

**Die Rolle der Chemokine  
in der Pathogenese  
des hibernierenden Myokards  
in einem Mausmodell**

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

**vorgelegt von: Georg Daniel Dürr  
aus: Bonn**

**2006**

Angefertigt mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Herr Prof. Dr. med. Armin Welz
2. Gutachter: Herr Prof. Dr. med. Andreas Hoeft

Tag der mündlichen Prüfung: 11.05.2006

Aus der Klinik und Poliklinik für Herzchirurgie,  
Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn  
Direktor: Herr Prof. Dr. med. Armin Welz

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn [http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss\\_online](http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online) elektronisch publiziert.

Meinen Eltern zum Dank.



# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	8
<b>1. Einleitung</b>	11
1.1. Theoretische Grundlagen	11
1.1.1. Hintergrund	11
1.1.2. Koronare Herzkrankheit	11
1.1.3. Ischämie und Reperfusion	12
1.1.4. "Preconditioning", "Myocardial Stunning" und "Hibernating Myocardium"	12
1.1.5. Tiermodelle der myokardialen Ischämie und Reperfusion	15
1.1.6. Tiermodelle am Baylor College of Medicine	16
1.2. Pathomechanismen der ventrikulären Dysfunktion im hibernierenden Myokard	17
1.3. Inflammatorische Reaktion auf myokardiale Ischämie und Reperfusion	18
1.3.1. Die Zytokinkaskade - Initiierung des Entzündungsprozesses	18
1.3.2. Die Rolle der Chemokine in Ischämie und Reperfusion	20
1.4. Arbeitshypothesen	21
<b>2. Methoden</b>	22
2.1. Modell der myokardialen Ischämie und Reperfusion bei Mäusen	22
2.1.1. Wildtypmäuse	22
2.1.2. Extrazelluläre Superoxiddismutase-überexprimierende Mäuse	22
2.1.3. Operationsprotokoll des initialen Eingriffs	23
2.1.4. Ischämie- und Reperusionsprotokoll	26
2.1.5. Gruppendifinition	28

2.2.	Untersuchung der ventrikulären Pumpfunktion - Echokardiographie	29
2.3.	Probenaufbereitung	30
2.3.1.	Gewinnen der Gewebeprobe	30
2.3.2.	mRNA-Isolation	30
2.4.	Messung der mRNA-Expression - "Ribonuclease Protection Assay"	31
2.4.1.	Theoretischer Hintergrund	31
2.4.2.	"Ribonuclease Protection Assay"	32
2.5.	Auswertung der Messungen der mRNA-Expression	36
2.6.	Statistik	37
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>39</b>
3.1.	Allgemein über das Modell der Ischämie und Reperfusion	39
3.1.1.	Wildtypmäuse	39
3.1.2.	Extrazelluläre Superoxiddismutase-überexprimierende Mäuse	39
3.2.	Globale und regionale linksventrikuläre Funktion	40
3.2.1.	Ischämie- und Reperfusionsprotokoll bei Wildtypmäusen	40
3.2.2.	Regression bei Wildtypmäusen	42
3.2.3.	Ischämie- und Reperfusionsprotokoll bei EC-SOD-Mäusen	44
3.3.	Induktion von Chemokinen im Modell der Ischämie und Reperfusion	46
3.3.1.	Induktion von Chemokinen in Wildtypmäusen	46
3.3.2.	Induktion von Chemokinen nach Regression	53
3.3.3.	Vergleich der Chemokininduktion zwischen Wildtyp- und EC-SOD-Mäusen	54
3.4.	Induktion von Zytokinen im Modell der Ischämie und Reperfusion	61
3.4.1.	Induktion von Zytokinen in Wildtypmäusen	61

3.4.2. Induktion von Zytokinen in EC-SOD-Mäusen	70
<b>4. Diskussion</b>	<b>74</b>
4.1. Allgemein über das Modell der Ischämie und Reperfusion	75
4.2. Ventrikuläre Dysfunktion	75
4.3. Induktion von Chemokinen im Modell der Ischämie und Reperfusion	77
4.4. Induktion von Zytokinen im Modell der Ischämie und Reperfusion	82
4.5. Schlussfolgerung	87
4.6. Ausblick	88
<b>5. Zusammenfassung</b>	<b>89</b>
<b>6. Tabellenanhang</b>	<b>91</b>
<b>7. Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen</b>	<b>93</b>
<b>8. Literaturverzeichnis</b>	<b>96</b>
<b>9. Danksagung</b>	<b>113</b>
<b>10. Lebenslauf</b>	<b>114</b>

## Abkürzungsverzeichnis

ATP	Adenosintriphosphat
AWT	"anterior wall thickening" (systolische Vorderwandverdickung)
bFGF	"basic Fibroblast Growth Factor"
cDNA	copy- Desoxyribonukleinsäure
CRP	C-reaktives Protein
CTP	Cytosintriphosphat
CXCR3	CXC-Chemokin Rezeptor-3
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EC-SOD	extrazelluläre Superoxiddismutase
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EF	Ejektionsfraktion
EKG	Elektrokardiogramm
ELR	Glutaminsäure-Leucin-Arginin
FS	"fractional shortening" (Fraktionsverkürzung)
GAPDH	Glyceraldehyd-3-phosphatdehydrogenase
GTP	Guanosintriphosphat
I/R	Ischämie und Reperfusion
ICAM-1	"Intercellular Adhesion Molecule-1"
IL	Interleukin

IP-10	"Interferon $\gamma$ -Inducible Protein-10"
KG	Kontrollgruppe
KHK	Koronare Herzkrankheit
LAD	"Left anterior descending coronary artery"
LPS	Lipopolysaccharid
LVdiast	linksventrikulärer Durchmesser während der Diastole
LVEDV	linksventrikuläres enddiastolisches Volumen
LVsyst	linksventrikulärer Durchmesser während der Systole
MCP-1	"Monocyte Chemoattractant Protein-1"
M-CSF	"Macrophage Colony-Stimulating Factor"
MIP	"Macrophage Inflammatory Protein"
M-Mode	Motion-Mode
MMP	Matrix Metalloproteinase
MPG	N-2-Mercaptopropionylglycin
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
OP	Operation
OPN	Osteopontin
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	Polyethylen
PET	Positronen-Emissionstomographie
PPAR- $\alpha$	Peroxisom Proliferator-aktivierter Rezeptor- $\alpha$
PTCA	perkutane transluminale koronare Angioplastie
RIVA	Ramus interventricularis anterior

RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
Rnasin	plazentaler Ribonuklease Inhibitor
RPA	"Ribonuclease Protection Assay"
SCF	"Stem Cell Factor"
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	"Standard Error of the Mean" (Standardfehler des Mittelwerts)
SOD	Superoxiddismutase
TBE	Standardpuffer aus Tris-Borat und EDTA
TGF- $\beta$	"Transforming Growth Factor- $\beta$ "
TIMP	"Tissue Inhibitor of Metalloproteinases"
TNF- $\alpha$	Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$
tRNA	transfer-Ribonukleinsäure
UTP	Uraciltriphosphat
VEGF	"Vascular Endothelial Growth Factor"
VWdiast	Vorderwanddicke des linken Ventrikels während der Diastole
VWsys	Vorderwanddicke des linken Ventrikels während der Systole
WT	Wildtyp
$\alpha$ -SMAc	"alpha-Smooth Muscle Actin"

# 1 Einleitung

## 1.1 Theoretische Grundlagen

### 1.1.1 Hintergrund

Die chronischen Folgen der koronaren Herzkrankheit (KHK) stellen ein beträchtliches klinisches Problem dar. Für viele Jahre implizierte die funktionelle Konsequenz der chronischen KHK infarziertes Myokard. Der Funktionsverlust wurde als irreversibel angenommen. Unter diesen Umständen war die Demonstration, dass aufgrund stenotischer Koronararterien chronisch asynergisches Myokard seine Funktion nach Revaskularisation wiedererlangen kann, von sehr großem klinischem Interesse. Dieses neue Konzept basierte auf dem Befund, dass eine vor koronarer Bypassoperation bestehende myokardiale Dysfunktion nach Revaskularisation oft zurückging [Camici et al., 1999; Chatterjee et al., 1972; Rees et al., 1971; Satiel et al., 1970; Sustaita et al., 1972].

### 1.1.2 Koronare Herzkrankheit

Die KHK wird verursacht durch atherosklerotische Veränderungen der koronararteriellen Gefäßwand und führt zu einer anhaltenden ventrikulären Dysfunktion durch Myokardischämie. Sie manifestiert sich durch Episoden der Ischämie und Reperfusion, z.B. stille Ischämie, Angina pectoris, ischämische Herzmuskelschädigung mit Linksherzinsuffizienz bis hin zu schweren Formen wie Herzrhythmusstörungen, Myokardinfarkt oder plötzlichem Herztod. Die Bedeutung der KHK in der heutigen Gesellschaft nimmt hinsichtlich der Zahl der betroffenen Personen epidemische Ausmaße an [Gaziano, 2001]. Kardiovaskuläre Erkrankungen sind in Deutschland immer noch für ungefähr 50% aller Todesfälle verantwortlich und die KHK und ihre Folgeerkrankungen haben dabei den größten Anteil [Koenig, 1998]. Während die Mortalität der koronaren Herzkrankheit in den westeuropäischen Ländern und den USA abnimmt, zeichnet sich jedoch eine zunehmende Prävalenz ab, wahrscheinlich bedingt durch die Alterung der Bevölkerung. Zu dieser Entwicklung haben viele Gründe beigetragen, z.B. die Reduktion der Risikofaktoren, Verbesserung der sozioökonomischen Zustände, besserer Zugang zu Gesundheitsvorsorge sowie neue Methoden der Diagnostik und Behandlung. Diese Verbesserungen in der Bekämpfung der KHK bedingen jedoch eine steigende Anzahl von

Patienten mit Folgeerkrankungen, wie die der chronischen Herzinsuffizienz. Die Behandlungsmöglichkeiten reichen von medikamentöser Therapie (Beta-Blocker, Nitrate, Kalziumantagonisten, Thrombozytenaggregationshemmer, Lipidsenker) über nicht-chirurgische invasive Revaskularisation (perkutane transluminale koronare Angioplastie, PTCA) bis zur operativen Versorgung (aortokoronare Bypasschirurgie). Aufgrund von klinischen und experimentellen Studien gilt die frühe Revaskularisation bei klinisch manifester KHK als Therapie der Wahl mit dem Ziel der Verhinderung eines Myokardinfarkts. Die Grundlage für die Auswahl der optimalen Therapie bildet das Verständnis der zugrunde liegenden Mechanismen von Ischämie und Reperfusion, die jedoch immer noch nicht ausreichend erforscht sind.

### **1.1.3 Ischämie und Reperfusion**

Ischämie ist ein Zustand, in dem im Zuge von reduzierter Perfusion Sauerstoffmangel und Substratmangel, z.B. Glukose, mit inadäquatem Abtransport von Metaboliten auftreten [Verdouw et al., 1998]. Infolgedessen akkumuliert Laktat, und nur 10 Minuten nach Beginn der Ischämie sinkt der pH-Wert im ischämischen Gewebe auf ca. 6. Die bestehende Ischämie induziert weitere Veränderungen, die letztendlich zu einer Gewebsnekrose führen, wenn die Ischämie nicht rechtzeitig behoben wird. Eine Reperfusion des ischämischen vitalen Myokards kann dies verhindern, wobei jedoch zunächst noch eine weitere Schädigung des Gewebes beobachtet wird, die sogenannte "reperfusion injury" [Birnbaum et al., 1995; Entman et al., 2000; Frangogiannis et al., 1996, 1998 a]. Der entscheidende Faktor ist hierbei die Dauer der Ischämie bis zur Wiederherstellung der Durchblutung.

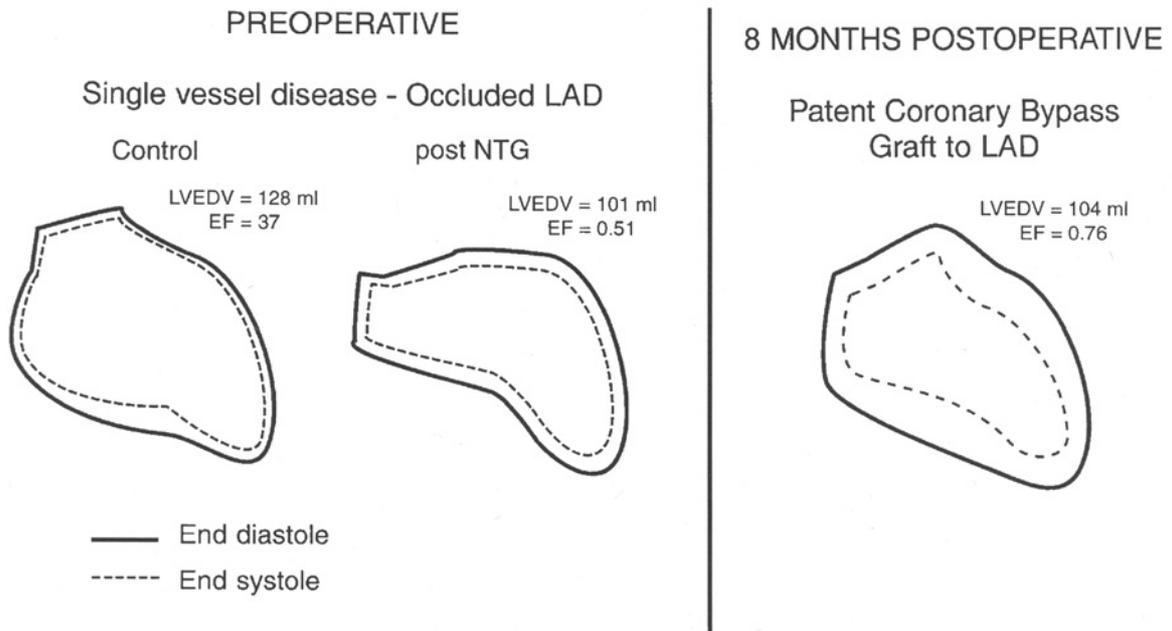
### **1.1.4 "Preconditioning", "Myocardial Stunning" und "Hibernating Myocardium"**

Das Phänomen des "preconditioning" (Präkonditionierung) wurde tierexperimentell beobachtet, indem man mehrere Ischämieepisoden (Dauer 1 bis 5 Minuten) mit darauffolgender Reperfusion erzeugt hat [Murry et al., 1986; Vanoverschelde et al., 1993]. Die Präkonditionierung geht mit reversiblen kurzzeitigen intrazellulären Veränderungen einher, die sich innerhalb von Minuten normalisieren. Dabei treten weder histomorphologische Veränderungen noch ventrikuläre Dysfunktion auf. Die ischämische Präkonditionierung führt bei einem Myokardinfarkt zur Reduktion des nekrotischen Areals und hat somit kardioprotektive Wirkung [Heusch, 1998].

Repetitive 15-minütige Ischämiezyklen mit Reperfusion (I/R) führten im Tierexperiment zum "myocardial stunning" [Kloner et al., 2001 a, b], einem Phänomen mit ventrikulärer Dysfunktion über mehrere Tage [Allen et al., 1996; Gerber et al., 1999; Patel et al., 1988; Kloner et al., 2001 a, b, c; Vlahovic et al., 2000]. "Myocardial stunning" wird konzeptuell als ein Zustand der kontraktile Dysfunktion ohne Koronargefäßverengung und daher mit normaler Perfusion beschrieben [Canty und Fallavollita, 2000]. Hierfür wurden verschieden zugrunde liegende Mechanismen vorgeschlagen, z.B. Kalziumüberladung, Sauerstoffradikalüberschuss oder Adenosinwirkung. Die tierexperimentelle Histopathologie zeigte in Abwesenheit von Koronargefäßverengung auch hier keine wesentlichen Veränderungen. Die klinischen Beobachtungen des "myocardial stunning" zeigten in der Stressechokardiographie eine mit Dobutamin nicht zu verbessernde ventrikuläre Dysfunktion mit noch vitalem Myokard in der Perfusionsszintigraphie oder der Positronen-Emissionstomographie (PET).

Der klinisch beobachtete Zustand des "hibernating myocardium" (hibernierendes Myokard) wurde auch mit repetitiver I/R in Verbindung gebracht, die ventrikuläre Dysfunktion blieb dabei lange bestehen [Rahimtoola, 1989, 1993, 1995 a, b, 1996]. 1974 haben Horn et al. bei Patienten mit KHK und chronischer Asynergie eine Verbesserung der Ventrikelfunktion nach Epinephrin-Infusion beobachtet [Horn et al., 1974]. In einem 1978 publizierten Artikel beschrieben Diamond et al. das Phänomen des hibernierenden Myokards [Diamond et al., 1978]. Um 1980 nahm Rahimtoola den Begriff auf und präziserte das Konzept des hibernierenden Myokards als eine Situation der "verlängerten subakuten oder chronischen Myokardischämie, in welcher myokardiale Kontraktilität und Metabolismus (regulatorisch/adaptiv) reduziert sind, um sich der verminderten Blutzufuhr anzupassen." Dies war "ein neues Gleichgewicht, in dem myokardiale Nekrose verhindert wird und das Myokard in der Lage ist, durch Wiederherstellung einer adäquaten Blutzufuhr zu der normalen oder annähernd normalen Funktion zurückzukehren" (Abb. 1) [Rahimtoola, 1989]. Daraus ergibt sich auch die wichtige Konsequenz der frühen Revaskularisation, um einen irreversiblen myokardialen Schaden zu vermeiden.

Die histopathologischen und ultrastrukturellen Veränderungen beim hibernierenden Myokard reichen u.a. von interstitieller Kollageneinlagerung, Verlust der Sarkomere, und intrazellulärer Glykogeneinlagerung bis zur Verkleinerung der Mitochondrien [Heusch, 1998].



**Abbildung 1.** Paradigmatisches Ventrikulogramm mit enddiastolischer und endsystolischer Silhouette des linken Ventrikels eines Patienten mit totaler Okklusion des Ramus interventricularis anterior (RIVA) und hibernierendem Myokard ohne Myokardinfarkt. In der präoperativen Untersuchung (Control) war die Ejektionsfraktion (EF) reduziert (0,37) und es bestand ein akinetisches Areal im Bereich der antero-apikalen Wand. Nach Nitroglyceringabe (NTG) kam es zu einer Verbesserung der Wandbewegung und die EF steigerte sich auf 0,51. Acht Monate nach chirurgischer Revaskularisation zeigt der Patient normale linksventrikuläre kontraktile Funktion und eine normale EF von 0,76. LVEDV, linksventrikuläres enddiastolisches Volumen; LAD, "left anterior descending coronary artery" = RIVA; (aus Rahimtoola, 1982).

### 1.1.5 Tiermodelle der myokardialen Ischämie und Reperfusion

Untersuchungen an Tiermodellen verwenden über mehrere Tage bis Wochen entweder Ameroidkonstriktor oder partielle Koronarstenose des Ramus circumflexus der linken Koronararterie bei Hunden und Schweinen. Eine Übersicht bietet der Reviewartikel von Gerd Heusch [Heusch, 1998]. Er charakterisiert diese Tiermodelle, bei denen im Verlauf von wenigen Tagen bis Wochen einige Merkmale des menschlichen hibernierenden Myokards auftreten, als "short-term"-Hibernation. Hundemodelle wurden von Gruppen wie Schaper et al. [Jageneau et al., 1969; Schaper et al., 1969 a, b] und Michael et al. [Michael et al., 1979] zum Modell des hibernierenden Myokards weiterentwickelt. Als ein weiteres Großtiermodell wurde das Schweinmodell entwickelt [z.B. Millard, 1981]. Alle diese Modelle sind jedoch mit Einschränkungen verbunden, z.B. dem Auftreten von Nekroseinseln und erhöhter Apoptose bei Schweinen sowie dem Bestehen von nativen Kollateralgefäßen im Hundeherzen [Camici et al., 1997; Fallavollita et al., 2001].

Die genannten Großtiermodelle bieten bessere Möglichkeiten, die regionale kontraktile Ventrikelfunktion zu untersuchen, und diagnostische Methoden wie Echokardiographie oder PET lassen sich leicht durchführen. An Kleintiermodellen, z.B. Ratte und Maus [Horiuchi et al., 2000; Michael et al., 1995; Selye, 1960], lassen sich hingegen funktionale mechanisch-zellbiologische Parameter besser bestimmen, da vor allem bei der Maus vielfältigste Möglichkeiten bestehen, für spezielle Fragestellungen transgene Tiere herzustellen. Kein Säugetier ist auf molekulargenetischer Ebene vollständiger untersucht und besser manipulierbar als die Maus [Paigen, 1995].

Verdouw [Verdouw et al., 1998] unterscheidet weiter in zwei Kategorien: 1.) "open chest"-Modelle, in denen regionale Funktion und Metabolismus im Detail untersucht werden können. Bei diesen Modellen handelt es sich meistens um Kurzzeitstudien, z.B. Infarkt mit Reperfusion. 2.) "closed chest"-Modelle, in denen das Gewebstrauma minimiert ist. Vor allem aber bietet sich hier die Möglichkeit, Langzeitstudien vorzunehmen, z.B. repetitive I/R, um Situationen wie eine chronisch ischämische Kardiomyopathie zu simulieren. Chronisch instrumentierte "closed chest"-Tiermodelle sind daher die erste Wahl, um Myokardischämie mit chronischer Kardiomyopathie beim Menschen zu simulieren.

