ha T, Liu L, Wang X, Kalbfleisch J, Gao X, Kao R, Williams D, Li C. CpG-ODN, the TLR9 agonist, attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury: Involving activation of PI3K/Akt signaling. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 2013b; 1832: 96–104

Celes MRN, Prado CM, Rossi MA. Sepsis: going to the heart of the matter. *Pathobiology* 2013; 80: 70–86

Chao W. Toll-like receptor signaling: a critical modulator of cell survival and ischemic injury in the heart. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 2009; 296: 1–12

Chien GL, Wolff RA, Davis RF, van Winkle DM. "Normothermic range" temperature affects myocardial infarct size. *Cardiovasc Res* 1994; 28: 1014–1017

Chong AJ, Shimamoto A, Hampton CR, Takayama H, Spring DJ, Rothnie CL, Yada M, Pohlman TH, Verrier ED. Toll-like receptor 4 mediates ischemia/reperfusion injury of the heart. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 2004; 128: 170–179

Cleutjens JPM, Kandala JC, Guarda E, Guntaka RV, Weber KT. Regulation of collagen degradation in the rat myocardium after infarction. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 1995; 27: 1281–1292

Cohen MV, Downey JM. Signaling Pathways and Mechanisms of Protection in Pre- and Postconditioning: Historical Perspective and Lessons for the Future. *Br J Pharmacol* 2014; 172: 1913–1932

Cohen MV, Yang XM, Downey JM. The pH Hypothesis of Postconditioning Staccato Reperfusion Reintroduces Oxygen and Perpetuates Myocardial Acidosis. *Circulation* 2007; 115: 1895–1903

Cohn JN, Ferrari R, Sharpe N. Cardiac remodeling—concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. *Journal of the American College of Cardiology* 2000; 35: 569–582

Crawford MH, Grover FL, Kolb WP, McMahan CA, O'Rourke RA, McManus LM, Pinckard RN. Complement and neutrophil activation in the pathogenesis of ischemic myocardial injury. *Circulation* 1988; 78: 1449–1458

Cross TG, Scheel-Toellner D, Henriquez NV, Deacon E, Salmon M, Lord JM. Serine/Threonine Protein Kinases and Apoptosis. *Experimental Cell Research* 2000; 256: 34–41

Cunha RE, Schaer GL, Parker MM, Natanson C, Parrillo JE. The coronary circulation in human septic shock. *Circulation* 1986; 73: 637–644

Desmoulière A, Geinoz A, Gabbiani F, Gabbiani G. Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *J Cell Biol* 1993; 122: 103–111

Di Lisa F, Bernardi P. A CaPful of mechanisms regulating the mitochondrial permeability transition. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology, Mitochondria Special Issue: From Basic Mitochondrial Biology to Cardiovascular Disease* 2009; 46: 775–780

Doevendans PA, Daemen MJ, Muinck ED, de Smits JF. Cardiovascular phenotyping in mice. *Cardiovascular Research* 1998; 39: 34–49

Dreyer WJ, Michael LH, West MS, Smith CW, Rothlein R, Rossen RD, Anderson DC, Entman ML. Neutrophil accumulation in ischemic canine myocardium. Insights into time course, distribution, and mechanism of localization during early reperfusion. *Circulation* 1991; 84: 400–411

Eckle T, Grenz A, Köhler D, Redel A, Falk M, Rolauffs B, Osswald H, Kehl F, Eltzschig HK. Systematic evaluation of a novel model for cardiac ischemic preconditioning in mice. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 2006; 291: 2533–2540

Eefting F, Rensing B, Wigman J, Pannekoek WJ, Liu WM, Cramer MJ, Lips DJ, Doevendans PA. Role of apoptosis in reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 2004; 61: 414–426

Eguchi S, Hirata Y, Imai T, Marumo F. Endothelin receptor subtypes are coupled to adenylate cyclase via different guanyl nucleotide-binding proteins in vasculature. *Endocrinology* 1993; 132: 524–529

Engler RL, Dahlgren MD, Morris DD, Peterson MA, Schmid-Schönbein GW. Role of leukocytes in response to acute myocardial ischemia and reflow in dogs. *Am J Physiol* 1986; 251: 314–323

Engler RL, Schmid-Schonbein GW, Pavelec RS. Leukocyte capillary plugging in myocardial ischemia and reperfusion in the dog. *Am J Pathol* 1983; 111: 98–111

Favaretto E, Roffi M, Frigo AC, Lee MS, Marra MP, Napodano M, Tarantini G. Meta-analysis of randomized trials of postconditioning in ST-elevation myocardial infarction. *Am J Cardiol* 2014; 114: 946–952

Feng JMD, Lucchinetti EPD, Ahuja P, Pasch TMD, Perriard J-CPD, Zaugg MMD. Isoflurane Postconditioning Prevents Opening of the Mitochondrial Permeability Transition Pore through Inhibition of Glycogen Synthase Kinase 3[β]. *Anesthesiology* November 2005 2005; 103: 987–995

Fisher SG, Marber MS. An in vivo model of ischaemia–reperfusion injury and ischaemic preconditioning in the mouse heart. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 2002; 48: 161–169

Frangogiannis NG. Regulation of the Inflammatory Response in Cardiac Repair. *Circulation Research* 2002; 110: 159–173

Frangogiannis NG, Lindsey ML, Michael LH, Youker KA, Bressler RB, Mendoza LH, Spengler RN, Smith CW, Entman ML. Resident Cardiac Mast Cells Degranulate and Release Preformed TNF- α , Initiating the Cytokine Cascade in Experimental Canine Myocardial Ischemia/Reperfusion. *Circulation* 1998a; 98: 699–710

Frangogiannis NG, Lindsey ML, Michael LH, Youker KA, Bressler RB, Mendoza LH, Spengler RN, Smith CW, Entman ML. Resident Cardiac Mast Cells Degranulate and Release Preformed TNF- α , Initiating the Cytokine Cascade in Experimental Canine Myocardial Ischemia/Reperfusion. *Circulation* 1998b; 98: 699–710

Frangogiannis NG, Mendoza LH, Lindsey ML, Ballantyne CM, Michael LH, Smith CW, Entman ML. IL-10 Is Induced in the Reperfused Myocardium and May Modulate the Reaction to Injury. *J Immunol* 2000; 165: 2798–2808