### 1.1.6 Tiermodelle am Baylor College of Medicine

Am Baylor College of Medicine in Houston, TX, USA, wurde von Michael et al. [Michael et al., 1995] ein Mausmodell der I/R entwickelt, um die inflammatorische Reaktion im Myokard zu untersuchen. In einem "open chest"-Eingriff wurde eine Ligatur um den Ramus interventricularis anterior (RIVA) angebracht, die das Gefäß entweder permanent, oder für 30 bzw. 60 Minuten total okkludierte. Durch Entfernung der Ligatur wurde daraufhin der RIVA reperfundiert. Danach erholte sich die Maus, und es konnten Stunden bis Wochen postoperativ Untersuchungen durchgeführt werden. Der RIVA wurde von Michael et al. in einer weiteren Studie als Hauptversorgungsast des linken Ventrikels beschrieben [Michael et al., 1995].

Dieses Mausmodell wurde von Nossuli et al. [Nossuli et al., 2000] weiterentwickelt, um den Einfluss des operativen Traumas von der Pathophysiologie des I/R-Ereignisses abzugrenzen. In diesem "chronic ischemia model" wurde in einer initialen Operation die Ligatur um den RIVA gelegt, durch die Thoraxwand gebracht und subkutan verstaut. Nach Thorax- und Hautverschluss erholten sich die Tiere für 3 Stunden bis 1 Woche ("closed chest"). Anschließend wurde die Haut wieder geöffnet, die Ligatur freigelegt und zur Okklusion des RIVA auseinandergezogen. Die Reperfusion wurde durch die Entfernung der Ligatur eingeleitet. Mithilfe dieses Modells wurde ausserdem die Rolle von Chemokinen nach I/R untersucht, und es zeigte sich, dass eine einmalige I/R-Episode (15 Minuten I, 3 Stunden R) zu einer Sauerstoffradikal-abhängigen Induktion von Chemokinen führt [Nossuli et al., 2001].

Dewald et al. haben dieses Modell weiter modifiziert, sodass die I/R beliebig oft wiederholt werden kann [Dewald et al., 2003]. Die Ergebnisse der vorliegenden Dissertation sind ein Bestandteil des größeren Forschungsvorhabens mit dem Modell der repetitiven I/R, welches auf histopathologische, funktionelle und molekularbiologische Aspekte der Inflammation, des Remodelings und der Regression eingeht. In diesem Modell kommt es zu einer interstitiellen Fibrose, die mit einer ventrikulären Dysfunktion im Rahmen einer ischämischen Kardiomyopathie assoziiert ist. Dieser Phänotyp ist reversibel, wenn man die I/R-Episoden beendet, und hat Merkmale des hibernierenden Myokards beim Menschen.

## 1.2 Pathomechanismen der ventrikulären Dysfunktion im hibernierenden Myokard

Chronische linksventrikuläre Dysfunktion bei vitalem, aber hibernierendem Myokard in Menschen geht mit zellulären und extrazellulären strukturellen Veränderungen einher [Vanoverschelde et al., 1993, 1999, 2001; Elsässer et al., 1995, 1997, 1998; Lim et al., 1999; Shimoni et al., 2002]. So zeigen Kardiomyozyten in hibernierenden Arealen u.a. eine Abnahme kontraktiler Elemente, eine Umstellung des Stoffwechsels von aerob auf anaerob und mitochondriale sowie nukleäre Strukturveränderungen [Ausma et al., 1995 a, b; Borgers et al., 1993; Dispersyn et al., 1999; Elsässer et al., 1995, 1997, 1998; Depre et al., 1995, 1997; Frangogiannis et al., 2002 a, b; Maes et al., 1995]. Kardiomyozyten können eine Entdifferenzierung durchlaufen, was sich durch erhöhte Re-Expression von kontraktilen Proteinen des fetalen Herzens wie "alpha-Smooth Muscle Actin" ( $\alpha$ -SMAc) und Tenaszin manifestiert. Die Veränderung der extrazellulären Matrix zeichnet sich durch interstitielle Fibrose in einem vergrößerten interstitiellen Raum mit einer Zunahme von Kollagen sowie transienter Tenaszinexpression, Makrophagen- und Myofibroblastenakkumulation aus [Ausma et al., 1995 a, b; Borgers und Ausma, 1995; Elsässer et al., 1997, 1998; Flameng et al., 1998; Maes et al., 1994, 1995; Willems et al., 1996].

Die Rolle der Fibrose wird in diesem Zusammenhang kontrovers diskutiert. Elsässer et al. interpretieren die Fibrose als Resultat des Myozytenverlusts und bezeichnen sie daher als "replacement fibrosis" oder "reparative fibrosis" [Elsässer et al., 1998]. Der stark erhöhte Kollagengehalt in der extrazellulären Matrix führt zur Versteifung und somit zu einer verminderten Ejektionsfraktion des Myokards, vor allem wegen der Rigidität des Typ-I-Kollagens [Ausma et al., 1995 a, b]. Die Fibrose hat sowohl eine erniedrigte Ventrikelcompliance als auch eine verschlechterte elektrische Leitung im Myokard zur Folge [Covell, 1990; Doering et al., 1988; Jalil et al., 1988, 1989 a, b; Weber et al., 1993 a]. Beim menschlichen hibernierenden Myokard wurde ein direkter Zusammenhang zwischen Fibrosegrad und regionaler Dysfunktion nachgewiesen [Ausma et al., 1995 a, b; Borgers und Ausma, 1995; Depre et al., 1995, 1997; Elsässer et al., 1998; Flameng et al., 1981; Maes et al., 1994; Nagueh et al., 1999; Vanoverschelde et al., 1993, 2001]. Die Hypothese der "replacement fibrosis" steht im Gegensatz zu den Befunden des revaskularisierten, vormals hibernierenden Myokards, welches nach Erholung eine normale Pumpfunktion aufweist. Daher wird die Fibrose von anderen Gruppen als "reaktive fibrosis" und somit als potenziell reversibel angesehen [Ausma et al., 1995 a; Borgers und Ausma, 1995; Maes et al., 1994, 1995].

Im ischämischen Gewebe differenzieren sich Fibroblasten zu Myofibroblasten und exprimieren neben  $\alpha$ -SMAc auch das matricelluläre Protein Tenascin, das beim aktiven Remodeling eine regulative Rolle spielt [Frangogiannis et al., 2002 a, b]. Bei dieser Differenzierung wird dem "Transforming Growth Factor- $\beta$ " (TGF- $\beta$ ) eine aktive Rolle zugeschrieben [Frangogiannis et al., 2002 a, b, c]. Aktivierte Myofibroblasten regulieren die Fibrose und den Gewebsumbau durch Synthese von extrazellulären Matrixproteinen und Metalloproteinasen (MMPs) [Frangogiannis et al., 2002 a, b, c]. Die Rolle eines weiteren Proteins der extrazellulären Matrix, des Phosphoproteins Osteopontin (OPN), wurde in einem Myokardinfarktmodell an OPN-Knockout-Mäusen untersucht und in der Regulation von Kollagensynthese und -ablagerung sowie Remodeling nach Infarkt nachgewiesen [Trueblood et al., 2001].

### **1.3 Inflammatorische Reaktion auf myokardiale Ischämie und Reperfusion**

#### **1.3.1 Die Zytokinkaskade - Initiierung des Entzündungsprozesses**

In Modellen der I/R mit Infarktgeschehen kommt es im Zuge einer inflammatorischen Reaktion zur Komplementaktivierung und Bildung von freien Sauerstoffradikalen, die eine durch Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) initiierte Zytokinkaskade auslösen [Frangogiannis et al., 2002 c]. Reperfusion eines infarzierten Bereichs hat zunächst eine intensive inflammatorische Reaktion mit gewebsschädigenden Effekten zur Folge [Frangogiannis et al., 1998 a]. TNF- $\alpha$  induziert Interleukin-8 (IL-8) sowie "Monocyte Chemoattractant Protein-1" (MCP-1) und spielt zusammen mit Faktor C5a-Aktivierung eine wichtige Rolle in der Neutrophilenrekrutierung im reperfundierten Myokard [Kulielka et al., 1995 a]. Marginierte intravasale Neutrophile vermitteln zytotoxische Effekte durch die Ausschüttung proteolytischer Enzyme und Adhäsion mit "Intercellular Adhesion Molecule-1" (ICAM-1)-exprimierenden Kardiomyozyten. Neutrophilen-Myozyten-Adhäsion führt zu Myozytenschädigung durch direkten Transfer von Sauerstoffradikalen [Entman et al., 1992].

Tierexperimentell wurde ein Übermaß an Sauerstoffradikalen in der ersten Minute nach Reperfusion beschrieben ("oxidative burst"), welches nach 4 bis 7 Minuten kumuliert und zum initialen Gewebsschaden führt [Kloner und Jennings, 2001 a, b]. Entstehende Superoxid-Anionen können über die Bildung von Sauerstoffradikalen auch Zellschäden verursachen. Unter physiologischen Bedingungen wird der zytotoxische Effekt der Sauerstoffradikale von

verschiedenen Enzymen, z.B. Peroxidasen, Superoxiddismutasen (SODs) und Katalasen abgeschwächt und der Gewebsschaden verhindert [Anaya-Prado et al., 2002]. SODs sind Metalloenzyme, die Superoxid-Anionen in Sauerstoff und Wasserstoffperoxid konvertieren [Tarpey und Fridovich, 2001]. Es sind drei verschiedene SOD-Varianten in Eukaryonten beschrieben: die mitochondriale, die zytosolische und die extrazelluläre Form, die z.T. synergistisch wirken [Bowler et al., 2002; Oury et al., 1992; Roussel et al., 2001].

TGF- $\beta$ -Freisetzung aus ischämisch verletzten Zellen sowie MCP-1-Freisetzung im ischämischen und infarzierten Myokard führen zur Einwanderung mononukleärer Zellen [Kumar et al., 1997]. Monozytäre Makrophagen und Mastzellen produzieren Zytokine und Wachstumsfaktoren, z.B. "basic Fibroblast Growth Factor" (bFGF) und "Vascular Endothelial Growth Factor" (VEGF), die zu Fibroblastenproliferation und Gefäßneubildung führen und damit Gewebsreparation implizieren. Die Makrophagenmaturation wird dabei durch "Macrophage Colony-Stimulating Factor" (M-CSF) während der Reperfusion vermittelt und ist mit vermehrter OPN-Expression verbunden. Die Mastzellendifferenzierung und -einwanderung wird durch den "Stem Cell Factor" (SCF) vermittelt [Frangogiannis et al., 1998 a, c]. Die überschießende Inflammation im Reperfusionsgebiet wird durch IL-10 supprimiert, welches außerdem MMPs supprimiert und "Tissue Inhibitors of Metalloproteinases" (TIMPs) stimuliert [Lacraz et al., 1995].

In einem Hundemodell mit I/R ohne Infarkt von Frangogiannis et al. kam es auch zu einem dynamischen kontinuierlichen inflammatorischen Prozess, der mit MCP-1-Expression und aktiver Leukozytenrekrutierung im Myokard assoziiert war [Frangogiannis et al., 2002 c]. In ihrem Mausmodell mit einmaliger kurzer I/R (15 Minuten I, 3 Stunden R) ohne Infarkt beschrieben Nossuli et al. eine durch Sauerstoffradikale induzierte Hochregulation der Chemokine "Macrophage Inflammatory Protein-2" (MIP-2), MIP-1 $\alpha$  und MIP-1 $\beta$  [Nossuli et al., 2001]. Diese fand vor allem im Endothel von Venulen des reperfundierten Myokards statt, und war von TNF- $\alpha$ -Expression unabhängig. Dieses Modell wies auf die Möglichkeit einer leukozytenunabhängigen Chemokininduktion hin, da in Abwesenheit von Infarkt keine signifikant erhöhte Leukozytenzahl im ischämischen Gewebe erkennbar war.

### 1.3.2 Die Rolle der Chemokine in Ischämie und Reperfusion

Die Chemokine sind erst in den letzten Jahrzehnten als eine Untergruppe der Zytokine beschrieben worden und werden seitdem auch im Zusammenhang mit Inflammation bei myokardialer Ischämie intensiv erforscht. Chemokine haben unterschiedliche biologische Funktionen, wie etwa die selektive Rekrutierung spezifischer Leukozyten zu Gewebsarealen mit Inflammation oder Verletzung [Baggiolini et al., 1994; Lukacs et al., 1999]. Die meisten Chemokine haben vier charakteristische Cysteine (C), und abhängig von dem Motiv der ersten beiden Cysteine werden sie in CXC-, CC-, C- und CX3C-Chemokine unterteilt [Rossi und Zlotnik, 2000]. Das "X" steht dabei für eine variable Aminosäure, die die ersten zwei Cysteine voneinander trennt. Zusätzlich ist die CXC-Familie in zwei Gruppen unterteilt, abhängig von Glutaminsäure-Leucin-Arginin (ELR), das dem CXC-Motiv unmittelbar vorausgeht: ELR-CXC-Chemokine und non-ELR-CXC-Chemokine [Chandrasekar et al., 2001]. ELR-CXC-Chemokine sind potente angiogenetische und Neutrophilen-chemotaktische Faktoren, während die meisten non-ELR-CXC-Chemokine starke angiostatische Faktoren sind, welche die durch ELR-CXC-Chemokine induzierte Chemotaxis endothelialer Zellen und Neutrophiler inhibieren [Rossi und Zlotnik, 2000; Chandrasekar et al., 2001].

Im Verlauf des letzten Jahrzehnts wurde nachgewiesen, dass Chemokine schnelle und selektive Leukozytentransmigration induzieren [Baggiolini, 1998; Chosay et al., 1997; Rollins, 1997; Doenicke et al., 1995]. Neutrophile, die im ischämisch-reperfundierten Gewebe akkumulieren, könnten proteolytische Enzyme und freie Sauerstoffradikale freisetzen und so die umgebenden Myozyten verletzen [Chosay et al., 1997; Jaeschke und Smith, 1997 a, b]. Zumindest wurden diese toxischen Produkte in vivo fast ausschließlich von adhärenenten Neutrophilen sezerniert. Infiltrierende mononukleäre Zellen und Mastzellen scheinen unter anderem die Reparationsprozesse im Gewebe durch eine komplexe Kaskade zu beeinflussen, die Zytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren involviert [Frangogiannis et al., 2002 c].

Eines der wichtigsten chemotaktischen Chemokine für die Rekrutierung von Leukozyten, vor allem aber von mononukleären Zellen, ist das CC-Chemokin MCP-1. Es wurde gezeigt, dass MCP-1 die feste Adhäsion von Monozyten an Endothel vermittelt [Gerszten et al., 1999] und außerdem die Formveränderung und transendotheliale Migration von Monozyten induziert [Weber et al., 1999 b, c, d, e, f, g]. Eines der frühen Merkmale nach Reperfusion von infarziertem Myokard ist die starke Induktion von MCP-1 in Venulen [Kumar et al., 1997]. Frangogiannis et al. demonstrierten, dass dieses Molekül ein starkes chemotaktisches Signal für mononukleäre

Zellmigration in reperfundiertes infarziertes Myokard ist [Frangogiannis et al., 1998 a; Kumar et al., 1997]. Die Synthese von MCP-1-mRNA in kardialen Venulen des reperfundierten Myokards korrespondiert mit der Region, in der Leukozyten lokalisiert sind [Lakshminarayanan et al., 2001] und wird zum Teil durch proinflammatorische Zytokine wie TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  induziert [Shyy et al., 1995; Sica et al., 1990; Weber et al., 1999 b].

Bei MIP-1 $\alpha$  handelt es sich - ebenso wie bei MIP-1 $\beta$  - um ein Chemokin der CC-Gruppe mit inflammatorischen Eigenschaften [Wang et al., 1998]. MIP-2 ist ein proinflammatorisches ELR-CXC-Chemokin [Olson und Ley, 2002], das polymorphonukleäre Leukozyten und Monozyten stimuliert und so eine regulatorische Rolle in der myokardialen Ischämie spielt [Chandrasekar et al., 2001; Massey et al., 1995; Tarzami et al., 2001]. Es wird von inflammatorischen Zellen exprimiert, die das reperfundierte Myokard nach Ischämie infiltrieren [Chandrasekar et al., 2001]. Außerdem wurde berichtet, dass Kardiomyozyten der Ratte nach längerer Stimulation mit IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  und Lipopolysaccharid (LPS) das Chemokin MIP-2 sezernieren, was vermuten ließ, dass Myozyten nach Stimulation mit inflammatorischen Zytokinen direkt aktivierte Leukozyten in verletzte Gewebsareale rekrutieren [Massey et al., 1995].

Interferon  $\gamma$ -Inducible Protein-10 (IP-10) ist ein non-ELR-CXC-Chemokin, das auch bei der Aktivierung von Monozyten/Makrophagen eine Rolle spielt [Booth et al., 2002; Frangogiannis et al., 2001]. CXC-Chemokin-Rezeptor-3 (CXCR3) ist ein Rezeptor für einige Chemokine der CXC-Gruppe, wie z.B. IP-10. Er wird ausschließlich auf lymphozytären Zellen exprimiert [Loetscher et al., 1996, 1998, 2001; Qin et al., 1998].

## **1.4 Arbeitshypothesen**

In der vorliegenden Arbeit werden unter Verwendung des Mausmodells der repetitiven, kurzen I/R am Herzen folgende Hypothesen untersucht:

- 1.) repetitive, kurze I/R führt zu einer reversiblen, ventrikulären Dysfunktion,
- 2.) die Entstehung dieser ventrikulären Dysfunktion wird durch eine Entzündungsreaktion vermittelt, in der Chemokine und Zytokine eine Rolle spielen,
- 3.) die Induktion der Chemokine und Zytokine wird durch Sauerstoffradikale reguliert.

## **2 Methoden**

### **2.1 Modell der myokardialen Ischämie und Reperfusion bei Mäusen**

#### **2.1.1 Wildtypmäuse**

In der vorliegenden Arbeit wurden C57/BL6-WT-Mäuse im Alter von 8 bis 12 Wochen und einem Körpergewicht von 18 bis 20 g von der Firma Harlan Sprague Dawley (Houston, TX, USA) verwendet.

#### **2.1.2 Extrazelluläre Superoxiddismutase-überexprimierende Mäuse**

Die heterozygot transgenen, EC-SOD-überexprimierenden Mäuse wurden freundlicherweise von Dr. James D. Crapo, National Jewish Institute of Medicine, Denver, CO, USA, bereitgestellt. Das Metalloenzym EC-SOD ist ein tetrameres Cu/Zn enthaltendes Glykoprotein [Oury et al., 1992]. Die Versuchstiere wurden im Rahmen der Studie selbst gezüchtet, indem man weibliche WT-Mäuse mit männlichen EC-SOD-Mäusen verpaarte. Die Heterozygotie der neugeborenen Mäuse für das EC-SOD-positive Merkmal wurde durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit Mäuseschwanz-DNA getestet. Die Versuche wurden an EC-SOD-Mäusen durchgeführt, die das gleiche Alter und Gewicht wie die WT-Mäuse hatten.

Zur Unterbringung der Mäuse standen separate, vollklimatisierte Räume im eigenen dezentralen Tierstall des Methodist Hospitals in unmittelbarer Nähe des Tierlabors zur Verfügung. Diese Räumlichkeiten sind Teil der Tierstalleinrichtungen des Baylor College of Medicine, Houston, TX, USA; sie stehen unter Kontrolle des Center for Comparative Medicine am Baylor College of Medicine und sind von den amerikanischen Bundesbehörden genehmigt. Ein Tierversuchsantrag wurde vom "Baylor Animal Care Committee" genehmigt und stand im Einklang mit den Auflagen des National Institute of Health (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, NIH Publikation 85-23, revidiert 1985).

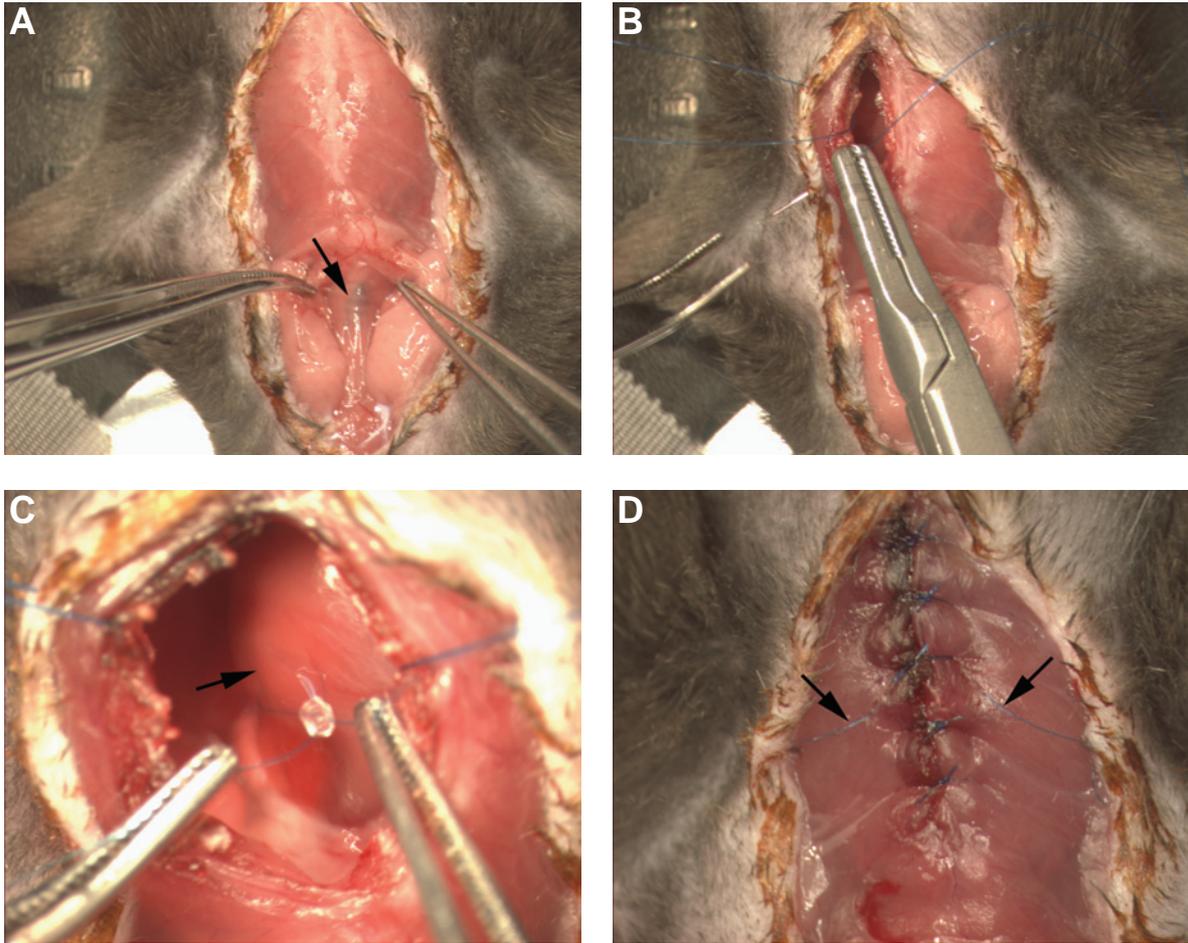
### 2.1.3 Operationsprotokoll des initialen Eingriffs

Die Grundlage bildete das Modell der myokardialen I/R von Nossuli et al. [Nossuli et al., 2000]. Die Anästhesie der Versuchstiere wurde durch eine intraperitoneale Injektion eines Natrium-Pentobarbital-Gemisches (60 µg/g Körpergewicht) durchgeführt. Es bestand aus 1,8 ml Natrium-Pentobarbital (Nembutal, 50 mg/ml; Abbott Laboratories, North Chicago, IL, USA), 4 ml 100%igem Ethanol (Aaper Co., Shelbyville, KY, USA) und 16 ml 0,9%iger NaCl-Lösung (Baxter, Deerfield, IL, USA). Die Mäuse wurden am Thorax rasiert und in Rückenlage an den Extremitäten auf einem Operationstisch fixiert. Die Körpertemperatur wurde mittels einer Rektalsonde gemessen und durch eine Wärmelampe reguliert. Um den Zugang zur Trachea zu erleichtern, wurde der Nacken leicht überstreckt, indem eine 3-0-Seidenfadenschlinge (Surgical Silk; Ethicon, Somerville, NJ, USA) in angemessener Spannung um die oberen Nagezähne gelegt wurde. Die Haut wurde anschließend mit Betaisodona (Professional Disposables, Orangeburg, NY, USA) desinfiziert. Der Hautschnitt erfolgte unter Sichthilfe eines Mikroskops (Stemi 2000-CS; Zeiss, Jena, Deutschland) medial von submental bis zum Xiphoid, und die Hautlappen wurden nach lateral präpariert. Peritracheales Fettgewebe sowie Muskulatur wurden seitwärts verschoben und die Trachea freigelegt. Die Intubation erfolgte nach dem Überstrecken der Zunge mit einem aus Polyethylen (PE) gefertigten PE-90-Tubus (Becton Dickinson, Sparks, MD, USA). Die richtige Tubustiefe (ca. 5-8 mm distal des Larynx) wurde unter Sichtkontrolle überprüft (Abb. 2A). Das freie Tubusende wurde über einen PE-160-Verbindungsschlauch an ein Ventilationsgerät (Mini Vent Typ 845; Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Deutschland) angeschlossen und am Operationstisch fixiert. Die Beatmung erfolgte mit 100%igem Sauerstoff, einem Atemminutenvolumen von 200 ml und einer Atemfrequenz von ca. 110/Minute.

Blutgefäße in der suprasternalen Muskulatur wurden mithilfe eines Koagulationsgerätes (Codman, Randolph, MA, USA) verödet. Die Thorakotomie erfolgte links parasternal unter Durchtrennung der dritten bis fünften Rippe mit anschließender Blutstillung. Der Thorax wurde durch eine rechtsseitige und zwei linksseitige transthorakale 6-0-Prolene<sup>®</sup>-Nahtschlingen (Ethicon) offen gehalten (Abb. 2B). Die Perikardiotomie erfolgte stumpf, und der RIVA wurde lokalisiert. Eine 8-0-Prolene<sup>®</sup>-Ligatur (Ethicon) wurde in unmittelbarer Nähe des linken Atriums (1-3 mm) um den RIVA vorgelegt. Um dieses Manöver zu erleichtern, wurde die Nadel u-förmig gebogen. Die Fadenenden wurden anschließend durch einen 0,5 mm lang geschnittenen und in 100%igem Ethanol desinfizierten PE-10-Tubus (Becton Dickinson) gefädelt (Abb. 2C). Mithilfe einer Kalt-Nadel (Größe 3; Fine Science Tools, Lausanne, CH) wurden die beiden Fadenenden an beiden Seiten transthorakal geführt und in subkutanen Hauttaschen verstaut (Abb. 2D).

Der Thoraxverschluss erfolgte durch drei bis vier 6-0-Prolene<sup>®</sup>-Nähte. Besondere Vorsicht galt der Arteria thoracica interna und der rechten Lunge. Die Lunge wurde vor dem Festziehen der letzten Naht durch kurzes Abklemmen des Tubus aufgebläht und die Beatmung beendet. Die Spontanatmung setzte in der Regel innerhalb von einer Minute ein und die Maus atmete 100%igen Sauerstoff bis zum Ende des Eingriffs. Zur Infektionsprophylaxe wurde die Thoraxwunde topisch mit dem Antibiotikum Cefazolin (Apothecon, Princeton, NJ, USA) behandelt. Die Hautwunde wurde zuletzt mit einer 6-0-Prolene<sup>®</sup>-Naht wieder verschlossen. Am Ende des Eingriffs wurde der Tubus entfernt und 0,5 ml isotonische NaCl-Lösung intraperitoneal als Volumenersatz appliziert. Das Aufwachen der Mäuse wurde durch eine Heizlampe und Sauerstoff unterstützt.

Nach diesem operativen Eingriff folgte für die Versuchstiere eine 7- bis 10-tägige Erholungsphase. Diesem Operationsprotokoll wurden sowohl die WT-Mäuse als auch die EC-SOD-Mäuse unterzogen.



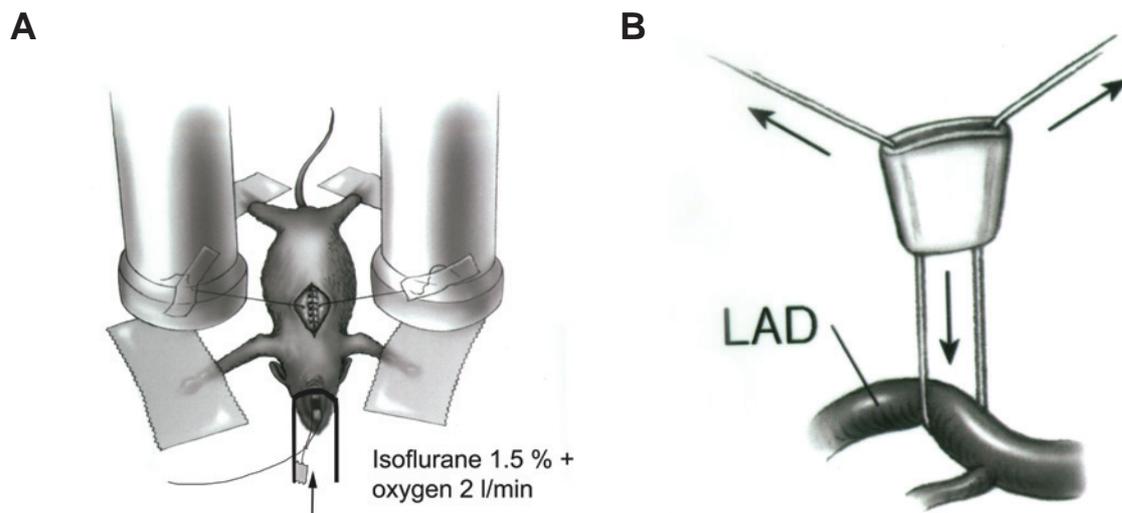
**Abbildung 2.** Verlauf des Initialeingriffs: (A) Darstellung der Trachea mit eingeführtem Tubus (Pfeil; Vergrößerung X 10); (B) Platzieren der 6-0-Prolene<sup>®</sup>-Nähte nach Thorakotomie (Vergr. X 10); (C) Fadenenden der RIVA-Schlinge eingefädelt durch ein Stück PE-10-Tubus, Pfeil zeigt auf RIVA (Vergr. X 30); (D) verschlossener Thorax mit transthorakal geführten und subkutan gelagerten Fadenenden der RIVA-Schlinge (Pfeile; Vergr. X 20). RIVA, Ramus interventricularis anterior; (mit freundlicher Genehmigung von Martin Zörlein).

#### 2.1.4 Ischämie- und Reperfusionprotokoll

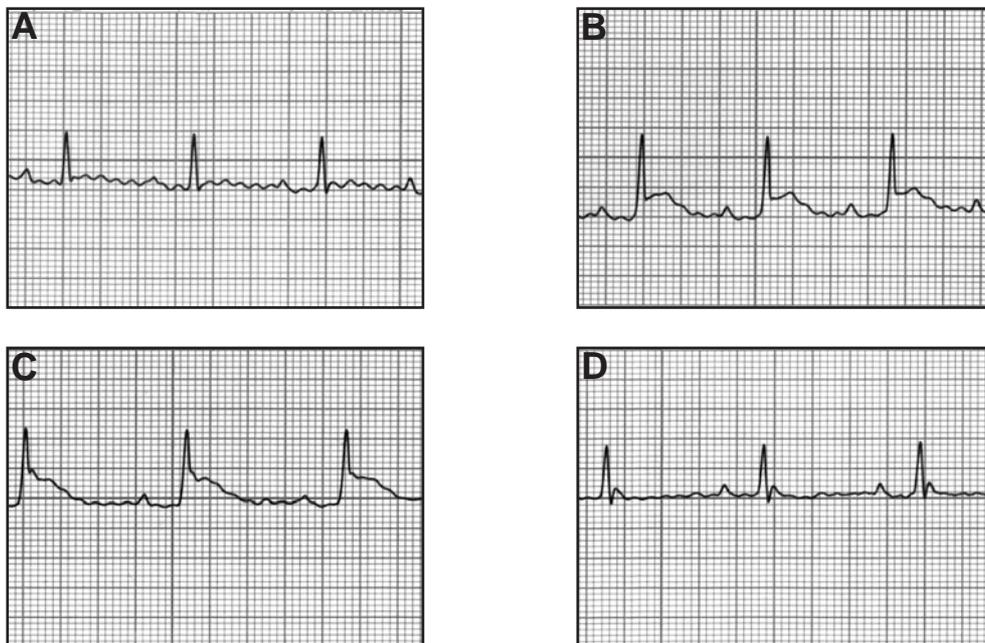
Das Protokoll der repetitiven kurzen I/R bestand aus täglichen, 15-minütigen Ischämieereignissen und dazwischen liegender 24-stündiger Reperfusion; die Ischämieereignisse wurden in größer werdenden Zeitblöcken jeweils 3, 5, 7, 14, 21 und 28 Tage lang wiederholt.

Die tägliche 15-minütige Ischämie erfolgte bei Spontanatmung unter 1,5%iger Isofluran-Anästhesie (Isoflo; Abbott Laboratories) und 1 l/min Sauerstofffluss über eine Nasenmaske. Die Mäuse wurden in Rückenlage an ihren Extremitäten mittels Klebeband und EKG-Creme (Signa Elektrode Cream; Parker Laboratories, NJ, USA) auf EKG-Ableitungsflächen am Operationstisch befestigt (Abb. 3A). EKG-Aufzeichnungen wurden anhand der zweiten Ableitung nach Einthoven vorgenommen. Die Hautnaht wurde entfernt und die Haut nur wenige Millimeter im Bereich der fünften Rippe eröffnet. Die dort zuvor platzierten Fadenenden der RIVA-Schlinge wurden an mobilen Metallzylindern befestigt. Unter Betrachtung des EKGs wurden die Metallzylinder vorsichtig auseinander gezogen, wodurch die Ligatur zugezogen und der RIVA okkludiert wurde (Abb. 3B), bis eine ST-Streckenhebung als Ischämiezeichen auftrat (Abb. 4A und B). Die Ischämie wurde daraufhin 15 Minuten lang aufrechterhalten. Danach wurden die Fadenenden von den Metallzylindern entfernt und die erfolgreiche Reperfusion durch die Normalisierung der ST-Strecke bestätigt (Abb. 4C und D). Sie dauerte bis zum nächsten Ischämieeingriff nach 24 Stunden. Die Fadenenden wurden wieder in den Hauttaschen verstaut, Cefazolin (Apothecon) als topische Infektionsprophylaxe auf die Wunde appliziert und die Haut mit einer 6-0-Prolene<sup>®</sup>-Naht verschlossen. Zuletzt wurden der Maus 0,5 ml Buprenorphin (2,5 µg/g Körpergewicht; Apothecon) als Analgetikum intraperitoneal injiziert.

Die EKG-Aufzeichnungen nach der zweiten Ableitung von Einthoven wurden vor, am Anfang und am Ende der Ischämie sowie nach Hautverschluss - Reperfusion - vorgenommen. Das Protokoll galt wiederum sowohl für die WT-Mäuse als auch für die EC-SOD-Mäuse.



**Abbildung 3.** Skizze des Versuchsaufbaus der täglichen I/R: (A) Die Maus wird wie dargestellt auf den EKG-Elektroden befestigt und atmet spontan über eine Nasenmaske das Isoflurane-Sauerstoffgemisch ein; (B) Die RIVA-Schlinge wird durch Auseinanderziehen der an Metallzylindern befestigten Fadenenden festgezogen und damit die Ischämie induziert. LAD, "left anterior descending coronary artery" = RIVA; RIVA, Ramus interventricularis anterior; (modifiziert nach Nossuli et al., 2000).



**Abbildung 4.** EKG-Aufzeichnung (Ableitung II) der täglichen Ischämie und Reperfusion: (A) normales EKG vor der Ischämie; (B) ST-Streckenhebung bei Beginn der Ischämie und (C) am Ende der Ischämie; (D) Normalisierung des EKGs nach erfolgreicher Reperfusion.

### 2.1.5 Gruppendifinition

#### *Wildtypmäuse*

Die WT-Mäuse wurden, entsprechend der Behandlung, der sie unterworfen wurden, in folgende Gruppen eingeteilt:

1.) Nativgruppe: Herzen nativer WT-Mäuse wurden entnommen, um die Chemokin- und Zytokin-mRNA-Expression ohne chirurgisches Trauma zu untersuchen.

2.) Kontrollgruppen: Bei den Mäusen der Kontrollgruppen wurde die initiale Operation, aber kein I/R-Protokoll durchgeführt. Die Herzentnahme erfolgte nach einer 7-tägigen Erholungsphase nach Initial-OP (0-Tage-Kontrollgruppe) sowie nach den Zeitabständen der entsprechenden I/R-Gruppen (3-, 5-, 7-, 14-, 21- und 28-Tage-Kontrollgruppe). Die Untersuchung der mRNA der Kontrollgruppen-Tiere sollte Aufschluss über die Induktion der Chemokine und Zytokine durch das Trauma der Initialoperation geben, um diese unerwünschte Induktion später von der mRNA-Induktion durch die I/R-Ereignisse unterscheiden zu können.

3.) I/R-Gruppen: Die Mäuse der I/R-Gruppen wurden ab dem 7. Tag nach der initialen Operation täglich dem I/R-Protokoll unterzogen, und zwar für unterschiedliche Zeitspannen: Dementsprechend wurden die 3-, 5-, 7-, 14-, 21- und 28-Tage-I/R-Gruppen erstellt, um den Verlauf der durch I/R verursachten mRNA-Induktion in diesem Zeitraum zu verfolgen.

4.) Regressionsgruppen: Nach einem 7-tägigen I/R-Protokoll folgte ein 15- bzw. 30-tägiges Erholungsintervall ohne I/R. In dieser 7-Tage-I/R + 15-Tage- bzw. 30-Tage-Regressionsgruppe sollte untersucht werden, ob Chemokine und Zytokine eine Rolle in der Erholung von den I/R-Ereignissen spielen. Die Regressionsgruppen in dem vorliegenden Mausmodell dienen der Simulation einer Revaskularisation am Menschen.

#### *EC-SOD-Mäuse*

Wie die WT-Mäuse wurden auch die EC-SOD-Mäuse, entsprechend der durchgeführten Behandlung, in folgende Gruppen eingeteilt:

1.) Nativgruppe: Hier wurde das Herz ohne vorhergehende Behandlung extrahiert.

2.) Kontrollgruppen: Es wurde die initiale Operation, aber kein I/R-Protokoll durchgeführt. Die EC-SOD-Kontrollmäuse wurden in die 0-Tage-Kontrollgruppe, aber wie die entsprechenden EC-SOD-I/R-Gruppen nur in 3-, 5- und 7-Tage-Kontrollgruppen eingeteilt.

3.) I/R-Gruppen: Anders als bei den WT-Mäusen wurde bei den EC-SOD-Mäusen das I/R-

Protokoll nur 3 bis 7 Tage angewendet (mit jeweils 3-, 5- und 7-Tage-I/R-Gruppen). Regressionsgruppen wurden bei den EC-SOD-Mäusen nicht erstellt.

## 2.2 Untersuchung der ventrikulären Pumpfunktion - Echokardiographie

Echokardiographische Messungen wurden jeweils 5 Stunden nach der letzten Ischämie-episode bzw. nach Ablauf des Erholungsintervalles bei den Regressionsgruppen mittels eines 8 MHz-Schallkopfes (Sequoia C256; Acuson, Mountain View, CA, USA) durchgeführt. Anhand von jeweils 3 M-Mode-Aufnahmen in kurzer Achse wurden systolischer und diastolischer Durchmesser des linken Ventrikels sowie die Vorderwanddicke gemessen.

Um die Ventrikelfunktion der WT- und EC-SOD-Mäuse zu beschreiben, wurden aus diesen Daten die Fraktionsverkürzung ("fractional shortening", FS) und die Vorderwandverdickung ("anterior wall thickening", AWT) berechnet (Formel s.u.). Die FS gibt Auskunft über die globale linksventrikuläre Pumpfunktion und wird aus den systolischen (LV<sub>syst</sub>) und den diastolischen (LV<sub>diast</sub>) linken Ventrikeldurchmessern bestimmt. Die AWT beschreibt die regionale Pumpfunktion der Vorderwand. Sie errechnet sich aus den Werten der systolischen (VW<sub>syst</sub>) und diastolischen Vorderwanddicke (VW<sub>diast</sub>).

$$FS(\%) = \frac{LV_{diast} - LV_{syst}}{LV_{diast}} \times 100$$

$$AWT(\%) = \frac{VW_{syst} - VW_{diast}}{VW_{syst}} \times 100$$

Im Rahmen weiterer Untersuchungen des Projekts [Dewald et al., 2003] wurden für die Regressionsstudien auch Gruppen mit 7 bzw. 28 Tagen I/R und 30 bzw. 60 Tagen Erholung durchgeführt. Die dazugehörigen echokardiographischen Daten werden hier dargestellt, die Untersuchung der Chemokine erstreckte sich jedoch nur auf die oben genannten Intervalle.