Frantz S, Kobzik L, Kim YD, Fukazawa R, Medzhitov R, Lee RT, Kelly RA. Toll4 (TLR4) expression in cardiac myocytes in normal and failing myocardium. *J Clin Invest* 1999; 104: 271–280

Furuichi K, Wada T, Iwata Y, Kokubo S, Hara A, Yamahana J, Sugaya T, Iwakura Y, Matsushima K, Asano M, Yokoyama H, Kaneko S. Interleukin-1-dependent sequential chemokine expression and inflammatory cell infiltration in ischemia-reperfusion injury. *Crit Care Med* 2006; 34: 2447–2455

Ge ZD, Pravdic D, Bienengraeber M, Pratt PF Jr, Auchampach JA, Gross GJ, Kersten JR, Wartier DC. Isoflurane postconditioning protects against reperfusion injury by preventing mitochondrial permeability transition by an endothelial nitric oxide synthase-dependent mechanism. *Anesthesiology* 2010; 112: 73–85

Gilles S, Zahler S, Welsch U, Sommerhoff CP, Becker BF. Release of TNF-alpha during myocardial reperfusion depends on oxidative stress and is prevented by mast cell stabilizers. *Cardiovasc Res* 2003; 60: 608–616

Glennon PE, Kaddoura S, Sale EM, Sale GJ, Fuller SJ, Sugden PH. Depletion of Mitogen-Activated Protein Kinase Using an Antisense Oligodeoxynucleotide Approach Downregulates the Phenylephrine-Induced Hypertrophic Response in Rat Cardiac Myocytes. *Circulation Research* 1996; 78: 954–961

Gomez L, Paillard M, Thibaule H, Derumeaux G, Ovize M. Inhibition of GSK3 β by Postconditioning Is Required to Prevent Opening of the Mitochondrial Permeability Transition Pore During Reperfusion. *Circulation* 2008; 117: 2761–2768

González GE, Rhaleb N-E, D'Ambrosio MA, Nakagawa P, Liu Y, Leung P, Dai X, Yang X-P, Peterson EL, Carretero OA. Deletion of interleukin-6 prevents cardiac inflammation, fibrosis and dysfunction without affecting blood pressure in angiotensin II-high salt-induced hypertension. *J Hypertens* 2015; 33: 144–152

Gottlieb RA, Gruol DL, Zhu JY, Engler RL. Preconditioning in rabbit cardiomyocytes. Roll of pH, vacuolar proton ATPase, and apoptosis. *J Clin Invest* 1996; 97: 2391–2398

Gordon JW, Shaw JA, Kirshenbaum LA. Multiple Facets of NF- κ B in the Heart To Be or Not to NF- κ B. *Circulation Research* 2011; 108: 1122–1132

Gritsopoulos G, Iliodromitis EK, Zoga A, Farmakis D, Demerouti E, Papalois A, Paraskevaidis IA, Kremastinos DT. Remote Postconditioning is More Potent than Classic Postconditioning in Reducing the Infarct Size in Anesthetized Rabbits. *Cardiovasc Drugs Ther* 2009; 23: 193–198

Guo AQ, Sheng L, Lei X, Shu W. Pharmacological and physical prevention and treatment of no-reflow after primary percutaneous coronary intervention in ST-segment elevation myocardial infarction. *Journal of International Medical Research* 2013; 41: 537–547

Yamaguchi H. The protein kinase PKB/Akt regulates cell survival and apoptosis by inhibiting Bax conformational change. 2001; 20: 7779–7786

Ha T, Hu Y, Liu L, Lu C, McMullen JR, Kelley J, Kao RL, Williams DL, Gao X, Li C. TLR2 ligands induce cardioprotection against ischaemia/reperfusion injury through a PI3K/Akt-dependent mechanism. *Cardiovasc Res* 2010; 87: 694–703

Häcker H, Mischak H, Miethke T, Liptay S, Schmid R, Sparwasser T, Heeg K, Lipford GB, Wagner H. CpG-DNA-specific activation of antigen-presenting cells requires stress kinase activity and is preceded by non-specific endocytosis and endosomal maturation. *EMBO J* 1998; 17: 6230–6240

Halestrap AP. What is the mitochondrial permeability transition pore? *Journal of Molecular and Cellular Cardiology, Mitochondria Special Issue: From Basic Mitochondrial Biology to Cardiovascular Disease* 2009; 46: 821–831

Hausenloy DJ, Mocanu MM, Yellon DM. Cross-talk between the survival kinases during early reperfusion: its contribution to ischemic preconditioning. *Cardiovascular Research* 2004; 63: 305–312

Hausenloy DJ, Tsang A, Yellon DM. The Reperfusion Injury Salvage Kinase Pathway: A Common Target for Both Ischemic Preconditioning and Postconditioning. *Trends in Cardiovascular Medicine* 2005; 15: 69–75

Hausenloy DJ, Yellon DM. Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target. *J Clin Invest* 2013; 123: 92–100

Hausenloy DJ, Yellon DM. New directions for protecting the heart against ischaemia–reperfusion injury: targeting the Reperfusion Injury Salvage Kinase (RISK)-pathway. *Cardiovasc Res* 2004; 61: 448–460

Haworth RA, Hunter DR. The Ca²⁺-induced membrane transition in mitochondria: II. Nature of the Ca²⁺ trigger site. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1979; 195: 460–467

Hearse DJ, Bolli R. Reperfusion induced injury: manifestations, mechanisms, and clinical relevance. *Cardiovasc Res* 1992; 26: 101–108

Hearse DJ, Humphrey SM, Chain EB. Abrupt reoxygenation of the anoxic potassium-arrested perfused rat heart: A study of myocardial enzyme release. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 1973; 5: 395–407

Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, Matsumoto M, Hoshino K, Wagner H, Takeda K, Akira S. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 2000a; 408: 740–745

Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, Matsumoto M, Hoshino K, Wagner H, Takeda K, Akira S. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 2000b; 408: 740–745

Hennein HA, Ebba H, Rodriguez JL, Merrick SH, Keith FM, Bronstein MH, Leung JM, Mangano DT, Greenfield LJ, Rankin JS. Relationship of the proinflammatory cytokines to myocardial ischemia and dysfunction after uncomplicated coronary revascularization. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1994; 108: 626–635

Hill JH, Ward PA. C3 Leukotactic Factors Produced by a Tissue Protease. *J Exp Med* 1969; 130: 505–518