## **2.3 Probenaufbereitung**

### **2.3.1 Gewinnen der Gewebeproben**

Der Maus wurde am letzten Versuchstag nach 5-stündiger Reperfusion eine letale Dosis (120 µg/g Körpergewicht) Natrium-Pentobarbital-Gemisch (Abbott Laboratories) intraperitoneal verabreicht. Sie wurde dann an den Extremitäten in Rückenlage am Operationstisch fixiert, wobei der Nacken leicht überstreckt wurde, um den operativen Zugang zu erleichtern. Ein v-förmiger Hautschnitt wurde von der Höhe des Manubrium sterni beidseits bis kurz unterhalb des Rippenbogens geführt. Die Thorakotomie erfolgte durch einen u-förmigen Rippenschnitt von der rechten sechsten Rippe medioklavikulär über das proximale Manubrium sterni bis zur linken sechsten Rippe medioklavikulär. Nach Entfernen der Perikardreste konnte nun das Mäuseherz nach Durchtrennung der Gefäße isoliert werden, um daraufhin in einer 8 °C kalten Kardioplegielösung ausgewaschen zu werden. Diese bestand aus 4 g NaCl; 3,73 g KCl (EM Science, St.Louis, MO, USA); 1 g NaHCO<sub>3</sub>; 2 g Glukose; 3 g 2,3-Butandion Monoxim; 3,8 g Ethylenglykol Tetraessigsäure; 0,2 mg Nifedipin (Sigma, St.Louis, MO, USA) und 10 ml Heparin (1000 I.E./ml; American Pharmaceutical Partners, Los Angeles, CA, USA); alles in 1 l NaCl-Lösung (Baxter, Deerfield, IL, USA) gemischt. Unmittelbar danach wurde das Herz in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Weiterverarbeitung bei -80 °C im Kühlschrank aufbewahrt.

### **2.3.2 mRNA-Isolation**

In jedes 15 ml-Plastikröhrchen (Sarsteadt, Newton, NC, USA) wurden zunächst 2 ml RNASTAT-60-Lösung (Tel-Test, INC., Friendswood, TX, USA) gegeben. Hiernach wurden die Herzen aus dem flüssigen Stickstoff (-80 °C) in die Röhrchen überführt und mit einem Gewebshomogenisator (Tissue Tearor Modell 398; Biospec Products, Inc., OK, USA) auf höchster Stufe zerkleinert. Nach der Verarbeitung jedes einzelnen Herzens wurde der Homogenisator mit 0,1%igem Natriumdodecylsulfat (SDS; Sigma, St. Louis, MO, USA), Diethylpyrocarbonat-behandeltem, doppelt deionisiertem Wasser (DEPC-Wasser; Sigma) und mit einem scharfen Instrument von Geweberesten gereinigt, um die nachfolgenden Proben nicht mit RNA-Resten zu verunreinigen. Jeder Probe wurden 0,2 ml 99%iges R-Chloroform (Sigma) zur Phasentrennung zugegeben, welche nach 15 Minuten Inkubation auf Eis und 15-minütiger Zentrifugation bei 13.000 g erfolgte (Avanti J-25; Beckman & Coulter, Fullerton, CA, USA). Der mRNA-haltige wässrige Überstand wurde zum Ausfällen der mRNA mit 1 ml eiskaltem,

99%igem Isopropanol (Sigma) versetzt und auf 4 °C für mindestens 1 Stunde inkubiert. Nach Abzentrifugierung des Überstandes wurde die mRNA mit 2 ml eiskaltem, 75%igem Ethanol gewaschen. Nach erneuter Abzentrifugation des Überstandes wurde die mRNA für 15 Minuten luftgetrocknet. Dann wurde sie in 80 µl DEPC-Wasser gelöst. Schließlich wurde die Extinktion der Proben durch spektrophotometrische Messung bei den Wellenlängen von 260 und 280 nm gemessen (Ultrospec 1000; Pharmacia Biotech, Cambridge, UK). Die Qualität der Isolation wurde durch das Verhältnis der Extinktion bei 260/280 nm überprüft (Soll-Wert: über 1,6). Mithilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes ließ sich nun die mRNA-Konzentration der Proben aus der Extinktion bei 260 nm ermitteln. Das für die Weiterverarbeitung der Proben benötigte Volumen an RNA wurde entsprechend berechnet und zu 1 ml RNA-Aufbewahrungslösung, bestehend aus 700 µl eiskaltem, 100%igem Ethanol, 270 µl 0,1%igem DEPC-Wasser und 30 µl 3 M Natriumazetat-Lösung (Sigma), in ein Ribonuklease (RNase)-freies 1,5 ml-Plastikröhrchen (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA) hinzugefügt. Die aliquotierten mRNA-Proben wurden nun bis zur Verarbeitung in dem "Ribonuclease Protection Assay" (RPA) auf -80 °C aufbewahrt.

## **2.4 Messung der mRNA-Expression - "Ribonuclease Protection Assay"**

### **2.4.1 Theoretischer Hintergrund**

Der RPA ist eine sensitive und schnelle Methode, um spezifische mRNA-Transkripte zu identifizieren und zu quantifizieren [Belin, 1996]. Bei dieser Methode handelt es sich um eine Adaptierung des "S1 Nuclease Assays", wobei RNA-Sonden anstelle von DNA-Sonden genutzt werden [Prediger, 2001]. Hierbei wird die S1-Nuklease durch eine Einzelstrang-spezifische RNase ersetzt. Die Behandlung von RNA:RNA-Doppelsträngen mit RNase ist reproduzierbarer als die Behandlung von RNA:DNA-Hybrid-Doppelsträngen mit S1-Nuklease. Der "S1 Nuclease Assay" und der RPA sind robuste, praktisch austauschbare Techniken, mit denen das Vorhandensein und die Struktur von mRNA-Transkripten untersucht werden kann. "Solution hybridization assays" wie RPA und "S1 Nuclease Assay" besitzen eine höhere Sensitivität als Hybridisationsprotokolle, die auf "RNA bound to a soil" basieren, so wie "Northern Blots" und "Dot Blots". Mit den letztgenannten lässt sich lediglich ein einziges Transkript untersuchen, während beim RPA mehrere verschiedene Transkripte in einer einzigen Reaktion untersucht werden können, wenn sich die Größe der geschützten Transkripte signifikant voneinander unterscheidet.

Den Beginn des Versuchs stellt die Hybridisierung der von den Mäuseherzen gewonnenen mRNA-Proben mit der im Überschuss zugegebenen einzelsträngigen Antisense-RNA-Sonde dar. Nach der Hybridisierung werden überschüssige, nicht gebundene oder nicht zu den Zielsequenzen homologe Sonden sowie nicht gebundene Proben-mRNA-Sequenzen durch Zugabe einer Einzelstrang-spezifischen RNase, gewöhnlich RNaseA, RNaseT1 oder RNase1, verdaut; die hergestellten Hybride aus Probe-mRNA:Sonden-RNA sind geschützt, da doppelsträngig. Die RNase wird daraufhin inaktiviert und extrahiert und die Hybride aus Probe- und Sonden- RNA werden durch denaturierende Polyacrylamid-Urea-Gelelektrophorese aufgetrennt. Für die Darstellung und Quantifizierung der Ergebnisse wird von dem radioaktiven Gel ein Phosphor-Image und eine Fotofilm-Abbildung hergestellt.

#### **2.4.2 "Ribonuclease Protection Assay"**

Der RPA läuft in vier Schritten ab:

- 1.) Synthese der Antisense-RNA-Sonden aus der cDNA,
- 2.) Vorbereitung der mRNA-Proben der Versuchstiere,
- 3.) RNase-Verdauung nicht hybridisierter RNA-Stränge und RNA-Überhänge oder -Loops,
- 4.) Herstellung des Polyacrylamid-Urea-Gels.

##### *zu 1.) Synthese der Antisense-RNA-Sonden*

Es wurden zwei speziell angefertigte "RiboQuant Custom Mouse Template Sets" mit jeweils 0,5 mg/ml Template-cDNA (BD-Pharmingen, San Diego, CA, USA) verwendet:

- 1.) Chemokin-Set mit der cDNA von MIP-1 $\beta$ , MIP-1 $\alpha$ , MIP-2, IP-10, MCP-1 und IP-10-Rezeptor CXCR3,
- 2.) Zytokin-Set mit der cDNA von TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, M-CSF, OPN, TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 und TGF- $\beta$ 3.

In beiden Template-Sets war zudem die cDNA der beiden "housekeeping genes" L32 und Glyceraldehyd-3-phosphatdehydrogenase (GAPDH) enthalten.

Die meisten für die Transkription der Antisense-RNA-Sonden benötigten Reagenzien waren im "RiboQuant In vitro Transcription Kit" (BD-Pharmingen) enthalten und wurden nach Auftauen auf Eis in folgender Reihenfolge in ein 1,5 ml-Plastikröhrchen pipettiert: 1 µl Rnasin (40 U/µl plazentaler Ribonuklease Inhibitor); 1 µl GACU Pool (GTP/ATP/CTP: 2,75 mM, UTP: 61 mM); 2 µl 100 mM Dithiothreitol (DTT); 4 µl 5 X Transkriptionspuffer; 1 µl Template-cDNA; 10 µl [ $\alpha$ -P<sup>32</sup>]-UTP (9,25 Mbg/250 µCi; Perkin Elmer, Boston, MA, USA); zuletzt 1,5 µl Bakteriophagen-T7-RNA-Polymerase (20 U/µl). Dieses Reaktionsgemisch wurde zur Transkription der Template-cDNA in die radioaktiv markierte Antisense-RNA-Sonden für 90 Minuten auf 37 °C inkubiert. Die Transkription wurde durch eine 30-minütige Inkubation mit 2 µl RNase-freie DNase (1 U/µl) gestoppt. Danach wurden zur Inaktivierung und Extraktion der Enzyme 26 µl EDTA (20 mM), 25 µl Tris-gesättigtes Phenol (pH 8,0; Sigma), 25 µl Chloroform:Isoamylalkohol (50:1) und 2 µl Hefe-tRNA (2 mg/ml) zugegeben. Nach Zentrifugierung wurde der RNA-haltige klare Überstand in ein neues 1,5 ml-Plastikröhrchen überführt und erneut mit 50 µl Chloroform:Isoamylalkohol (50:1) gewaschen.

Nach Überführung des Überstandes in ein drittes 1,5 ml-Plastikröhrchen wurden 50 µl 4 M Ammoniumazetat und 250 µl 100%iger Ethanol zugesetzt. In dieser Lösung wurde die Antisense-RNA auf -80 °C für mindestens 30 Minuten präzipitiert und dann zu einem Pellet zentrifugiert (Centrifuge 5415 C; Eppendorf, Hamburg, Deutschland). Das Pellet wurde mit 90%igem Ethanol gewaschen und dann für 10 Minuten luftgetrocknet. Die Antisense-RNA wurde in 50 ml 1 X Hybridisationspuffer gelöst. Sie konnte nur für zwei aufeinander folgende über-Nacht-Hybridisationen verwendet werden. Die Überprüfung der Transkription erfolgte, indem 1 µl der RNA-Lösung in ein Glasröhrchen mit 10 ml Szintillationsflüssigkeit (Ultima Gold; Perkin Elmer) gegeben und in einem Szintillationszähler (LS 6000IC; Beckman & Coulter) gemessen wurde. Zu erwarten war ein Maximum von  $3 \times 10^6$  Cherenkov Counts/µl mit einem akzeptablen Minimum von  $3 \times 10^5$  Counts/µl.

#### *zu 2.) Vorbereitung der Proben-mRNA*

Die aus den Mäuseherzen gewonnenen mRNA-Proben wurden von -80 °C auf Eis aufgetaut und die mRNA zu einem Pellet zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 75%igem Ethanol gewaschen und luftgetrocknet. Die Proben wurden in 8 µl 1 X Hybridisationspuffer gelöst. Nachdem die Antisense-RNA-Lösung (Sonden) auf eine Konzentration von  $3 \times 10^5$  bis  $1 \times 10^6$  Counts/µl

verdünnt worden war, wurden 2 µl davon zu jeder mRNA-Probe gegeben. Ein Tropfen inerten Mineralöls (Sigma) verschloss jeweils das Reaktionsgemisch. Die Proben wurden in einem Heizblock für 5 Minuten auf 90 °C erhitzt. Der Heizblock wurde zur Hybridisierung der Proben-mRNA mit den Antisense-RNA-Sonden langsam um 1 °C pro Minute auf 56 °C abgekühlt und über Nacht auf dieser Temperatur belassen.

### zu 3.) RNase-Verdauung

Die meisten für die RNase-Verdauung benötigten Reagenzien waren in dem "RiboQuant RPA Kit" (BD-Pharmingen) enthalten. Vor der RNase-Behandlung wurden die Proben auf eine Temperatur von 37 °C gebracht. Bei der RNase-Behandlung wurden die hybridisierten mRNA-Proben mit 100 µl RNase-Cocktail bestehend aus 1 X RNase-Puffer:RNase A + T-Mix (A: 80 ng/µl, T1: 250 U/µl) im Verhältnis 417:1 (3,75 ml RNase-Puffer und 9 µl RNase A + T-Mix für 24 Proben) für 90 Minuten auf 30 °C inkubiert.

Bevor die RNase-Verdauung abgeschlossen war, wurde ein Proteinase-Cocktail, bestehend aus Proteinase K-Puffer:Proteinase K (10 mg/ml):Hefe-tRNA (2 mg/ml), im Verhältnis 13:1:1 vorbereitet (585 µl Proteinase K-Puffer, 45 µl Proteinase und 45 µl Hefe-tRNA für 24 Proben). Von diesem Gemisch wurden - entsprechend der Anzahl der Proben - jeweils 18 µl in neue 1,5 ml-Plastikröhrchen aliquotiert. Das RNase-Verdaute wurde unter der Ölphase herauspipettiert und mit dem Proteinase-Cocktail auf 37 °C für 15 Minuten inkubiert, wodurch die RNase inaktiviert wurde. Mit 65 µl Tris-gesättigtem Phenol und 65 µl Chloroform:Isoamylalkohol (50:1) wurden die RNase sowie die Proteinase K extrahiert. Nach Zentrifugierung wurde der mRNA-haltige klare Überstand in neue 1,5 ml-Plastikröhrchen überführt und die mRNA in 120 µl 4 M Ammoniumazetat und 650 µl 100%igem Ethanol für mindestens 30 Minuten auf -80 °C präzipitiert.

Nach Zentrifugierung wurde das mRNA-Pellet in 90%igem Ethanol gewaschen und dann für 10 Minuten luftgetrocknet. In der Zwischenzeit wurde das zuvor hergestellte Gel auf 50 bis 120 W vorgewärmt. Die getrockneten und Ethanol-freien, doppelsträngigen mRNA-Proben wurden nun in 5 µl 1 X RNA-Loading-Puffer gelöst und nach einer 5-minütigen Hitzedenaturierung bei 90 °C auf Eis gekühlt. Aus einer 1:100-Mischung von unhybridisierter Antisense-Sonden-RNA und 1 X Hybridisierungspuffer wurde ein Standard hergestellt. Dieses Gemisch wurde mit 7 µl 1 X RNA-Loading-Puffer versehen und durchlief die Hitzedenaturierung

und Abkühlung parallel zu den mRNA-Proben. Die in denaturiertem Zustand fixierten, in Loading-Puffer gelösten mRNA-Einzelstränge wurden nun in die Mulden des vorgewärmten Polyacrylamid-Urea-Gels pipettiert und unter Anlegung einer Spannung von ca. 60 W (1900 V) elektrophoretisch aufgetrennt.

#### *zu 4.) Herstellung des Polyacrylamid-Urea-Gels*

Die Glasplatten der Elektrophorese-Maschine (Sequi-Gen GT Sequencing Cell, 38 x 50 cm mit Power Pac 3000 Xi; BioRad, Hercules CA, USA) wurden nach gründlichem Waschen mit Ammoniak, 0,1%iger SDS-Lösung und 95%igem Ethanol mit Zellstoff abgetrocknet. Die obere, abnehmbare Glasplatte wurde mit 5 ml Silikon (SigmaCote; Sigma) eingerieben, um eine spätere Adhäsion des Gels an dieser Platte zu vermeiden. Die beiden Glasplatten wurden zusammengelegt, wobei sie an ihren Rändern durch 0,4 mm dicke "Spacer" (Abstandhalter) auseinander gehalten wurden, sodass das zwischen die Glasplatten gegossene Gel eine ebensolche Dicke hatte. Die Platten wurden an den Seiten zusammengepresst und der Boden durch eine Vorrichtung abgedichtet, die es erlaubte, durch ein Loch die Gelkammer zu füllen.

Das 5%ige Acrylamid-Urea-Gel wurde hergestellt aus 80 ml 6%iger Sequenziergel-Lösung (Ultra Pure SequaGel 6: Acrylamid 40%, Bisacrylamid 2% und Urea), 20 ml Sequenziergel-Puffer (Ultra Pure SequaGel Complete Buffer; National Diagnostics, Atlanta, GA, USA) und 800 µl 10%iger Ammoniumpersulfat-Lösung (Sigma). Dieses Gemisch wurde mithilfe einer Spritze in die Gelkammer gefüllt. Ein Plastikamm wurde am oberen Rand des Gels eingebracht und sparte Mulden zum Einfüllen der mRNA-Proben aus. Nach ca. 2 Stunden war das Gel auspolymerisiert. Der Kamm wurde entnommen und das Gel vertikal in die Elektrophorese-Maschine gestellt. Um einen elektrischen Kontakt in vertikaler Richtung über das Gel herzustellen, wurden eine hinter dem Gel befindliche Glaskammer und der Boden der Elektrophorese-Maschine mit 0,5 X TBE-Laufpuffer (0,89 M Tris; 0,89 M Borsäure; 20 mM EDTA; ph 8,3; Invitrogen, Ltd., Raisley, Scotland, UK) gefüllt. Das Gel hatte dadurch am oberen und unteren Ende Kontakt zum Laufpuffer und zum Strom.

## 2.5 Auswertung der Messungen der mRNA-Expression

Nachdem die Elektrophorese abgeschlossen war, wurde das Gel mithilfe eines gleich großen Filterpapiers (Whatman Filters, W&R Balston Limited, England), auf dem es absorbierte, aus der Elektrophoresekammer genommen, mit Polyvinylchlorid-Folie bedeckt, in einem Gelrockner (Gel Dryer Model 583; Bio Rad) bei 80 °C getrocknet und mit dem Filterpapier verbacken. Das so fixierte Gel wurde über Nacht mit einem Gamma-Film (Kodak BioMax MS-1 Intensifying Screen; Amersham, Piscataway, NJ, USA) in eine PhosphorImager-Kassette (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, USA) eingelegt. Der Gamma-Film, bestehend aus seltenen Erden, nahm die von dem Gel ausgehende Strahlung auf und wurde von einem PhosphorImager-Scanner (Storm 860; Molecular Dynamics) eingescannt. Dieser detektierte die Anzahl der "Counts" bezogen auf die Fläche des Films. Die so entstehenden Daten wurden mit entsprechender Software (ImageQuant 6.0; Molecular Dynamics) ausgewertet. Das Ergebnis des Scans stellte sich als Abbildung des Gels dar, wobei die Schwärze der Banden die Anzahl der "Counts" pro Flächeneinheit widerspiegelte. Im Zuge der Auswertung wurden die Banden in "Peaks" einer Kurve umgesetzt, wobei die Integrale der Flächen unter den "Peaks" der Anzahl der "Counts" pro mRNA-Bande entsprachen. Die für die jeweiligen mRNA-Transkripte errechneten Werte wurden nun zu den mRNA-Werten von L32 normalisiert. Dieses so genannte "housekeeping gene" wird als interner Standard bei Versuchen zur Quantifizierung von RNA benutzt. GAPDH, ein wichtiges Enzym der Glykolyse, und L32, ein ribosomales Protein, werden in Zellen unterschiedlichen funktionellen Zustands annähernd konstant exprimiert und eignen sich somit zur Normalisierung [Müller et al., 2001]. Zusätzlich wurde eine Autoradiographie des Gels auf Röntgenfilm (Kodak BioMax MS-1 Autoradiography Film, 35 X 43 cm; Amersham) angefertigt (Abb. 5). In dem Ergebnisteil dieser Arbeit ist unter dem jeweiligen Histogramm der verschiedenen Transkripte eine repräsentative Autoradiographie der mRNA-Bande und der zur selben Maus gehörenden Bande des "housekeeping gene" L32 dargestellt (siehe Ergebnisse).