Hiscott J, Marois J, Garoufalidis J, D'Addario M, Roulston A, Kwan I, Pepin N, Lacoste J, Nguyen H, Bensi G Characterization of a functional NF-kappa B site in the human interleukin 1 beta promoter: evidence for a positive autoregulatory loop. *Mol Cell Biol* 1993; 13: 6231–6240

Horwitz LD, Kaufman D, Keller MW, Kong Y. Time course of coronary endothelial healing after injury due to ischemia and reperfusion. *Circulation* 1994; 90: 2439–2447

Iliodromitis EK, Georgiadis M, Cohen MV, Downey JM, Bofilis E, Kremastinos DT. Protection from postconditioning depends on the number of short ischemic insults in anesthetized pigs. *Basic Res Cardiol* 2006; 101: 502–507

Ito WD, Schaarschmidt S, Klask R, Hansen S, Schäfer HJ, Mathey D, Bhakdi S. Infarct size measurement by triphenyltetrazolium chloride staining versus in vivo injection of propidium iodide. *J Mol Cell Cardiol* 1997; 29: 2169–2175

Iyer SS, Cheng G. Role of Interleukin 10 Transcriptional Regulation in Inflammation and Autoimmune Disease. *Crit Rev Immunol* 2012; 32: 23–63

Jafri MS, Dudycha SJ, O'Rourke B. Cardiac Energy Metabolism: Models of Cellular Respiration. *Annual Review of Biomedical Engineering* 2001; 3: 57–81

Janeway CA, Medzhitov R. Innate Immune Recognition. *Annual Review of Immunology* 2002; 20: 197–216

Jennings RB, Sommers HM, Smyth GA, Flack HA, Linn H. Myocardial necrosis induced by temporary occlusion of a coronary artery in the dog. *Arch Pathol* 1960; 70: 68–78

Jordan JE, Zhao ZQ, Vinten-Johansen J. The role of neutrophils in myocardial ischemia–reperfusion injury. *Cardiovascular Research* 1999; 43: 860–878

Kalogeris T, Bao Y, Korthuis RJ. Mitochondrial reactive oxygen species: A double edged sword in ischemia/reperfusion vs preconditioning. *Redox Biology* 2014; 2: 702–714

Kerendi F, Kin H, Halkos ME, Jiang R, Zatta AJ, Zhao ZQ, Guyton RA, Vinten-Johansen J. Remote postconditioning. Brief renal ischemia and reperfusion applied before coronary artery reperfusion reduces myocardial infarct size via endogenous activation of adenosine receptors. *Basic Res Cardiol* 2005; 100: 404–412

Kim S-C, Boehm O, Meyer R, Hoeft A, Knuefermann P, Baumgarten G. A Murine Closed-chest Model of Myocardial Ischemia and Reperfusion. *J Vis Exp* 2012; 10: 3791–3896

Kim S-C, Ghanem A, Stapel H, Tiemann K, Knuefermann P, Hoeft A, Meyer R, Grohe C, Knowlton AA, Baumgarten G. Toll-like receptor 4 deficiency: Smaller infarcts, but no gain in function. *BMC Physiol* 2007; 7: 1–10

Kim S-C, Wu S, Fang X, Neumann J, Eichhorn L, Schleifer G, Boehm O, Meyer R, Frede S, Hoeft A, Baumgarten G, Knuefermann P. Postconditioning with a CpG containing Oligodeoxynucleotide ameliorates myocardial infarction in a murine closed-chest model. *Life Sciences* 2014; 119: 1–8

Kim SJ, Ghaleh B, Kudej RK, Huang CH, Hintze TH, Vatner SF. Delayed enhanced nitric oxide-mediated coronary vasodilation following brief ischemia and prolonged reperfusion in conscious dogs. *Circ Res* 1997; 81: 53–59

Kim Y-H, Yoon D-W, Kim J-H, Lee J-H, Lim C-H. Effect of remote ischemic post-conditioning on systemic inflammatory response and survival rate in lipopolysaccharide-induced systemic inflammation model. *Journal of Inflammation* 2014; 11: 1476–9255

Kin H, Wang N-P, Mykytenko J, Reeves J, Deneve J, Jiang R, Zatta AJ, Guyton RA, Vinten-Johansen J, Zhao Z-Q. Inhibition of myocardial apoptosis by postconditioning is associated with attenuation of oxidative stress-mediated nuclear factor-kappa B translocation and TNF alpha release. *Shock* 2008; 29: 761–768

Kin H, Zatta AJ, Lofye MT, Amerson BS, Halkos ME, Kerendi F, Zhao Z-Q, Guyton RA, Headrick JP, Vinten-Johansen J. Postconditioning reduces infarct size via adenosine receptor activation by endogenous adenosine. *Cardiovascular Research* 2005; 67: 124–133

Kin H, Zhao Z-Q, Sun H-Y, Wang N-P, Corvera JS, Halkos ME, Kerendi F, Guyton RA, Vinten-Johansen J. Postconditioning attenuates myocardial ischemia–reperfusion injury by inhibiting events in the early minutes of reperfusion. *Cardiovascular Research* 2004; 62: 74–85

Klinman D, Shirota H, Tross D, Sato T, Klyaschik S. Synthetic oligonucleotides as modulators of inflammation. *J Leukoc Biol* 2008; 84: 958–964

Knowlton AA, Connelly CM, Romo GM, Mamuya W, Apstein CS, Brecher P. Rapid expression of fibronectin in the rabbit heart after myocardial infarction with and without reperfusion. *J Clin Invest* 1992; 89: 1060–1068

Knuefermann P, Sakata Y, Baker JS, Huang C-H, Sekiguchi K, Hardarson HS, Takeuchi O, Akira S, Vallejo JG. Toll-like receptor 2 mediates *Staphylococcus aureus*-induced myocardial dysfunction and cytokine production in the heart. *Circulation* 2004; 110: 3693–3698

Knuefermann P, Schwederski M, Velten M, Krings P, Ehrentraut H, Rüdiger M, Boehm O, Fink K, Dreiner U, Grohé C, Hoeft A, Baumgarten G, Koch A, Zacharowski K, Meyer R. Bacterial DNA induces myocardial inflammation and reduces cardiomyocyte contractility: role of Toll-like receptor 9. *Cardiovascular Research* 2008; 78: 26–35