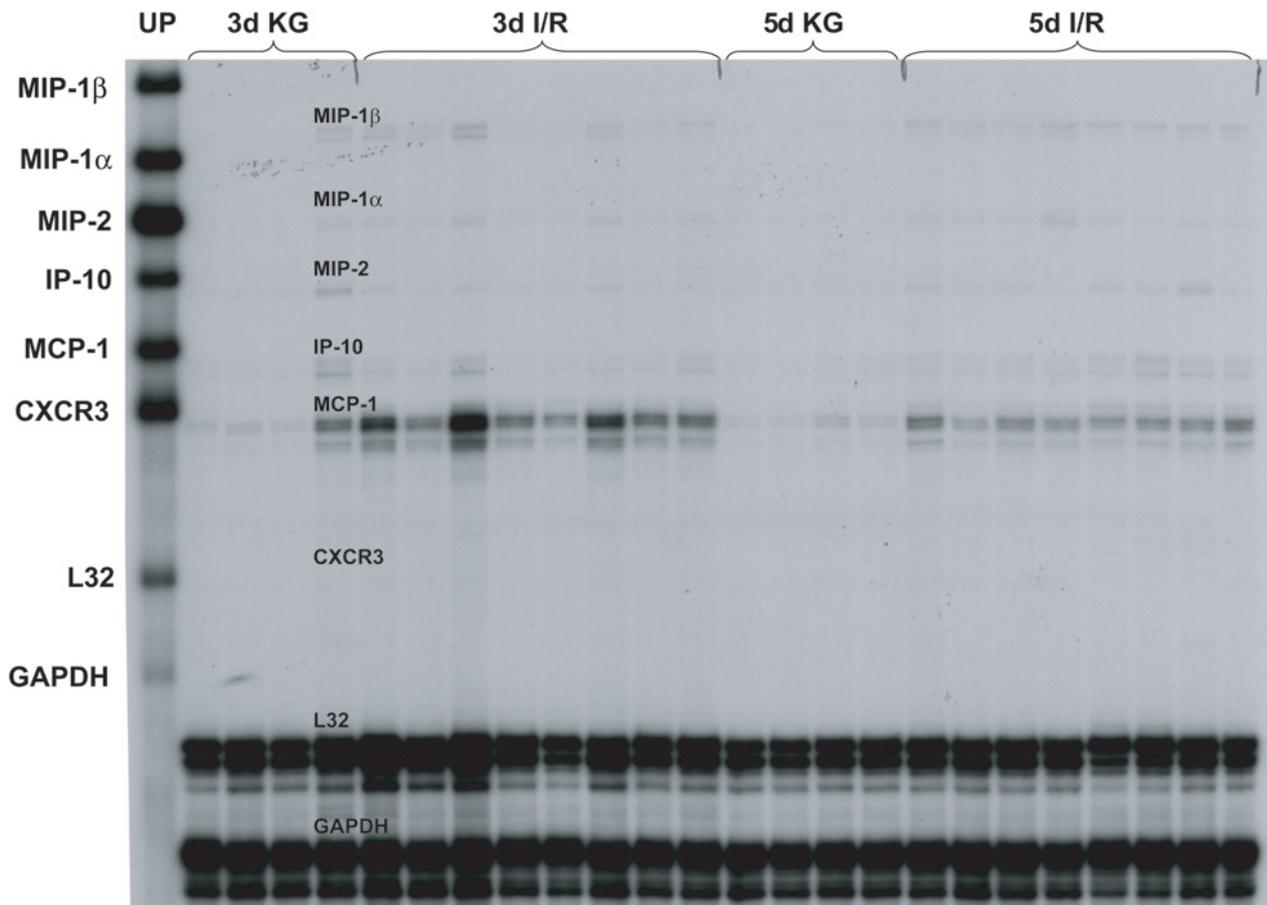
Parallel zu der Chemokin-mRNA der EC-SOD-Mäuse wurde auch die mRNA von WT-Mäusen der entsprechenden Gruppen in denselben RPAs verarbeitet und auf dieselben Gele geladen. Die Daten der Phosphor-Imager-Analyse der mRNA-Banden jedes Chemokins bei den EC-SOD-Mäusen konnten nur so direkt mit den entsprechenden Daten der WT-Mäuse verglichen werden.

Anders jedoch als bei der Bestimmung der Chemokine wurde bei den Zytokinen aufgrund technischer Schwierigkeiten die mRNA der WT- und EC-SOD-Mäuse in getrennten Versuchen,

also unter unterschiedlichen Bedingungen (unterschiedliche Aktivität der Enzyme, abweichende Inkubationstemperaturen, Pipettierungenauigkeiten bei der Zusammensetzung von Enzymcocktails, etc.), untersucht und auf verschiedene Gele geladen. Da die quantitative Aussage der Zytokin-mRNA-Werte sehr von der Qualität des jeweils vorliegenden Gels abhing, konnte kein direkter Vergleich zwischen den aus verschiedenen Versuchen gewonnenen Daten für die Zytokin-mRNA-Expression bei WT- und EC-SOD-Mäusen gezogen werden. Allerdings konnte der jeweilige Verlauf der Zytokin-mRNA-Synthese in den zwei Mäusegruppen verglichen werden. Qualitative Aussagen über Unterschiede in der Zytokin-mRNA-Synthese zwischen WT- und EC-SOD-Mäusen waren somit zulässig.

## **2.6 Statistik**

Alle Daten wurden als Mittelwert und Standardfehler des Mittelwerts (Standard Error of the Mean, SEM) dargestellt. Die Unterschiede zwischen den Gruppen wurden mittels multipler Varianzanalyse, gefolgt von Student-Newman-Keuls post-hoc Analyse, überprüft. Das Signifikanzniveau wurde mit  $p < 0,05$  angenommen.



**Abbildung 5.** Repräsentative Autoradiographie eines RPA-Gels. Aufgetragen wurde die RNA der "unprotected probe" (UP) sowie RNA von vier 3-Tage-KG-, acht 5-Tage-I/R-, vier 5-Tage-KG- und acht 5-Tage-I/R-C57/BL6-Wildtyp-Mäuseherzen. Die UP diente als Hilfsmittel zur Identifikation der gesuchten RNA-Banden. Die radioaktiv markierte RNA der UP läuft im Gel langsamer als die RNA der Proben der Mäuse-Herzen, weil die Fragmente der UP länger sind. Die Länge der UP und der Template-cDNA, aus der die Antisense-RNA-Sonden hergestellt werden, sind vom Hersteller der Templates eindeutig definiert. RPA, Ribonuclease Protection Assay; KG, Kontrollgruppe; I/R, Ischämie/Reperfusion.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Allgemein über das Modell der Ischämie und Reperfusion

Die Wiederholung der Gruppeneinteilung der Mäuse erfolgt hier zur besseren Nachvollziehbarkeit hinsichtlich der folgenden Ergebnisabhandlung.

#### 3.1.1 Wildtypmäuse

Im Zuge der vorliegenden Arbeit wurden 231 C57/BL6-WT-Mäuse verwendet. WT-Mäuse, die während oder nach der initialen Operation verstorben sind ( $n = 53$ , Überlebensrate = 76%), sowie Mäuse, die den I/R-Eingriff nicht überlebt haben ( $n = 2$ , Überlebensrate = 98%), wurden nicht für die weiterführenden Auswertung herangezogen. Die restlichen 176 WT-Mäuse wurden in die folgenden Gruppen eingeteilt.

1.) Nativgruppe ( $n = 8$ ): keine initiale Operation.

2.) Kontrollgruppen ( $n = 56$ ): Mäuse in den Kontrollgruppen wurden initial operiert, wurden aber keiner I/R unterzogen. Hiervon wurden jeweils  $n = 8$  Mäuse in die 0-Tage-Kontrollgruppe und in die 3-, 5-, 7-, 14-, 21- und 28-Tage-Kontrollgruppen eingeteilt.

3.) I/R-Gruppen ( $n = 96$ ): Mäuse der I/R-Gruppe wurden initial operiert und dem I/R-Protokoll unterworfen. 48 Mäuse wurden zu jeweils  $n = 8$  in die 3-, 5-, 7-, 14-, 21- und 28-Tage-I/R-Gruppen eingeteilt.

4.) Regressionsgruppen: Die restlichen Mäuse wurden zu jeweils  $n = 8$  in die 7-Tage-I/R + 15- bzw. 30-Tage-Regressionsgruppen für die RNA-Extraktion sowie die 7-Tage-I/R + 30- bzw. 60-Tage-Regressionsgruppen und die 28-Tage-I/R + 30- bzw. 60-Tage-Regressionsgruppen für die echokardiographischen Untersuchungen eingeteilt.

#### 3.1.2 Extrazelluläre Superoxiddismutase-überexprimierende Mäuse

Es wurden in der vorliegenden Arbeit 71 heterozygot transgene Mäuse, die das Enzym EC-SOD überexprimieren, verwendet. Mäuse, die während oder nach der Initialoperation verstorben sind ( $n = 5$ , Überlebensrate = 92%) und Mäuse, die den I/R-Eingriff nicht überlebt haben ( $n = 2$ , Überlebensrate = 97%) wurden nicht zur folgenden Auswertung herangezogen. Die übrigen

64 EC-SOD-Mäuse wurden in 3 Gruppen aufgeteilt.

1.) Nativgruppe (n = 8): keine initiale Operation.

2.) Kontrollgruppen (n = 32): Mäuse in den Kontrollgruppen wurden initial operiert, wurden aber keiner I/R unterzogen. Hiervon wurden jeweils n = 8 Mäuse in die 0-Tage-Kontrollgruppe und in die 3-, 5- und 7-Tage-Kontrollgruppen eingeteilt.

3.) I/R-Gruppen (n = 24): Mäuse der I/R-Gruppen wurden initial operiert und dem I/R-Protokoll unterworfen. Sie wurden zu jeweils n = 8 in die 3-, 5- und 7-Tage-I/R-Gruppen eingeteilt.

## **3.2 Globale und regionale linksventrikuläre Funktion**

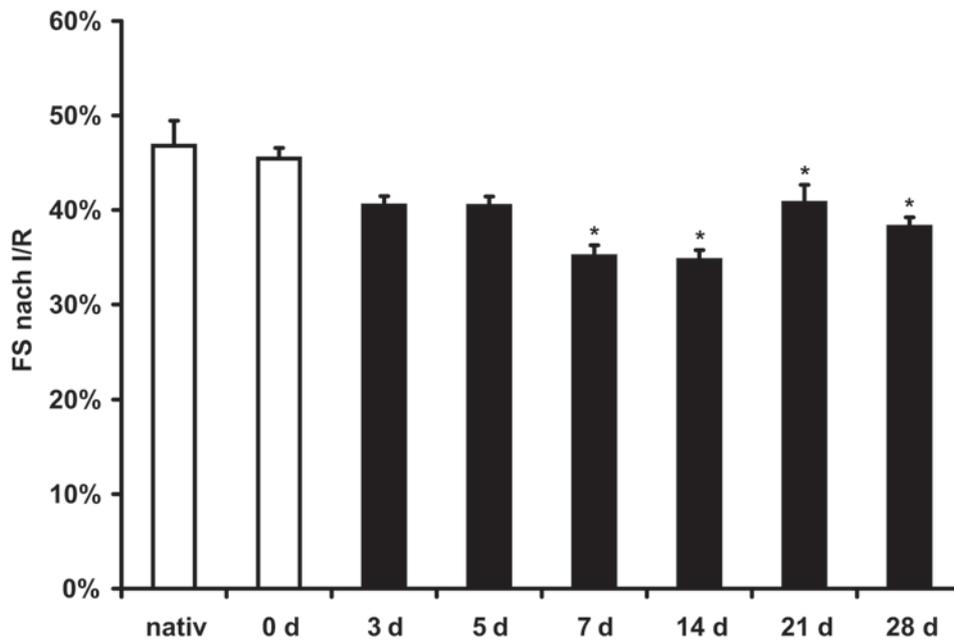
### **3.2.1 Ischämie- und Reperfusionprotokoll bei Wildtypmäusen**

#### *Fraktionsverkürzung*

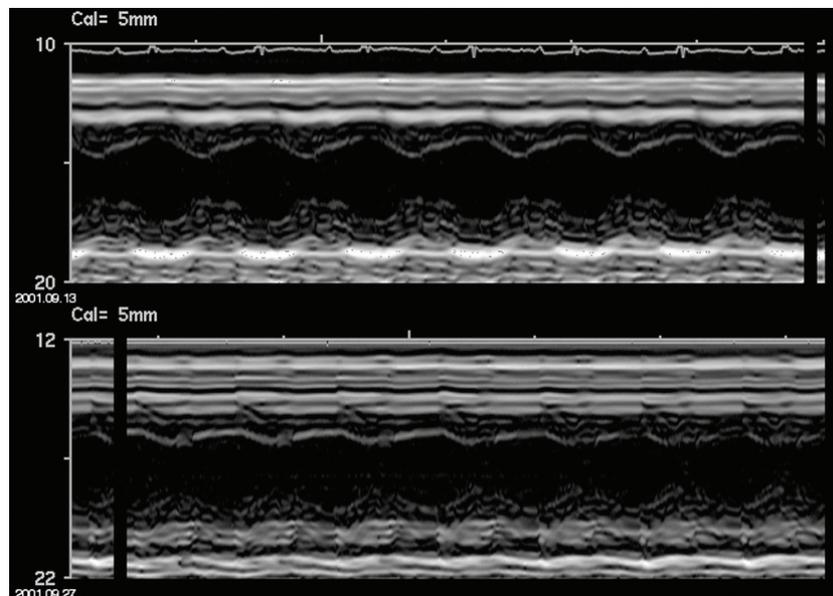
Die M-Mode-Echokardiographie zeigte vergleichbare Werte der FS in der Nativgruppe und in der 0-Tage-Kontrollgruppe (Abb. 6). Die FS war signifikant vermindert nach 7 Tagen I/R im Vergleich zur 0-Tage-Kontrollgruppe ( $35,1\% \pm 1,2\%$  vs.  $45,4\% \pm 1,1\%$ ;  $p < 0,05$ ) und blieb bis 28 Tage I/R unverändert.

#### *Vorderwandverdickung*

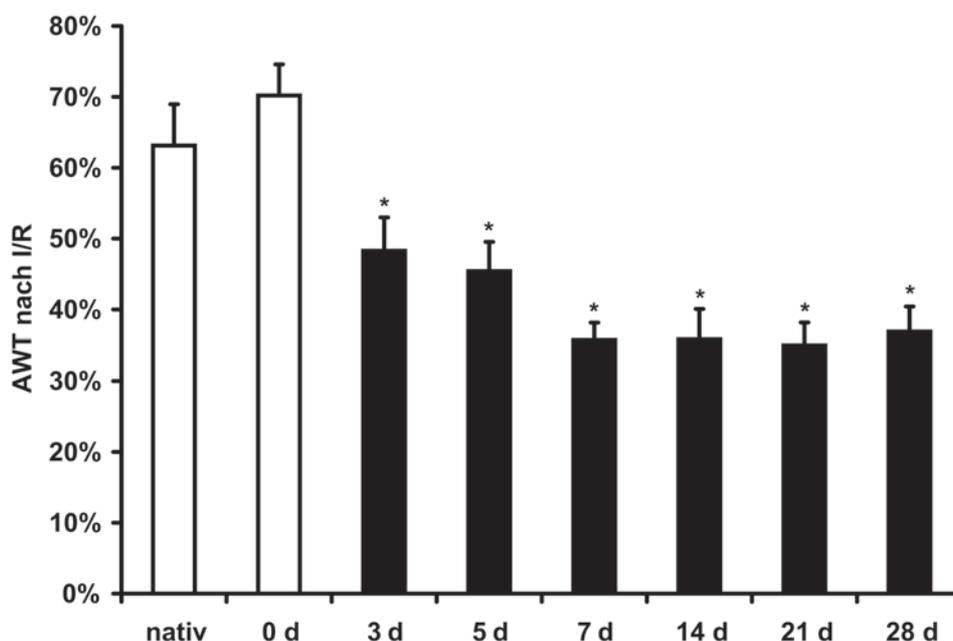
Die M-Mode Echokardiographie (Abb. 7) zeigte bei 0-Tage-Kontrolltieren eine normokinetische linksventrikuläre Vorderwand. Nach 7 Tagen I/R wurde dagegen eine deutliche Dyskinesie beobachtet. Die linksventrikuläre AWT im normokinetischen Myokard in der Nativgruppe lag in demselben Werte-Bereich wie die AWT in der 0-Tage-Kontrollgruppe (Abb. 8). Die AWT zeigte nach 3 Tagen I/R eine signifikante linksventrikuläre Dysfunktion im Vergleich zur 0-Tage-Kontrollgruppe ( $48,3\% \pm 4,7\%$  vs.  $70,2\% \pm 4,4\%$ ;  $p < 0,05$ ), die sich bis zum 7. Tag weiter verschlechterte ( $35,7\% \pm 2,4\%$ ;  $p < 0,05$ ) und danach persistierte.



**Abbildung 6.** Die Fraktionsverkürzung (FS) zeigt die globale ventrikuläre Pumpfunktion während des I/R-Protokolls bei WT-Mäusen. I/R, Ischämie/Reperfusion; d, Tage; \*,  $p < 0,05$  vs. 0 d.



**Abbildung 7.** Ventrikuläre Pumpfunktion während I/R-Protokoll: Die M-Mode-Echokardiographie in kurzer Achse zeigt in der 0-Tage-Kontrollgruppe eine normokinetiche linksventrikuläre Vorderwand (oben) im Gegensatz zu Mäusen nach 7 Tagen I/R mit deutlich hypokinetiche linksventrikulärer Vorderwand (unten).



**Abbildung 8.** Die Vorderwandverdickung (AWT) stellt die regionale linksventrikuläre Pumpfunktion während des I/R-Protokolls bei WT-Mäusen dar. I/R, Ischämie/Reperfusion; d, Tage; \*,  $p < 0,05$  vs. 0 d.

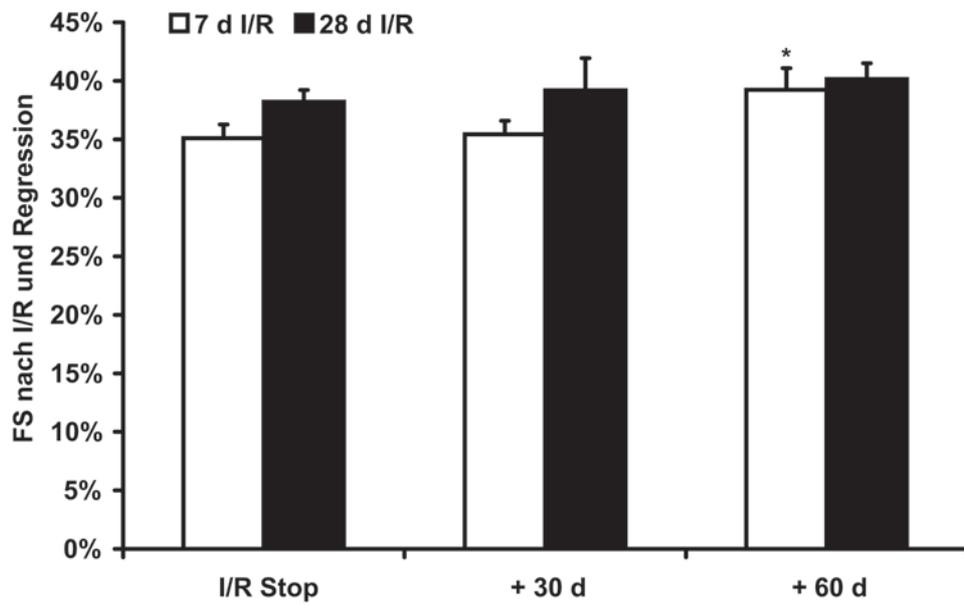
### 3.2.2 Regression bei Wildtypmäusen

#### Fraktionsverkürzung

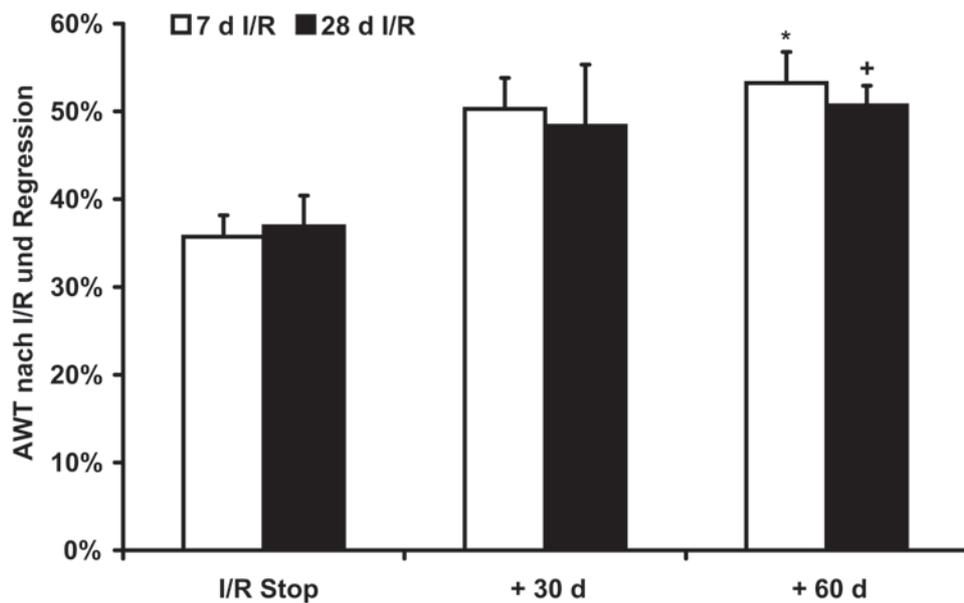
Nach 7 Tagen I/R und folgenden 30 Tagen Erholung zeigte die FS einen Trend zur Verbesserung und erreichte ein signifikantes Ausmaß nach 60 Tagen Erholung (7 Tage I/R:  $35,1\% \pm 1,2\%$  vs. 7 Tage I/R + 60 Tage Regression:  $39,2\% \pm 1,8\%$ ,  $p < 0,05$ ) (Abb. 9). Die Einschränkung der globalen ventrikulären Dysfunktion nach 28 Tagen I/R verbesserte sich auch erst nach 60 Tagen Erholung, allerdings nicht signifikant. Nach 60 Tagen Regeneration erreichte sie in der 7-Tage- und 28-Tage-I/R-Gruppe noch nicht das Niveau der 0-Tage-Kontrollgruppe.