Krieg AM, Yi AK, Matson S, Waldschmidt TJ, Bishop GA, Teasdale R, Koretzky GA, Klinman DM. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* 1995; 374: 546–549

Krijnen PAJ, Nijmeijer R, Meijer CJLM, Visser CA, Hack CE, Niessen HWM. Apoptosis in myocardial ischaemia and infarction. *J Clin Pathol* 2002; 55: 801–811

Krishnamurthy P, Rajasingh J, Lambers E, Qin G, Losordo DW, Kishore R. IL-10 Inhibits Inflammation and Attenuates Left Ventricular Remodeling After Myocardial Infarction via Activation of STAT3 and Suppression of HuR. *Circulation Research* 2009a; 104: 9–18

Krishnamurthy P, Rajasingh J, Lambers E, Qin G, Losordo DW, Kishore R. IL-10 Inhibits Inflammation and Attenuates Left Ventricular Remodeling After Myocardial Infarction via Activation of STAT3 and Suppression of HuR. *Circulation Research* 2009b; 104: 9–18

Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C. Mitochondrial Membrane Permeabilization in Cell Death. *Physiological Reviews* 2007; 87: 99–163

Kumagai Y, Takeuchi O, Akira S. TLR9 as a key receptor for the recognition of DNA. *Advanced Drug Delivery Reviews, Toll-like Receptor and Pattern Sensing for Evoking Immune Response* 2008; 60: 795–804

Kumar A, Thota V, Dee L, Olson J, Uretz E, Parrillo JE. Tumor necrosis factor alpha and interleukin 1beta are responsible for in vitro myocardial cell depression induced by human septic shock serum. *J Exp Med* 1996; 183: 949–958

Kumar H, Kawai T, Akira S. Toll-like receptors and innate immunity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2009; 388: 621–625

Lacerda L, Opie L, Lecour S. TNF α can mimic ischaemic postconditioning. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 2008; 44: 201–208

Lacerda L, Somers S, Opie LH, Lecour S. Ischaemic postconditioning protects against reperfusion injury via the SAFE pathway. *Cardiovasc Res* 2009; 84: 201–208

LaMorte VJ, Thorburn J, Absher D, Spiegel A, Brown JH, Chien KR, Feramisco JR, Knowlton KU. Gq- and ras-dependent pathways mediate hypertrophy of neonatal rat ventricular myocytes following alpha 1-adrenergic stimulation. *J Biol Chem* 1994; 269: 13490–13496

Laskey WK. Brief repetitive balloon occlusions enhance reperfusion during percutaneous coronary intervention for acute myocardial infarction: A pilot study. *Cathet Cardiovasc Intervent* 2005; 65: 361–367

Latz E, Schoenemeyer A, Visintin A, Fitzgerald KA, Monks BG, Knetter CF, Lien E, Nilsen NJ, Espevik T, Golenbock DT. TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome. *Nat Immunol* 2004; 5: 190–198

Lecour S. Activation of the protective Survivor Activating Factor Enhancement (SAFE) pathway against reperfusion injury: Does it go beyond the RISK pathway? *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 2009; 47: 32–40

Lecour S, Smith RM, Woodward B, Opie LH, Rochette L, Sack MN. Identification of a Novel Role for Sphingolipid Signaling in TNF α and Ischemic Preconditioning Mediated Cardioprotection. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 2002; 34: 509–518

Lecour S, Suleman N, Deuchar GA, Somers S, Lacerda L, Huisamen B, Opie LH. Pharmacological Preconditioning With Tumor Necrosis Factor- α Activates Signal Transducer and Activator of Transcription-3 at Reperfusion Without Involving Classic Prosurvival Kinases (Akt and Extracellular Signal-Regulated Kinase). *Circulation* 2005a; 112: 3911–3918

Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart J-M, Hoffmann JA. The Dorsoventral Regulatory Gene Cassette *spätzle/Toll/cactus* Controls the Potent Antifungal Response in *Drosophila* Adults. *Cell* 1996; 86: 973–983

Leng YF, Zhang Y, Zhang Y, Xue X, Wang T, Kang YQ. Ischemic post-conditioning attenuates the intestinal injury induced by limb ischemia/reperfusion in rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 2011; 44: 411–417

Létienne R, Calmettes Y, Le Grand B. Is postconditioning effective in prevention against long-lasting myocardial ischemia in the rabbit? *Physiol Res* 2009; 58: 635–643

Levy DE, Lee C. What does Stat3 do? *Journal of Clinical Investigation* 2002; 109: 1143–1148

Li C-M, Zhang X-H, Ma X-J, Luo M. Limb ischemic postconditioning protects myocardium from ischemia-reperfusion injury. *Scand Cardiovasc J* 2006; 40: 312–317

Li Y, Takemura G, Okada H, Miyata S, Maruyama R, Li L, Higuchi M, Minatoguchi S, Fujiwara T, Fujiwara H. Reduction of inflammatory cytokine expression and oxidative damage by erythropoietin in chronic heart failure. *Cardiovascular Research* 2006; 71: 684–694

Libermann TA, Baltimore D. Activation of interleukin-6 gene expression through the NF-kappa B transcription factor. *Mol Cell Biol* 1990; 10: 2327–2334

Lim K-H, Staudt LM. Toll-Like Receptor Signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2013; 5: 1–4

Lim SY, Davidson SM, Hausenloy DJ, Yellon DM. Preconditioning and postconditioning: The essential role of the mitochondrial permeability transition pore. *Cardiovascular Research* 2007; 75: 530–535

Lohner R, Schwederski M, Narath C, Klein J, Duerr GD, Torno A, Knuefermann P, Hoefft A, Baumgarten G, Meyer R, Boehm O. Toll-Like Receptor 9 Promotes Cardiac Inflammation and Heart Failure during Polymicrobial Sepsis. *Mediators Inflamm* 2013; 261049: 1–13

Lu C, Ha T, Wang X, Liu L, Zhang X, Kimbrough EO, Sha Z, Guan M, Schweitzer J, Kalbfleisch J, Williams D, Li C. The TLR9 Ligand, CpG-ODN, Induces Protection against Cerebral Ischemia/Reperfusion Injury via Activation of PI3K/Akt Signaling. *J Am Heart Assoc* 2014; 3: 1–13