#### Vorderwandverdickung

Die AWT folgte der Entwicklung der FS. Nach 30 Tagen Erholung zeigte sich ebenfalls ein Trend zur Verbesserung der regionalen Pumpfunktion in der 7-Tage- und 28-Tage-I/R-Gruppe (Abb. 10). 60 Tage Erholung brachten eine signifikante Verbesserung der AWT in beiden Gruppen (7 Tage I/R:  $35,7\% \pm 2,4\%$  vs. 7 Tage I/R + 60 Tage Regression:  $53,2\% \pm 3,6\%$  und 28 Tage I/R:  $36,9\% \pm 3,5\%$  vs. 7 Tage I/R + 60 Tage Regression:  $50,7\% \pm 2,2\%$ , jeweils  $p < 0,05$ ). Diese Werte blieben auch unter den Werten der 0-Tage-Kontrollgruppe.



**Abbildung 9.** Regression der Fraktionsverkürzung (FS) nach Diskontinuierung des I/R-Protokolls bei WT-Mäusen. I/R, Ischämie/Reperfusion; d, Tage; \*,  $p < 0,05$  vs. I/R Stop.

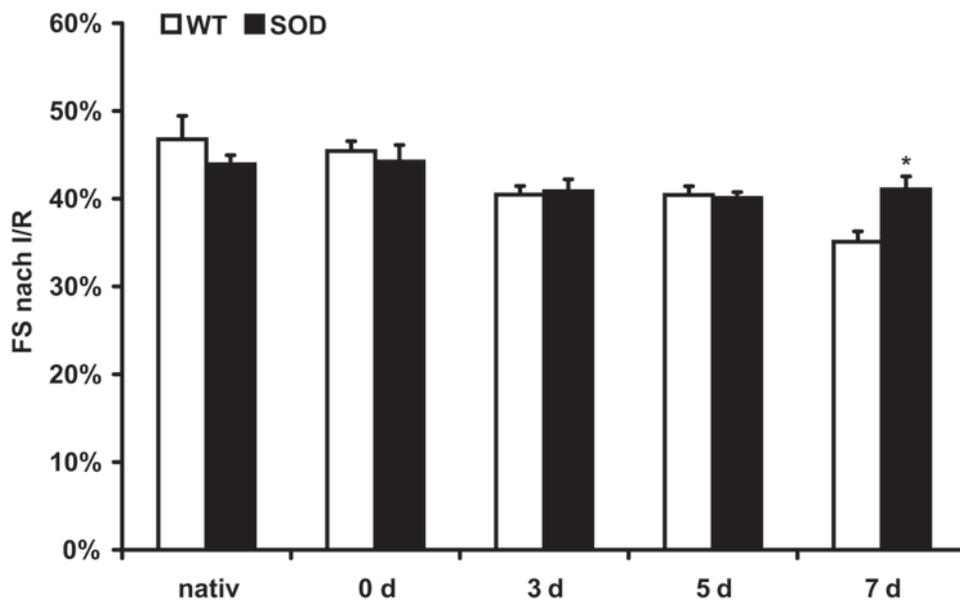


**Abbildung 10.** Regression der Vorderwandverdickung (AWT) nach Diskontinuierung des I/R-Protokolls bei WT-Mäusen. I/R, Ischämie/Reperfusion; d, Tage; \*/+,  $p < 0,05$  vs. I/R Stop.

### 3.2.3 Ischämie- und Reperfusionsprotokoll bei EC-SOD-Mäusen

#### Fraktionsverkürzung

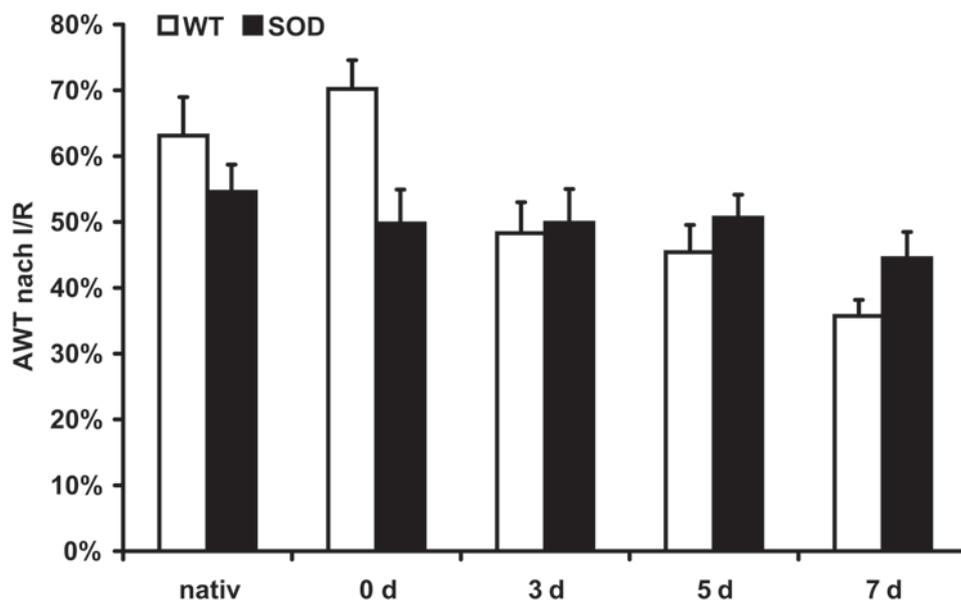
Die FS in der Nativgruppe der EC-SOD-Mäuse ( $43,9\% \pm 1\%$ ) unterschied sich nicht signifikant von der FS der entsprechenden WT-Mäuse ( $46,8\% \pm 2,7\%$ ) (Abb. 11). Die Werte der 0-Tage-Kontrollgruppen der EC-SOD-Mäuse ( $44,2\% \pm 1,9\%$ ) und WT-Mäuse lagen in demselben Bereich. Nach 3 und 5 Tagen I/R war lediglich eine geringe Verminderung der FS zu erkennen, wobei sich die Werte der EC-SOD-Mäuse nicht von denen der WT-Mäuse unterschieden. Im Gegensatz zu den WT-Mäusen blieben die FS-Werte der EC-SOD-Mäuse nach 7 Tagen I/R unverändert und unterschieden sich somit nicht signifikant von den Werten der EC-SOD-Nativ- und EC-SOD-0-Tage-Kontrollgruppe. Die FS in der EC-SOD-7-Tage-I/R-Gruppe war damit signifikant höher als die FS in der WT-7-Tage-I/R-Gruppe ( $41,1\% \pm 1,5\%$  vs.  $35,1\% \pm 1,2\%$ ,  $p < 0,05$ ) (vgl. Tab. 1, Tabellenanhang).



**Abbildung 11.** Die Fraktionsverkürzung (FS) zeigt die globale ventrikuläre Pumpfunktion während des I/R-Protokolls im Vergleich zwischen WT- und EC-SOD-Mäusen. I/R, Ischämie/Reperfusion; d, Tage; \*,  $p < 0,05$  bei WT vs. EC-SOD.

### Vorderwandverdickung

Die AWT war in der Nativgruppe der EC-SOD-Mäuse tendenziell geringer als in der Nativgruppe der WT-Mäuse (Abb. 12). Ähnlich verhielten sich die Werte in den 0-Tage-Kontrollgruppen. Nach 3 Tagen I/R war die AWT bei den EC-SOD-Mäusen in demselben Bereich wie bei den WT-Mäusen. Nach 5 und vor allem nach 7 Tagen I/R erkannte man tendenzielle Unterschiede in der AWT zwischen EC-SOD und WT-Mäusen, jedoch ohne Signifikanz. Wie die FS war auch die AWT vor allem in der WT-7-Tage-I/R-Gruppe vermindert gegenüber der AWT in der EC-SOD-7-Tage-I/R-Gruppe (n.s.; vgl. Tab. 2, Tabellenanhang).



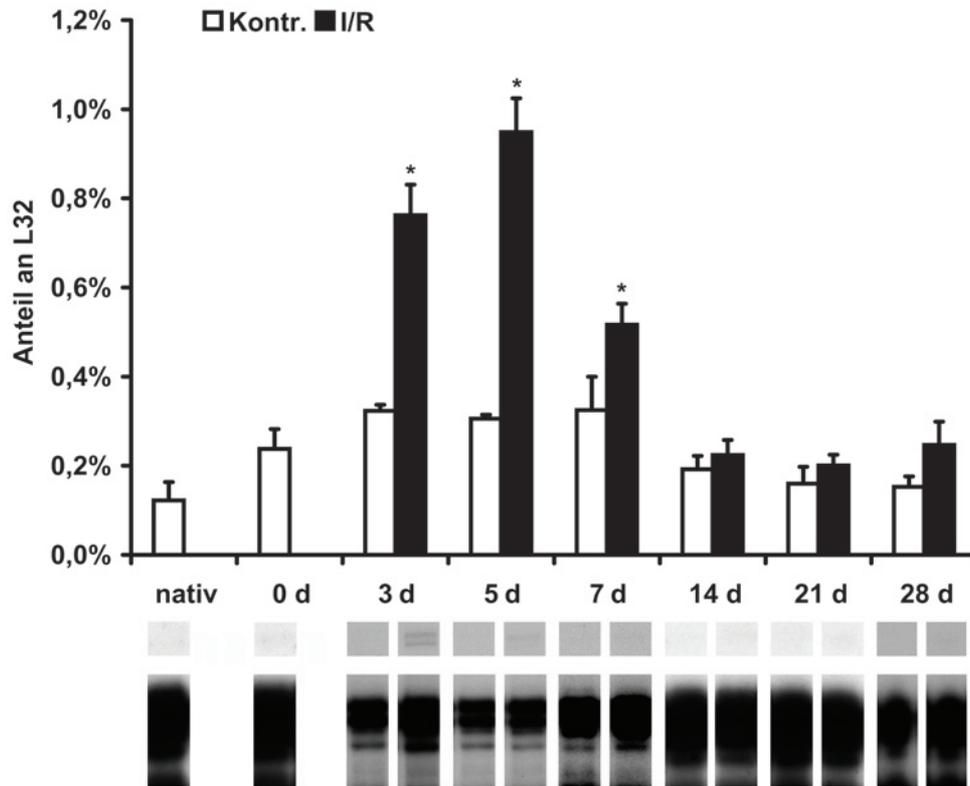
**Abbildung 12.** Die Vorderwandverdickung (AWT) beschreibt die regionale linksventrikuläre Pumpfunktion während des I/R-Protokolls im Vergleich zwischen WT- und EC-SOD-Mäusen. I/R, Ischämie/Reperfusion; d, Tage.

### 3.3 Induktion von Chemokinen im Modell der Ischämie und Reperfusion

#### 3.3.1 Induktion von Chemokinen in Wildtypmäusen

##### *Macrophage Inflammatory Protein-1 $\beta$*

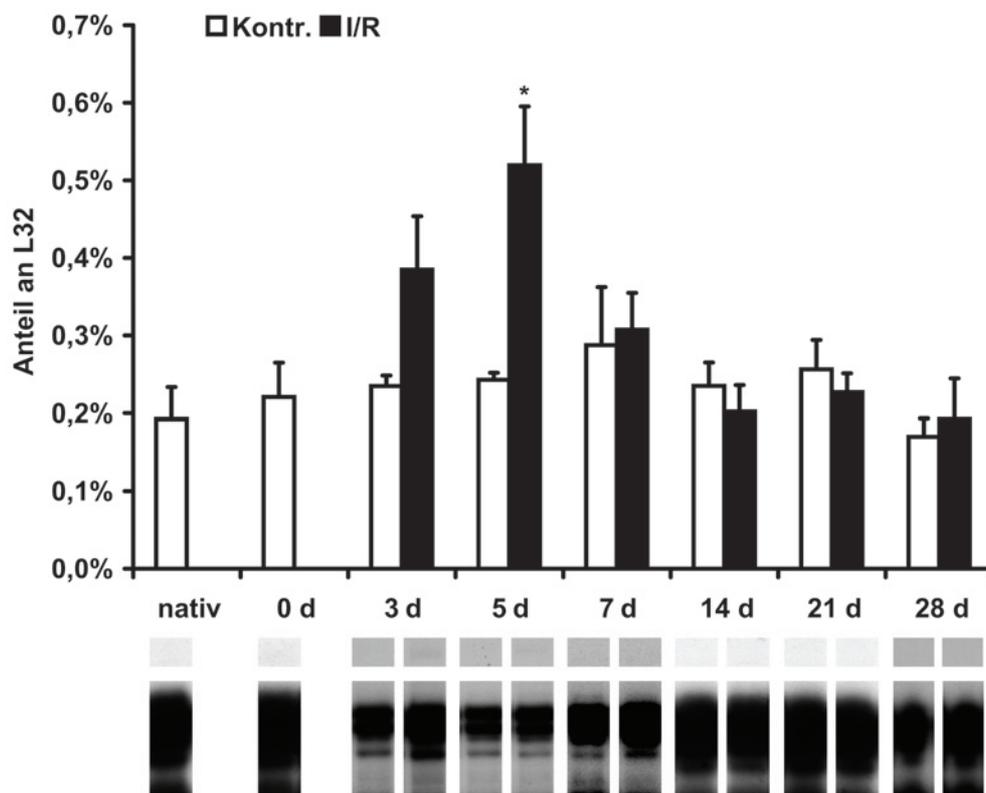
Die Werte der mRNA von MIP-1 $\beta$  in der 0-Tage-Kontrollgruppe zeigten im Vergleich zu der Nativgruppe eine leichte, aber nicht signifikante Induktion der mRNA-Synthese durch das Operationstrauma (Abb. 13). Auch bei den 3-, 5- und 7-Tage-Kontrolltieren war eine leichte, aber ebenfalls nicht signifikante Überexpression der mRNA von MIP-1 $\beta$  im Myokard zu sehen. Nach 14 Tagen waren keine Unterschiede zur Nativgruppe mehr zu erkennen. Nach 3-tägiger repetitiver I/R war MIP-1 $\beta$  im Vergleich zur 3-Tage-Kontrollgruppe signifikant erhöht ( $0,76\% \pm 0,07\%$  vs.  $0,32\% \pm 0,01\%$ ,  $p < 0,05$ ). Der größte Unterschied in der mRNA-Expression zwischen I/R- und Kontrollgruppe zeichnete sich nach 5 Tagen ab ( $0,95\% \pm 0,08\%$  vs.  $0,31\% \pm 0,01\%$ ,  $p < 0,05$ ), und war noch nach 7 Tagen zu erkennen. ( $p < 0,05$ ). Die Vergleiche der I/R-Gruppen mit den jeweiligen Kontrollgruppen nach 14, 21 und 28 Tagen ergaben keinen Unterschied. Zusammengefasst stieg die mRNA-Synthese von MIP-1 $\beta$  initial bis 5 Tage I/R an, fiel aber danach konstant ab, bis sie nach 2 Wochen Basiswerte erreichte.



**Abbildung 13.** Induktion der MIP-1 $\beta$ -mRNA nach I/R bei WT-Mäusen. Oben: quantitative Daten der MIP-1 $\beta$ -mRNA als Anteil an der L32-mRNA. Unten: repräsentative Autoradiographien der mRNA-Banden von MIP-1 $\beta$  und L32. mRNA-Expression gemessen mit "RNase Protection Assay". I/R, Ischämie/Reperfusion; d, Tage; \*,  $p < 0,05$  vs. jeweilige Kontrollgruppe.

### Macrophage Inflammatory Protein-1 $\alpha$

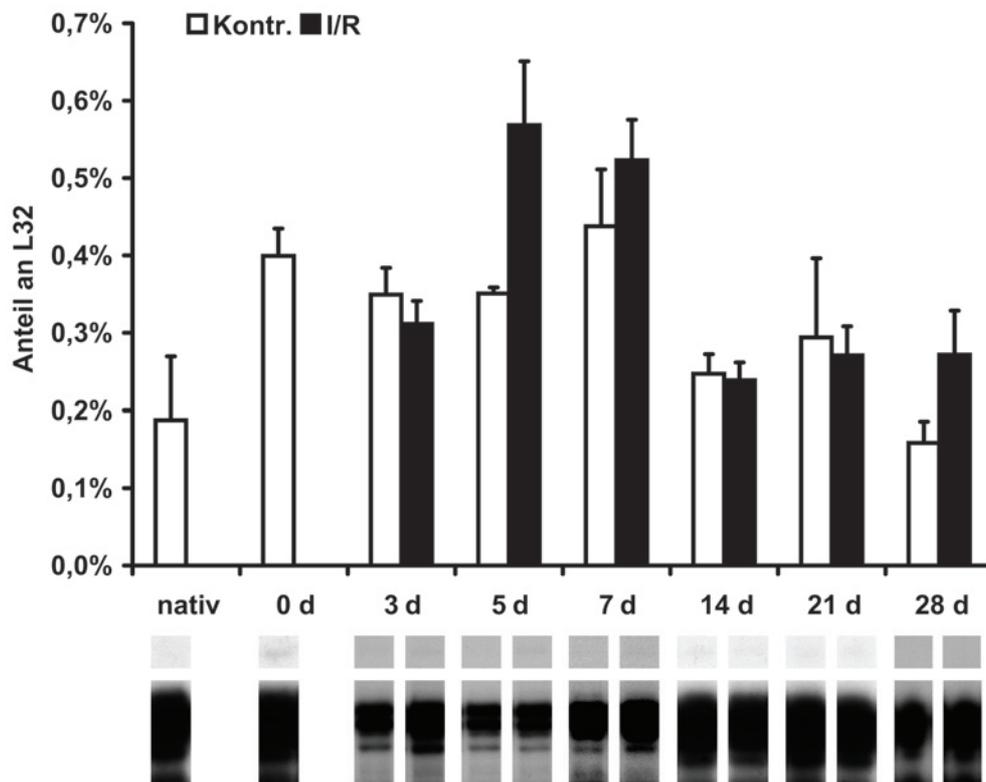
Das Expressionsmuster von MIP-1 $\alpha$  war dem von MIP-1 $\beta$  ähnlich (Abb. 14). Die Expression der mRNA in den Kontrollgruppen wich nicht von der in der Nativgruppe ab. Beim Vergleich der mRNA-Expression der I/R-Gruppen mit den entsprechenden Kontrollgruppen war ein signifikanter Unterschied erst nach 5 Tagen zu erkennen (0,52%  $\pm$  0,09% vs. 0,24%  $\pm$  0,01%,  $p < 0,05$ ). MIP-1 $\alpha$ -mRNA erreichte somit maximale Werte nach 5 Tagen und fiel danach wieder auf das Niveau der Kontroll-/Nativtiere ab.



**Abbildung 14.** Induktion der MIP-1 $\alpha$ -mRNA nach I/R bei WT-Mäusen. Oben: quantitative Daten der MIP-1 $\alpha$ -mRNA als Anteil an der L32-mRNA. Unten: repräsentative Autoradiographien der mRNA-Banden von MIP-1 $\alpha$  und L32. mRNA-Expression gemessen mit "RNase Protection Assay". I/R, Ischämie/Reperfusion; d, Tage; \*,  $p < 0,05$  vs. jeweilige Kontrollgruppe.