Ma XL, Tsao PS, Viehman GE, Lefer AM. Neutrophil-mediated vasoconstriction and endothelial dysfunction in low-flow perfusion-reperfused cat coronary artery. *Circulation Research* 1991; 69: 95–106

Manintveld OC, Hekkert M te L, Bos EJ van den, Suurenbroek GM, Dekkers DH, Verdouw PD, Lamers JM, Duncker DJ. Cardiac effects of postconditioning depend critically on the duration of index ischemia. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 2007a; 292: 1551–H1560

Manintveld OC, Hekkert M te L, Bos EJ van den, Suurenbroek GM, Dekkers DH, Verdouw PD, Lamers JM, Duncker DJ. Cardiac effects of postconditioning depend critically on the duration of index ischemia. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 2007b; 292: 1551–1560

Manintveld OC, Te Lintel Hekkert M, van den Bos EJ, Suurenbroek GM, Dekkers DH, Verdouw PD, Lamers JM, Duncker DJ. Cardiac effects of postconditioning depend critically on the duration of index ischemia. *Am J Physiol Heart Circ.Physiol* 2007c; 292: 1551–1560

Manukyan MC, Alvernaz CH, Poynter JA, Wang Y, Brewster BD, Weil BR, Abarbanell AM, Herrmann JL, Crowe BJ, Keck AC, Meldrum DR. Interleukin-10 protects the ischemic heart from reperfusion injury via the STAT3 pathway. *Surgery* 2011; 150: 231–239

Maria A Brown, WKJ. NF-kappaB action in sepsis: the innate immune system and the heart. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 2004; 9: 1201–1217

Markowski P, Boehm O, Goelz L, Haesner AL, Ehrentraut H, Bauerfeld K, Tran N, Zacharowski K, Weisheit C, Langhoff P, Schwederski M, Hilbert T, Klaschik S, Hoefft A, Baumgarten G, Meyer R, Knuefermann P. Pre-conditioning with synthetic CpG-oligonucleotides attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury via IL-10 up-regulation. *Basic Research in Cardiology* 2013a; 108: 1–16

Markowski P, Boehm O, Goelz L, Haesner AL, Ehrentraut H, Bauerfeld K, Tran N, Zacharowski K, Weisheit C, Langhoff P, Schwederski M, Hilbert T, Klaschik S, Hoefft A, Baumgarten G, Meyer R, Knuefermann P. Pre-conditioning with synthetic CpG-oligonucleotides attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury via IL-10 up-regulation. *Basic Research in Cardiology* 2013b; 108: 1–16

Mathur S, Walley K, Boyd J. The Toll-like Receptor 9 Ligand CPG-C Attenuates Acute Inflammatory Cardiac Dysfunction. *Shock* November 2011; 36: 478–483

Mathur S, Walley KR, Boyd JH. The Toll-like Receptor 9 Ligand CPG-C Attenuates Acute Inflammatory Cardiac Dysfunction. *Shock* 2011b; 36: 478–483

Mayer B, Holmer SR, Hengstenberg C, Lieb W, Pfeifer M, Schunkert H. Functional improvement in heart failure patients treated with beta-blockers is associated with a decline of cytokine levels. *Int J Cardiol* 2005; 103: 182–186

McCully JD, Wakiyama H, Hsieh Y-J, Jones M, Levitsky S. Differential contribution of necrosis and apoptosis in myocardial ischemia-reperfusion injury. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 2004; 286: 1923–1935

Medzhitov R. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2001; 1: 135–145

Meybohm P, Bein B, Brosteanu O, Cremer J, Gruenewald M, Stoppe C, Coburn M, Schaelte G, Böning A, Niemann B, Roesner J, Kletzin F, Strouhal U, Reyher C, Laufenberg-Feldmann R, Ferner M, Brandes IF, Bauer M, Stehr SN, Kortgen A, Wittmann M, Baumgarten G, Meyer-Treschan T, Kienbaum P, Heringlake M, Schön J, Sander M, Treskatsch S, Smul T, Wolwender E, Schilling T, Fuernau G, Hasenclever D, Zacharowski K. A multicenter Trial of Remote Ischemic Preconditioning for Heart Surgery. *N Engl J Med* 2015; 373: 1397–1407

Michael LH, Entman ML, Hartley CJ, Youker KA, Zhu J, Hall SR, Hawkins HK, Berens K, Ballantyne CM. Myocardial ischemia and reperfusion: a murine model. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 1995; 269: 2147–2154

Michael LH, Hunt JR, Weilbaecher D, Perryman MB, Roberts R, Lewis RM, Entman ML. Creatine kinase and phosphorylase in cardiac lymph: coronary occlusion and reperfusion. *Am J Physiol* 1985; 248:350–359

Miura T, Miki T. Limitation of myocardial infarct size in the clinical setting: current status and challenges in translating animal experiments into clinical therapy. *Basic Res Cardiol* 2008; 103: 501–513

Mizuhara H, O'Neill E, Seki N, Ogawa T, Kusunoki C, Otsuka K, Satoh S, Niwa M, Senoh H, Fujiwara H. T cell activation-associated hepatic injury: mediation by tumor necrosis factors and protection by interleukin 6. *J Exp Med* 1994; 179: 1529–1537

Murphy E. Inhibit GSK-3 β or there's heartbreak dead ahead. *J Clin Invest* 2004; 113: 1526–1528

Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 1986; 74: 1124–1136

Newton K, Dixit VM. Signaling in Innate Immunity and Inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2012; 4: 1–19

Nidai Ozes O, Mayo LD, Gustin JA, Pfeffer SR, Pfeffer LM, Donner DB. NF- κ B activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine–threonine kinase. *Nature* 1999; 401: 82–85

Nossuli TO, Lakshminarayanan V, Baumgarten G, Taffet GE, Ballantyne CM, Michael LH, Entman ML. A chronic mouse model of myocardial ischemia-reperfusion: essential in cytokine studies. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 2000; 278: 1049–1055

Obal D, Dettwiler S, Favoccia C, Scharbatke H, Preckel B, Schlack W. The Influence of Mitochondrial KATP-Channels in the Cardioprotection of Preconditioning and Postconditioning by Sevoflurane in the Rat In Vivo: *Anesthesia & Analgesia* 2005; 101: 1252–1260

Okamoto F, Allen BS, Buckberg GD, Bugyi H, Leaf J. Reperfusion conditions: importance of ensuring gentle versus sudden reperfusion during relief of coronary occlusion. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1986; 92: 613–62

Ovize M, Baxter GF, Lisa FD, Ferdinandy P, Garcia-Dorado D, Hausenloy DJ, Heusch G, Vinten-Johansen J, Yellon DM, Schulz R. Postconditioning and protection from reperfusion injury: where do we stand? Position Paper from the Working Group of Cellular Biology of the Heart of the European Society of Cardiology. *Cardiovascular Research* 2010; 87: 406–423

Pacher P, Nagayama T, Mukhopadhyay P, Bátkai S, Kass DA. Measurement of cardiac function using pressure–volume conductance catheter technique in mice and rats. *Nat Protoc* 2008; 3: 1422–1434

Parrillo JE, Burch C, Shelhamer JH, Parker MM, Natanson C, Schuette W. A circulating myocardial depressant substance in humans with septic shock. Septic shock patients with a reduced ejection fraction have a circulating factor that depresses in vitro myocardial cell performance. *J Clin Invest* 1985; 76: 1539–1553

Peart JN, Headrick JP. Clinical cardioprotection and the value of conditioning responses. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 2009; 296: 1705–1720

Penna C, Perrelli M-G, Pagliaro P. Mitochondrial Pathways, Permeability Transition Pore, and Redox Signaling in Cardioprotection: Therapeutic Implications. *Antioxidants & Redox Signaling* 2012; 18: 556–599

Penna C, Tullio F, Merlino A, Moro F, Raimondo S, Rastaldo R, Perrelli M-G, Mancardi D, Pagliaro P. Postconditioning cardioprotection against infarct size and post-ischemic systolic dysfunction is influenced by gender. *Basic Res Cardiol* 2009; 104: 390–402

Quyyumi AA, Dakak N, Andrews NP, Gilligan DM, Panza JA, Cannon RO. Contribution of Nitric Oxide to Metabolic Coronary Vasodilation in the Human Heart. *Circulation* 1995; 92: 320–326

Redel A, Jazbutyte V, Smul TM, Lange M, Eckle T, Eltzschig H, Roewer N, Kehl F. Impact of ischemia and reperfusion times on myocardial infarct size in mice in vivo. *Exp Biol Med* 2008; 233: 84–93

Reimer KA, Murry CE, Richard VJ. The role of neutrophils and free radicals in the ischemic-reperfused heart: why the confusion and controversy? *J Mol Cell Cardiol* 1989; 21: 1225–1239

Rosenzweig HL, Minami M, Lessov NS, Coste SC, Stevens SL, Henshall DC, Meller R, Simon RP, Stenzel-Poore MP. Endotoxin preconditioning protects against the cytotoxic effects of TNF α after stroke: a novel role for TNF α in LPS-ischemic tolerance. *J Cereb Blood Flow Metab* 2007; 27: 1663–1674

Sadoshima J, Jahn L, Takahashi T, Kulik TJ, Izumo S. Molecular characterization of the stretch-induced adaptation of cultured cardiac cells. An in vitro model of load-induced cardiac hypertrophy. *J Biol Chem* 1992; 267: 10551–10560

Sadoshima J, Qiu Z, Morgan JP, Izumo S. Angiotensin II and Other Hypertrophic Stimuli Mediated by G Protein–Coupled Receptors Activate Tyrosine Kinase, Mitogen-Activated Protein Kinase, and 90-kD S6 Kinase in Cardiac Myocytes The Critical Role of Ca²⁺-Dependent Signaling. *Circulation Research* 1995; 76: 1–15

Sanchez RN, Chan CK, Garg S, Kwong JMK, Wong MJ, Sadun AA, Lam TT. Interleukin-6 in retinal ischemia reperfusion injury in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; 44: 4006–4011

Saraiva M, O'Garra A. The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nat Rev Immunol* 2010; 10: 170–181

Sato H, Jordan JE, Zhao ZQ, Sarvotham SS, Vinten-Johansen J. Gradual reperfusion reduces infarct size and endothelial injury but augments neutrophil accumulation. *Ann Thorac Surg* 1997; 64: 1099–1107

Schmid-Schönbein GW. The Damaging Potential of Leukocyte Activation in the Microcirculation. *Angiology* 1993; 44: 45–56

Schulz R. TNF α in myocardial ischemia/reperfusion: Damage vs. protection. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 2008; 45: 712–714

Schulz R, Aker S, Belosjorow S, Heusch G.. TNF α in ischemia/reperfusion injury and heart failure. *Basic Res Cardiol* 2004a; 99: 8–11

Schulz R, Heusch G. Tumor Necrosis Factor- α and Its Receptors 1 and 2 Yin and Yang in Myocardial Infarction? *Circulation* 2009; 119: 1355–1357

Schulz R, Kelm M, Heusch G. Nitric oxide in myocardial ischemia/reperfusion injury. *Cardiovascular Research* 2004b; 61: 402–413

Schwartz LM, Lagranha CJ. Ischemic postconditioning during reperfusion activates Akt and ERK without protecting against lethal myocardial ischemia-reperfusion injury in pigs. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 2006a; 290: 1011–1018

Schwartz LM, Lagranha CJ. Ischemic postconditioning during reperfusion activates Akt and ERK without protecting against lethal myocardial ischemia-reperfusion injury in pigs. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006b; 290: 1011–1018

Shen YT, Vatner SF. Differences in myocardial stunning following coronary artery occlusion in conscious dogs, pigs, and baboons. *Am J Physiol* 1996; 270: 1312–1322

Shimamoto A, Chong AJ, Yada M, Shomura S, Takayama H, Fleisig AJ, Agnew ML, Hampton CR, Rothnie CL, Spring DJ, Pohlman TH, Shimpo H, Verrier ED. Inhibition of Toll-like receptor 4 with eritoran attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury. *Circulation* 2006; 114: 270–274

Souza DG, Guabiraba R, Pinho V, Bristow A, Poole S, Teixeira MM. IL-1-Driven Endogenous IL-10 Production Protects Against the Systemic and Local Acute Inflammatory Response Following Intestinal Reperfusion Injury *J Immunol* 2003; 170: 4759–4766

Sparwasser T, Miethke T, Lipford G, Erdmann A, Häcker H, Heeg K, Wagner H: Macrophages sense pathogens via DNA motifs: induction of tumor necrosis factor- α -mediated shock. *Eur J Immunol* 1997; 27: 1671–1679