### Macrophage Inflammatory Protein-2

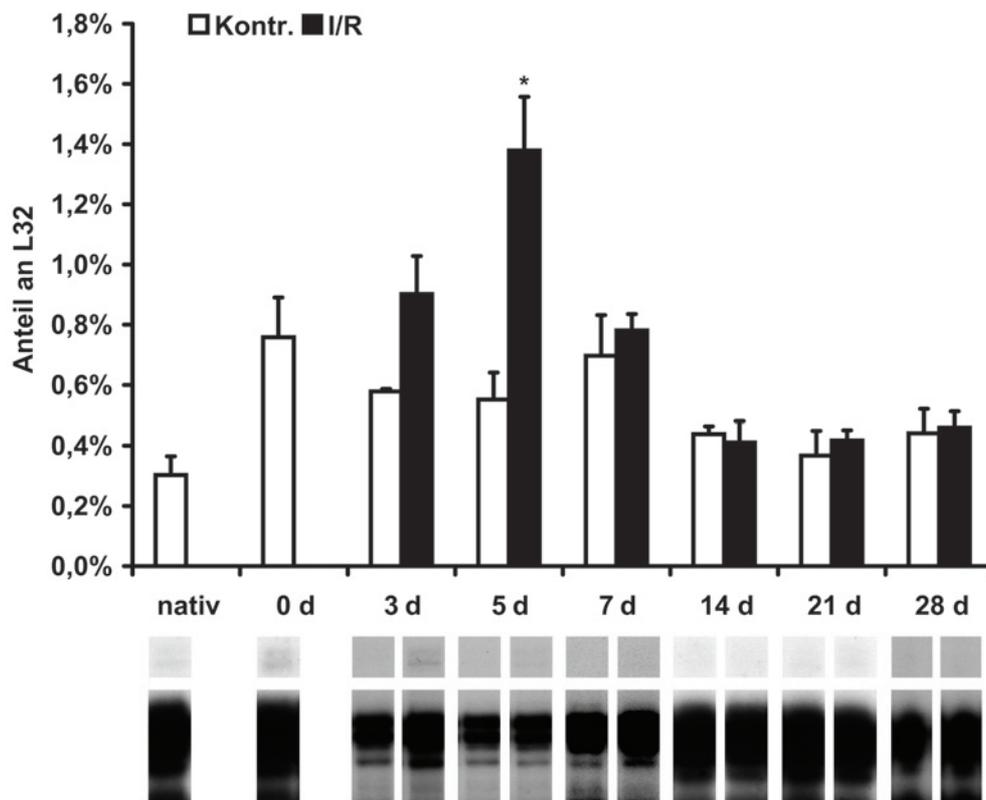
Die mRNA-Expression von MIP-2 zeigte keine Zunahme in den Kontrollgruppen verglichen mit der Nativgruppe (Abb. 15). Unterschiede zwischen Kontroll- und I/R-Gruppen - wenn auch nicht signifikant - waren nach 5 und 7 Tagen zu erkennen. Die MIP-2-mRNA-Synthese hatte ihren Höhepunkt zwischen 5 und 7 Tagen I/R, und folgte somit dem Muster von MIP-1 $\alpha$  und MIP-1 $\beta$ .



**Abbildung 15.** Induktion der MIP-2-mRNA nach I/R bei WT-Mäusen. Oben: quantitative Daten der MIP-2-mRNA als Anteil an der L32-mRNA. Unten: repräsentative Autoradiographien der mRNA-Banden von MIP-2 und L32. mRNA-Expression gemessen mit "RNase Protection Assay". I/R, Ischämie/Reperfusion; d, Tage.

### Interferon $\gamma$ -Inducible Protein-10

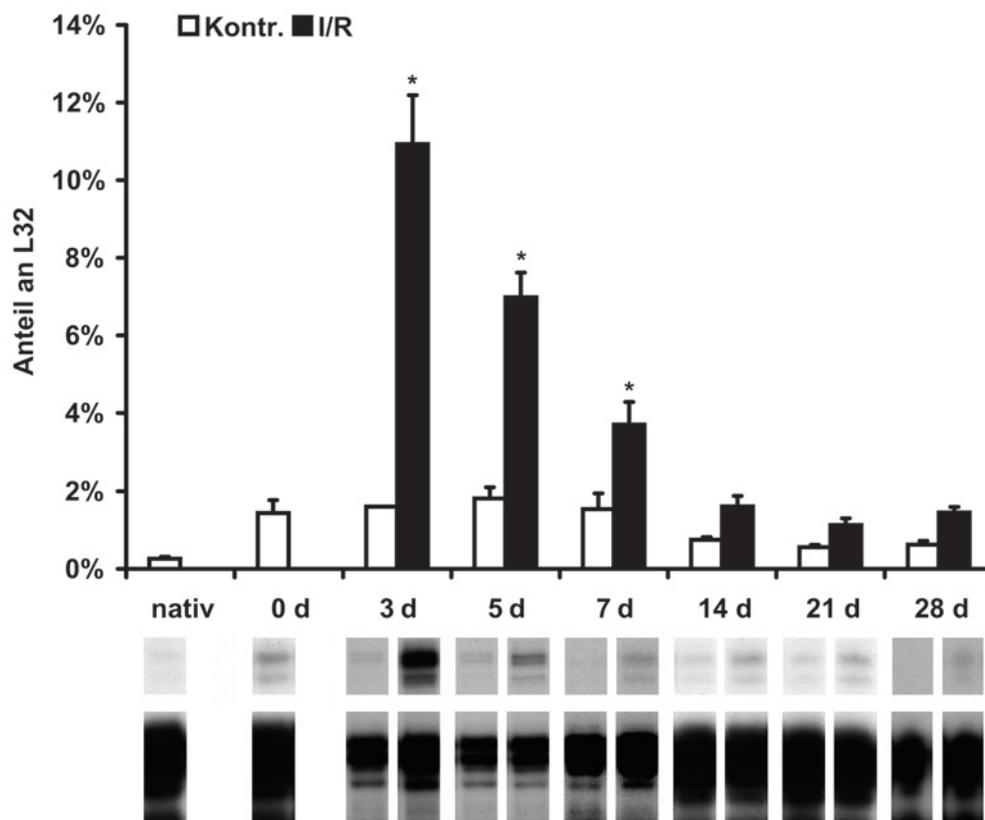
Keine der Kontrollgruppen zeigte eine signifikante Abweichung in der IP-10-mRNA-Expression von der Nativgruppe (Abb. 16). Nach I/R erhöhte sich die IP-10-mRNA-Expression nur in der 5-Tage-I/R-Gruppe signifikant im Vergleich zur entsprechenden Kontrollgruppe ( $1,38\% \pm 0,18\%$  vs.  $0,55\% \pm 0,09\%$ ,  $p < 0,05$ ). Ein Anstieg der Transkription von 3 bis 5 Tagen I/R war gefolgt von einem starken Abfall der Synthese bis 7 Tage I/R, der nach 14 Tagen das Niveau der Kontroll- und Nativtiere erreichte.



**Abbildung 16.** Induktion der IP-10-mRNA nach I/R bei WT-Mäusen. Oben: quantitative Daten der IP-10-mRNA als Anteil an der L32-mRNA. Unten: repräsentative Autoradiographien der mRNA-Banden von IP-10 und L32. mRNA-Expression gemessen mit "RNase Protection Assay". I/R, Ischämie/Reperfusion; d, Tage; \*,  $p < 0,05$  vs. jeweilige Kontrollgruppe.

### Monocyte Chemoattractant Protein-1

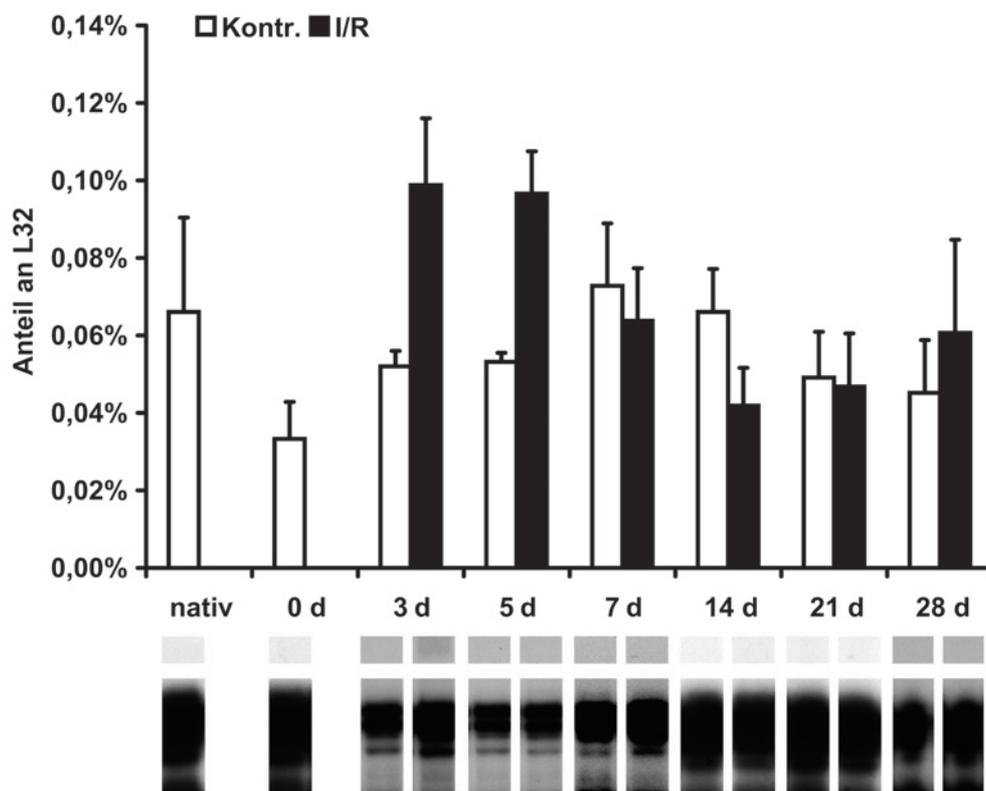
Die Kontrollgruppen zeigten wieder hinsichtlich der mRNA-Expression keine Unterschiede zu der Nativgruppe (Abb. 17). Der größte Unterschied zwischen der I/R-Gruppe und der entsprechenden Kontrollgruppe war nach 3 I/R Tagen zu erkennen ( $10,93\% \pm 1,26\%$  vs.  $1,6\% \pm 0\%$ ,  $p < 0,05$ ). Nach 5 Tagen I/R war die MCP-1-mRNA-Expression schon niedriger als nach 3 Tagen I/R, aber dennoch signifikant höher als in der 5-Tage-Kontrollgruppe. Auch die 7-Tage-I/R-Gruppe hatte eine gegenüber ihrer Vergleichsgruppe signifikant erhöhte mRNA-Expression. Die 14-, 21- und 28-Tage-I/R-Gruppen zeigten keine signifikant erhöhte Transkription von MCP-1 mehr. Somit zeigte die MCP-1-mRNA einen transienten Anstieg zwischen den I/R-Tagen 3 und 7, gefolgt von einer Normalisierung der Expression nach 14 Tagen.



**Abbildung 17.** Induktion der MCP-1-mRNA nach I/R bei WT-Mäusen. Oben: quantitative Daten der MCP-1-mRNA als Anteil an der L32-mRNA. Unten: repräsentative Autoradiographien der mRNA-Banden von MCP-1 und L32. mRNA-Expression gemessen mit "RNase Protection Assay". I/R, Ischämie/Reperfusion; d, Tage; \*,  $p < 0,05$  vs. jeweilige Kontrollgruppe.

### CXC-Chemokin-Rezeptor-3

Die Expression von CXCR3 war in allen Gruppen unter dem Sensitivitätsniveau des RPAs. Somit lässt sich keine verlässliche Aussage über die Induktion von CXCR3 in diesem Modell treffen (Abb. 18).

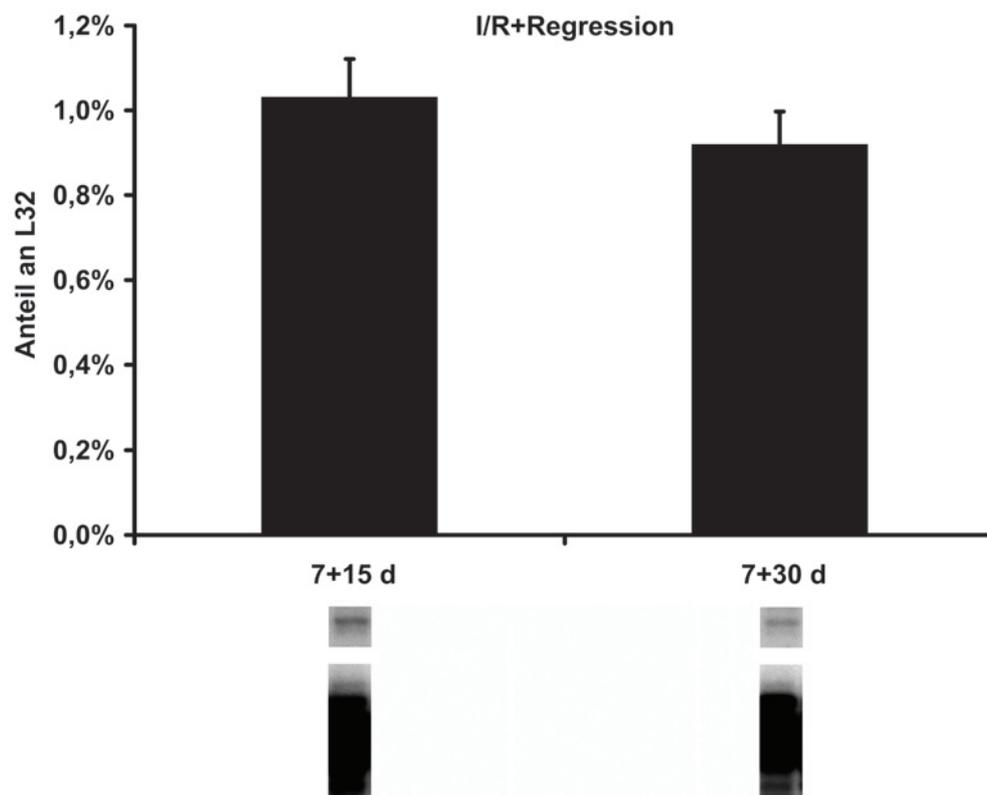


**Abbildung 18.** Induktion der CXCR3-mRNA nach I/R bei WT-Mäusen. Oben: quantitative Daten der CXCR3-mRNA als Anteil an der L32-mRNA. Unten: repräsentative Autoradiographien der mRNA-Banden von CXCR3 und L32. mRNA-Expression gemessen mit "RNase Protection Assay". I/R, Ischämie/Reperfusion; d, Tage.

### 3.3.2 Induktion von Chemokinen nach Regression

Die Messung der Chemokin-mRNA in den Regressionsgruppen ergab keine erhöhte Induktion von allen untersuchten mRNA-Transkripten in allen Gruppen. Als Beispiel wird hier die MCP-1-mRNA-Expression dargestellt:

Für MCP-1 wurde nach 15- und 30-tägiger Erholung, die auf 7 Tage I/R folgte, eine starke Abnahme der mRNA-Expression auf Kontroll- und Nativniveau gemessen (Abb. 19, vgl. Abb. 17). Signifikante Unterschiede nach 30 und 60 Tagen Erholung waren nicht zu erkennen.

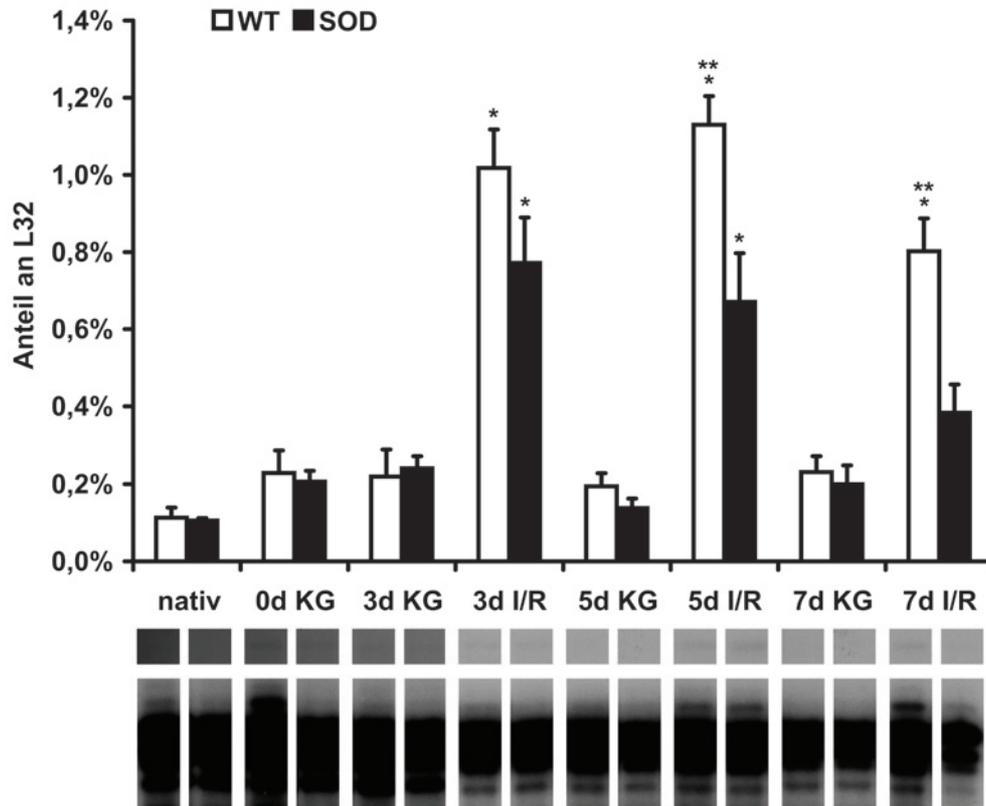


**Abbildung 19.** Regression der MCP-1-mRNA-Induktion nach Diskontinuierung des I/R-Protokolls und Erholung bei WT-Mäusen. Oben: quantitative Daten der MCP-1-mRNA als Anteil an der L32-mRNA. Unten: repräsentative Autoradiographien der mRNA-Banden von MCP-1 und L32. mRNA-Expression gemessen mit "RNase Protection Assay". d, Tage.

### 3.3.3 Vergleich der Chemokininduktion zwischen Wildtyp- und EC-SOD-Mäusen

#### *Macrophage Inflammatory Protein-1 $\beta$*

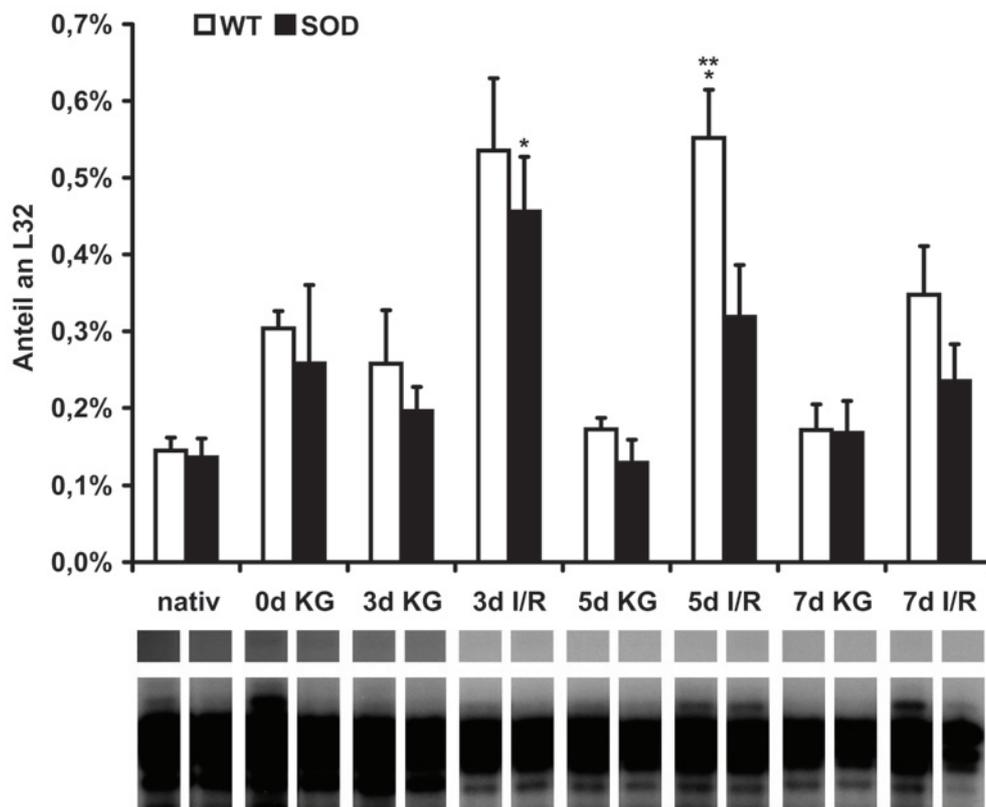
In der Nativgruppe und in den Kontrollgruppen lagen zwischen WT-Mäusen und EC-SOD-Mäusen jeweils keine Unterschiede in der Transkription von MIP-1 $\beta$  vor (Abb. 20). Die mRNA von MIP-1 $\beta$  war nach 3 Tagen I/R bei den WT-Mäusen nicht signifikant höher exprimiert als bei den EC-SOD-Mäusen, jedoch war sie in beiden I/R-Gruppen signifikant erhöht gegenüber der jeweiligen Kontrollgruppe. Nach 5 Tagen I/R waren die Unterschiede in der MIP-1 $\beta$ -mRNA-Expression zwischen WT- und EC-SOD-I/R-Mäusen signifikant ( $1,13\% \pm 0,07\%$  vs.  $0,67\% + 0,13\%$ ,  $p < 0,05$ ), ebenso die Unterschiede zu den jeweils dazugehörenden Kontrollgruppen. Der Vergleich der 7-Tage-I/R-Gruppen ergab auch signifikante Unterschiede, jedoch war die EC-SOD-I/R-Gruppe nicht signifikant unterschiedlich zur eigenen Kontrollgruppe. Somit ging die MIP-1 $\beta$ -mRNA-Synthese bei den WT-Mäusen später auf das Niveau der Nativ- und Kontrollgruppen zurück als bei den EC-SOD-Mäusen (vgl. auch Abb. 13).