Staat P, Rioufol G, Piot C, Cottin Y, Cung TT, L'Huillier I, Aupetit J-F, Bonnefoy E, Finet G, André-Fouët X, Ovize M. Postconditioning the Human Heart. *Circulation* 2005; 112: 2143–2148

Stevens SL, Ciesielski TM, Marsh BJ, Yang T, Homen DS, Boule J-L, Lessov NS, Simon RP, Stenzel-Poore MP. Toll-like receptor 9: A new target of ischemic preconditioning in the brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 2008; 28: 1040–1047

Stevens SL, Leung PY, Vartanian KB, Gopalan B, Yang T, Simon RP, Stenzel-Poore MP. Multiple preconditioning paradigms converge on interferon regulatory factor-dependent signaling to promote tolerance to ischemic brain injury. *J Neurosci* 2011; 31: 8456–8463

Sun H-Y, Wang N-P, Halkos M, Kerendi F, Kin H, Guyton RA, Vinten-Johansen J, Zhao Z-Q. Postconditioning attenuates cardiomyocyte apoptosis via inhibition of JNK and p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Apoptosis* 2006; 11: 1583–1593

Sutton MGSJ, Sharpe N. Left Ventricular Remodeling After Myocardial Infarction Pathophysiology and Therapy. *Circulation* 2000a; 101: 2981–2988

Sutton MGSJ, Sharpe N. Left Ventricular Remodeling After Myocardial Infarction Pathophysiology and Therapy. *Circulation* 2000; 101: 2981–2988

Suzuki S, Toledo-Pereyra LH. Interleukin 1 and Tumor Necrosis Factor Production as the Initial Stimulants of Liver Ischemia and Reperfusion Injury. *Journal of Surgical Research* 1994; 57: 253–258

Takemura G, Nakagawa M, Kanamori H, Minatoguchi S, Fujiwara H. Benefits of reperfusion beyond infarct size limitation. *Cardiovascular Research* 2009; 83: 269–276

Takehita F, Gursel I, Ishii KJ, Suzuki K, Gursel M, Klinman DM. Signal transduction pathways mediated by the interaction of CpG DNA with Toll-like receptor 9. *Semin Immunol* 2004; 16: 17–22

Tanaka M, Ito H, Akimoto H, Nishikawa T, Kasajima T, Marumo F, Hiroe M. Hypoxia induces apoptosis with enhanced expression of Fas antigen messenger RNA in cultured neonatal rat cardiomyocytes. *Circ Res* 1994; 75: 426–433

Teoh N, Leclercq I, Pena AD, Farrell G. Low-dose TNF- α protects against hepatic ischemia-reperfusion injury in mice: Implications for preconditioning. *Hepatology* 2003; 37: 118–128

Thüroff JW, Hort W, Lichti H. Diameter of coronary arteries in 36 species of mammalian from mouse to giraffe. *Basic Res Cardiol* 1984; 79: 199–206

Tong H, Imahashi K, Steenbergen C, Murphy E. Phosphorylation of Glycogen Synthase Kinase-3 β During Preconditioning Through a Phosphatidylinositol-3-Kinase-Dependent Pathway Is Cardioprotective. *Circulation Research* 2002; 90: 377–379

Tonkovic-Capin M, Gross GJ, Bosnjak ZJ, Tweddell JS, Fitzpatrick CM, Baker JE. Delayed cardioprotection by isoflurane: role of KATP channels. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 2002; 283: 61–68

Tsang A, Hausenloy DJ, Mocanu MM, Yellon DM. Postconditioning: A Form of “Modified Reperfusion” Protects the Myocardium by Activating the Phosphatidylinositol 3-Kinase-Akt Pathway. *Circulation Research* 2004; 95: 230–232

Tsao PS, Aoki N, Lefer DJ, Johnson G, Lefer AM. Time course of endothelial dysfunction and myocardial injury during myocardial ischemia and reperfusion in the cat. *Circulation* 1990; 82: 1402–1412

Tsao PS, Lefer AM. Time course and mechanism of endothelial dysfunction in isolated ischemic- and hypoxic-perfused rat hearts. *Am J Physiol* 1990; 259: 1660–1666

Tsuruta F, Masuyama N, Gotoh Y. The phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)-Akt pathway suppresses Bax translocation to mitochondria. *J Biol Chem* 2002; 277: 14040–14047

Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol* 2003; 552: 335–344

Van Wamel JE, Ruwhof C, van der Valk-Kokshoorn EJ, Schrier PI, van der Laarse A. Rapid gene transcription induced by stretch in cardiac myocytes and fibroblasts and their paracrine influence on stationary myocytes and fibroblasts. *Pflugers Arch* 2000; 439: 781–788

Velten M, Duerr GD, Pessies T, Schild J, Lohner R, Mersmann J, Dewald O, Zacharowski K, Klaschik S, Hilbert T, Hoefft A, Baumgarten G, Meyer R, Boehm O, Knuefermann P. Priming with synthetic oligonucleotides attenuates pressure overload-induced inflammation and cardiac hypertrophy in mice. *Cardiovascular Research* 2012; 96: 422–432

Verma S, Fedak PWM, Weisel RD, Butany J, Rao V, Maitland A, Li R-K, Dhillon B, Yau TM. Fundamentals of Reperfusion Injury for the Clinical Cardiologist. *Circulation* 2002; 105: 2332–2336

Vinten-Johansen J. Involvement of neutrophils in the pathogenesis of lethal myocardial reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 2004; 61: 481–49

Vinten-Johansen J, Zhao Z-Q, Zatta AJ, Kin H, Halkos ME, Kerendi F.. Postconditioning A new link in nature's armor against myocardial ischemia–reperfusion injury. *Basic Res Cardiol* 2005a; 100: 295–310

Vinten-Johansen J, Zhao Z-Q, Zatta AJ, Kin H, Halkos ME, Kerendi F. Postconditioning--A new link in nature's armor against myocardial ischemia-reperfusion injury. *Basic Res Cardiol* 2005b; 100: 295–310

Wanderer AA. Ischemic-reperfusion syndromes: Biochemical and immunologic rationale for IL-1 targeted therapy. *Clinical Immunology* 2008; 128: 127–132

Wang Y. Mitogen-Activated Protein Kinases in Heart Development and Diseases. *Circulation* 2007; 116: 1413–1423

Webb S, Brown NA, Anderson RH. The structure of the mouse heart in late fetal stages. *Anat Embryol* 1996; 194: 37–47

Wegrzyn J, Potla R, Chwae Y-J, Sepuri NBV, Zhang Q, Koeck T, Derecka M, Szczepanek K, Szelag M, Gornicka A, Moh A, Moghaddas S, Chen Q, Bobbili S, Cichy J, Dulak J, Baker DP, Wolfman A, Stuehr D, Hassan MO, Fu X-Y, Avadhani N, Drake JI, Fawcett P, Lesnefsky EJ, Larner AC. Function of Mitochondrial Stat3 in Cellular Respiration. *Science* 2009; 323: 793–797

Yamazaki T, Komuro I, Kudoh S, Zou Y, Shiojima I, Mizuno T, Takano H, Hiroi Y, Ueki K, Tobe K, Kadowaki T, Nagai R, Yazaki Y. Angiotensin II Partly Mediates Mechanical Stress-Induced Cardiac Hypertrophy. *Circulation Research* 1995; 77: 258–265

Yang X-M, Proctor JB, Cui L, Krieg T, Downey JM, Cohen MV. Multiple, brief coronary occlusions during early reperfusion protect rabbit hearts by targeting cell signaling pathways. *Journal of the American College of Cardiology* 2004; 44: 1103–1110

Yang Z, Zingarelli B, Szabó C. Crucial Role of Endogenous Interleukin-10 Production in Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury. *Circulation* 2000; 101: 1019–1026

Yellon DM, Hausenloy DJ. Myocardial Reperfusion Injury. *N Engl J Med* 2007; 357: 1121–1135

Zacharowski K, Hohlfeld T, Decking UKM. Open-chest Models of Acute Myocardial Ischemia and Reperfusion 37–57

Zaugg M, Lucchinetti E, Spahn DR, Pasch T, Schaub MC. Volatile anesthetics mimic cardiac preconditioning by priming the activation of mitochondrial K(ATP) channels via multiple signaling pathways. *Anesthesiology* 2002; 97: 4–14

Zhang D, Zhang G, Hayden MS, Greenblatt MB, Bussey C, Flavell RA, Ghosh S. A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria. *Science* 2004; 303: 1522–1526

Zhao Z-Q, Corvera JS, Halkos ME, Kerendi F, Wang N-P, Guyton RA, Vinten-Johansen J. Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 2003a; 285: 579–588

Zhao Z-Q, Corvera JS, Halkos ME, Kerendi F, Wang N-P, Guyton RA, Vinten-Johansen J. Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 2003b; 285: 579–588

Zhao Z-Q, Nakamura M, Wang N-P, Velez DA, Hewan-Lowe KO, Guyton RA, Vinten-Johansen J. Dynamic Progression of Contractile and Endothelial Dysfunction and Infarct Extension in the Late Phase of Reperfusion. *Journal of Surgical Research* 2000a; 94: 133–144

Zhao Z-Q, Nakamura M, Wang N-P, Velez DA, Hewan-Lowe KO, Guyton RA, Vinten-Johansen J. Dynamic Progression of Contractile and Endothelial Dysfunction and Infarct Extension in the Late Phase of Reperfusion. *Journal of Surgical Research* 2000b; 94: 133–144

Zhao Z-Q, Vinten-Johansen J. Postconditioning: Reduction of reperfusion-induced injury. *Cardiovasc Res* 2006; 70: 200–211

Zhou H, Qian J, Li C, Li J, Zhang X, Ding Z, Gao X, Han Z, Cheng Y, Liu L. Attenuation of cardiac dysfunction by HSPA12B in endotoxin-induced sepsis in mice through a PI3K-dependent mechanism. *Cardiovasc Res* 2011; 89: 109–118

Zweier JL. Measurement of superoxide-derived free radicals in the reperfused heart. Evidence for a free radical mechanism of reperfusion injury. *J Biol Chem* 1988; 263: 1353–1357

7. Danksagung

Ein besonderes Wort des Dankes möchte ich an meinen Doktorvater PD Dr. med. Se-Chan Kim richten, ohne den ich niemals Licht am Ende meiner Doktorarbeit gesehen hätte. Du hast von Anfang an an mich geglaubt und hast immer dafür gesorgt, dass ich meinen Geist anstrenge und den Willen habe durchzuhalten. Des Weiteren gilt mein großer Dank Susanne Schulz, für Ihre einzigartige Freundschaft und die liebevolle Unterstützung während der ganzen Jahre. Ich möchte PD. Dr. med. Olaf Boehm meine Dankbarkeit für seine stete Hilfsbereitschaft aussprechen. Die Macht sei mit dir. Ich danke Prof. Dr. med. Georg Baumgarten für seine Ehrlichkeit, Vertrauen und das Überlassen des Themas. Ich danke dem BONFOR Komitee für die finanzielle Unterstützung, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Ich möchte Stilla Frede ganz herzlich für die zahlreichen fachlichen Ratschläge danken. Ich möchte meinen Mitstreitern im Labor für die einmalige Erfahrung, die wir gemeinsam hatten, danken. Meiner Mutter und meinem kürzlich verstorbenen Großvater gilt meine ewige Dankbarkeit, die kaum in Worte zu fassen ist. Ich verdanke euch alles.

Und zu guter Letzt möchte ich meiner Ehefrau Jessica Schleifer danken. Du zeigst mir jeden Tag, was Glück bedeutet.

Publikationen

Kim S-C, Wu S, Fang X, Neumann J, Eichhorn L, **Schleifer G**, Boehm O, Meyer R, Frede S, Hoeft A, Baumgarten G, Knuefermann P. Postconditioning with a CpG containing Oligodeoxynucleotide ameliorates myocardial infarction in a murine closed-chest model. *Life Sciences* 2014; 119; 1–8

Gräff I, Passauer-Baierl S, Thiessen N, Delis A, Biber D, **Schleifer G**, Lenkeit S, Podlogar M, Glien P, Körfer F, Nähle CPH, Goost H, Hoeft A, Kim S-C. Bonner Schockraummanagement-Kurs®: Darstellung eines innerklinischen Kurs-Konzepts zur Schwerstverletztenversorgung (Bonn emergency room management course). *Notfall* 2014; 59–65