**Abbildung 20.** Induktion der MIP-1 $\beta$ -mRNA nach I/R bei WT- vs. EC-SOD-Mäusen. Oben: quantitative Daten der MIP-1 $\beta$ -mRNA als Anteil an der L32-mRNA. Unten: repräsentative Autoradiographien der mRNA-Banden von MIP-1 $\beta$  und L32. mRNA-Expression gemessen mit "RNase Protection Assay". I/R, Ischämie/Reperfusion; KG, Kontrollgruppe; d, Tage; \*,  $p < 0,05$  bei I/R vs. KG; \*\*,  $p < 0,05$  bei WT vs. EC-SOD.

### Macrophage Inflammatory Protein-1 $\alpha$

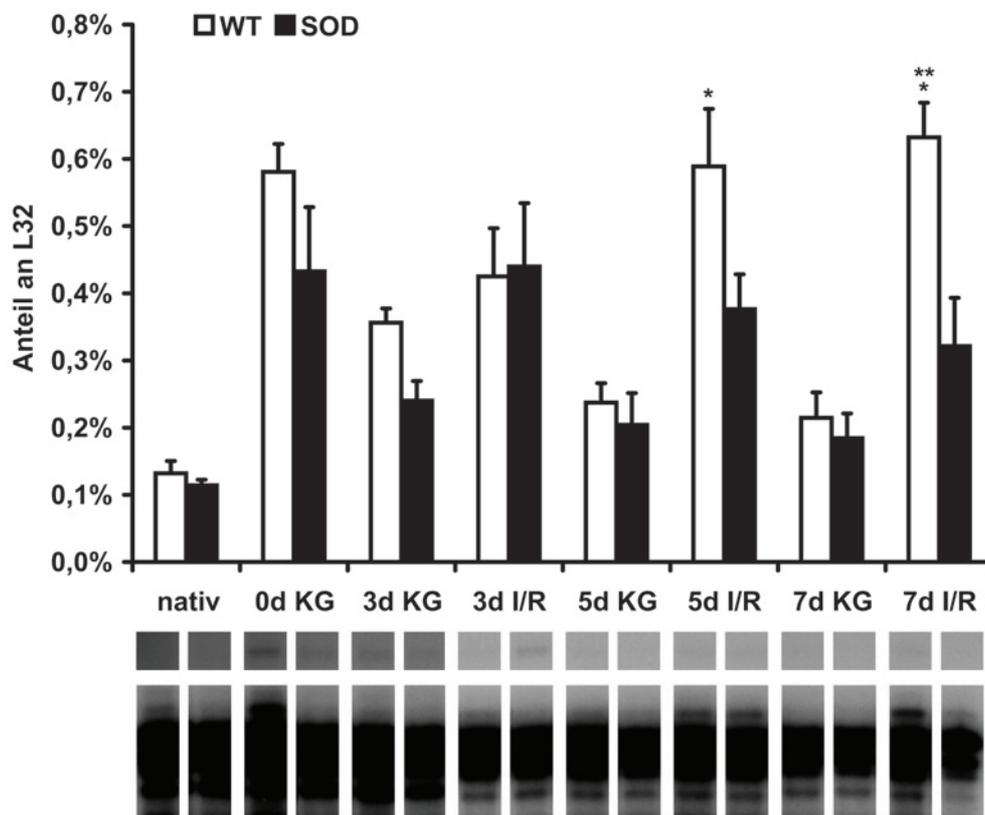
Die MIP-1 $\alpha$ -mRNA war weder in der Nativgruppe noch in allen Kontrollgruppen unterschiedlich exprimiert zwischen WT-Mäusen und EC-SOD-Mäusen (Abb. 21). 3 Tage I/R führten nur bei den EC-SOD-Mäusen zu einer signifikanten Induktion verglichen mit der 3-Tage-Kontrollgruppe, sie war jedoch nicht signifikant unterschiedlich gegenüber der 3-Tage-I/R-Gruppe der WT-Mäuse. Nur eine 5-tägige I/R sorgte bei den WT-Mäusen für eine signifikant höhere Expression der MIP-1 $\alpha$ -mRNA im Vergleich zu den EC-SOD-Mäusen ( $0,55\% \pm 0,06\%$  vs.  $0,32\% \pm 0,07\%$ ;  $p < 0,05$ ). Die EC-SOD-5-Tage-I/R-Mäuse hatten aber, im Gegensatz zu den WT-Mäusen, keinen signifikanten Unterschied zur eigenen Kontrollgruppe. Bei den WT-Mäusen verminderte sich die MIP-1 $\alpha$ -mRNA-Synthese erst nach 5 Tagen I/R von einem signifikanten Ausmaß, während sie in der EC-SOD-Gruppe nach einem Maximum bei 3 Tagen I/R abnahm.



**Abbildung 21.** Induktion der MIP-1 $\alpha$ -mRNA nach I/R bei WT- vs. EC-SOD-Mäusen. Oben: quantitative Daten der MIP-1 $\alpha$ -mRNA als Anteil an der L32-mRNA. Unten: repräsentative Autoradiographien der mRNA-Banden von MIP-1 $\alpha$  und L32. mRNA-Expression gemessen mit "RNase Protection Assay". I/R, Ischämie/Reperfusion; KG, Kontrollgruppe; d, Tage; \*,  $p < 0,05$  bei I/R vs. KG; \*\*,  $p < 0,05$  bei WT vs. EC-SOD.

### Macrophage Inflammatory Protein-2

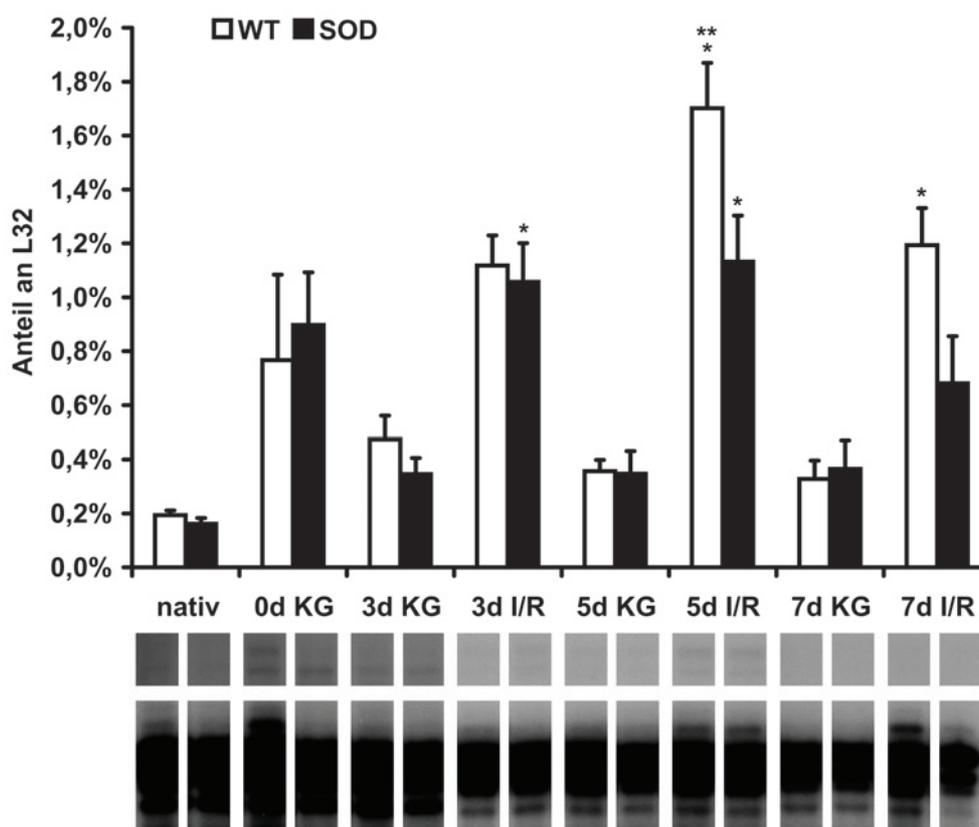
Die MIP-2-mRNA war weder in der Nativgruppe noch in den Kontrollgruppen unterschiedlich exprimiert bei WT-Mäusen und EC-SOD-Mäusen (Abb. 22). Nach 3 Tagen I/R waren keine Unterschiede zwischen WT- und EC-SOD-Mäusen zu erkennen. Nach 5 und 7 Tagen I/R war die MIP-2-mRNA bei den WT-Mäusen höher exprimiert als bei den EC-SOD-Mäusen, signifikant war der Unterschied jedoch nur in den 7-Tage-I/R-Gruppen ( $0,63\% \pm 0,05\%$  vs.  $0,32\% \pm 0,07\%$ ,  $p < 0,05$ )



**Abbildung 22.** Induktion der MIP-2-mRNA nach I/R WT- vs. EC-SOD-Mäusen. Oben: quantitative Daten der MIP-2-mRNA als Anteil an der L32-mRNA. Unten: repräsentative Autoradiographien der mRNA-Banden von MIP-2 und L32. mRNA-Expression gemessen mit "RNase Protection Assay". I/R, Ischämie/Reperfusion; KG, Kontrollgruppe; d, Tage; \*,  $p < 0,05$  bei I/R vs. KG; \*\*,  $p < 0,05$  bei WT vs. EC-SOD.

### Interferon $\gamma$ -Inducible Protein-10

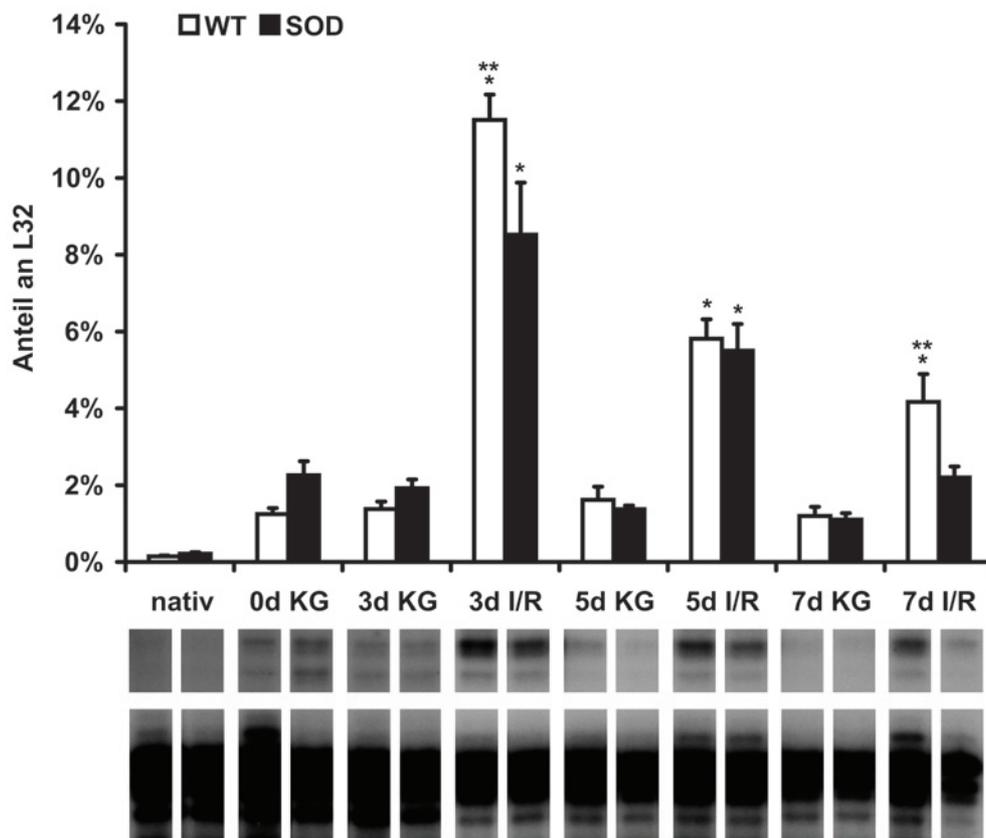
Auch die IP-10-mRNA war in der Nativgruppe und in den Kontrollgruppen nicht unterschiedlich exprimiert bei WT-Mäusen und EC-SOD-Mäusen (Abb. 23). Die IP-10-mRNA bei den WT-Mäusen war nach 5 und 7 Tagen I/R höher exprimiert als bei den EC-SOD-Mäusen, wobei aber nur der Unterschied in den 5-Tage-I/R-Gruppen signifikant war ( $1,7\% \pm 0,17\%$  vs.  $1,13\% \pm 0,17\%$ ,  $p < 0,05$ ). Nach 3 Tagen I/R war die Transkription von IP-10 in WT- und EC-SOD-Mäusen gleich. Bis 5 Tage I/R stieg die IP-10-mRNA-Expression bei den WT-Mäusen stark an und erreichte ihren Höhepunkt. Bei den EC-SOD-Mäusen war kein Anstieg der IP-10-mRNA-Synthese von 3 bis 5 Tagen I/R zu erkennen. Nach 7 Tagen fiel die IP-10-mRNA-Synthese sowohl bei den WT- als auch bei den EC-SOD-Mäusen ab.



**Abbildung 23.** Induktion der IP-10-mRNA nach I/R bei WT- vs. EC-SOD-Mäusen. Oben: quantitative Daten der IP-10-mRNA als Anteil an der L32-mRNA. Unten: repräsentative Autoradiographien der mRNA-Banden von IP-10 und L32. mRNA-Expression gemessen mit "RNase Protection Assay". I/R, Ischämie/Reperfusion; KG, Kontrollgruppe; d, Tage; \*,  $p < 0,05$  bei I/R vs. KG; \*\*,  $p < 0,05$  bei WT vs. EC-SOD.

### Monocyte Chemoattractant Protein-1

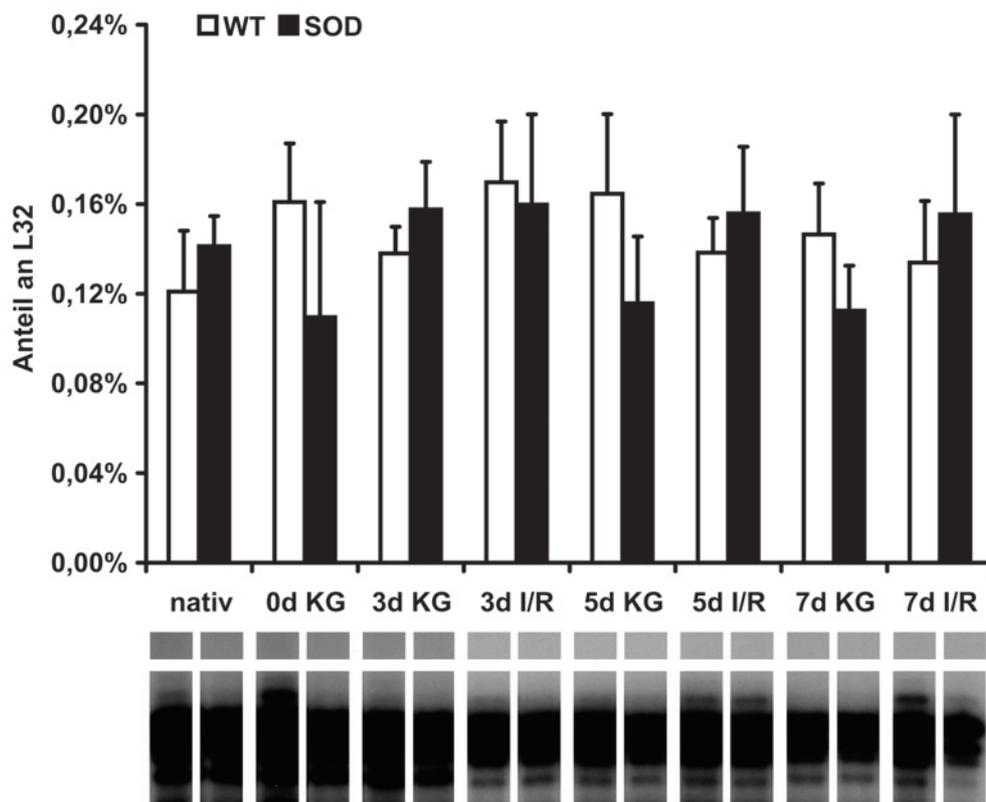
Für die MCP-1-mRNA-Expression waren keine Unterschiede zwischen WT-Mäusen und EC-SOD-Mäusen in der Nativgruppe und den Kontrollgruppen zu erfassen (Abb. 24). Die MCP-1-mRNA war nach 3 und 5 Tagen in beiden I/R-Gruppen signifikant höher transkribiert als in den jeweiligen Kontrollgruppen. Die MCP-1-mRNA-Expression in den WT-Mäusen war nach 3 und 7 Tagen I/R signifikant höher als in den EC-SOD-Mäusen ( $11,51\% \pm 0,66\%$  vs.  $8,52\% \pm 1,36\%$  und  $4,16\% \pm 0,73\%$  vs.  $2,2\% \pm 0,29\%$ , jeweils  $p < 0,05$ ) (vgl. auch Tab. 3, Tabellenanhang). Die MCP-1-mRNA-Expression hatte in den WT-Mäusen von 3 bis 7 Tagen I/R einen exponentiell abfallenden Verlauf, erreichte jedoch erst später das Niveau der Kontrollgruppe. In den EC-SOD-Mäusen hingegen nahm die MCP-1-mRNA-Expression von 3 bis 7 Tage I/R stetig ab und erreichte bereits nach 7 Tagen das Kontrollgruppenniveau.



**Abbildung 24.** Induktion der MCP-1-mRNA nach I/R bei WT- vs. EC-SOD-Mäusen. Oben: quantitative Daten der MCP-1-mRNA als Anteil an der L32-mRNA. Unten: repräsentative Autoradiographien der mRNA-Banden von MCP-1 und L32. mRNA-Expression gemessen mit "RNase Protection Assay". I/R, Ischämie/Reperfusion; KG, Kontrollgruppe; d, Tage; \*,  $p < 0,05$  bei I/R vs. KG; \*\*,  $p < 0,05$  bei WT vs. EC-SOD.

### CXC-Chemokin-Rezeptor-3

Die Expression der CXCR3-mRNA war in allen Gruppen unter dem Sensitivitätsniveau des RPAs. Somit ließ sich keine verlässliche Aussage über die Induktion von CXCR3 in diesem Modell treffen (Abb. 25).



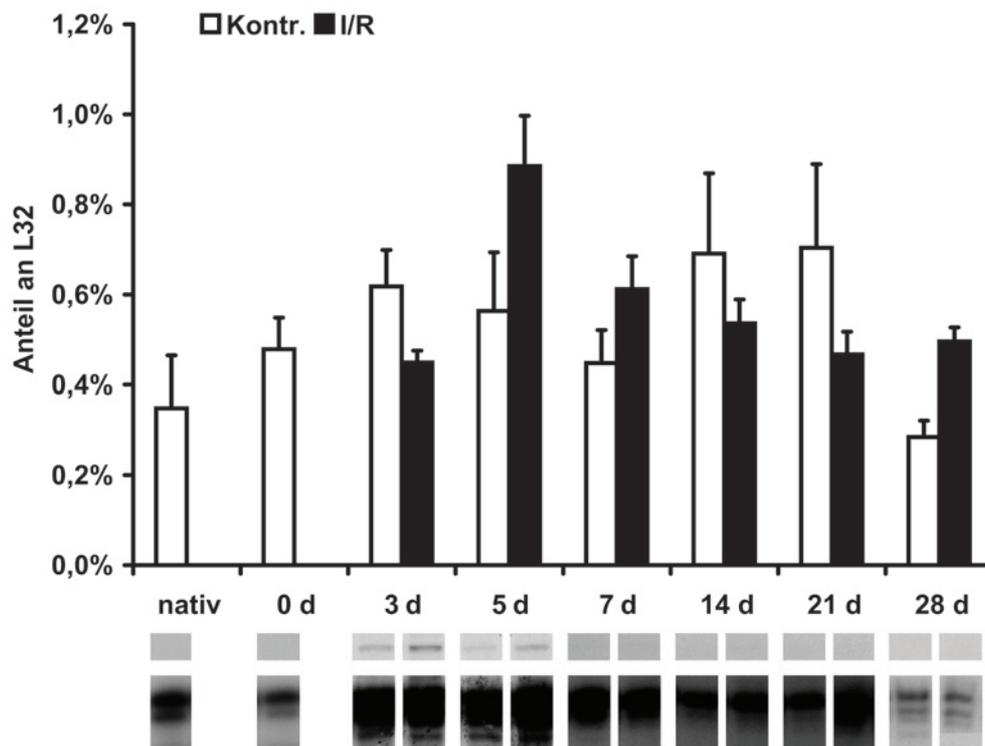
**Abbildung 25.** Induktion der CXCR3-mRNA nach I/R bei WT- vs. EC-SOD-Mäusen. Oben: quantitative Daten der MCP-1-mRNA als Anteil an der L32-mRNA. Unten: repräsentative Autoradiographien der mRNA-Banden von MCP-1 und L32. mRNA-Expression gemessen mit "RNase Protection Assay". I/R, Ischämie/Reperfusion; KG, Kontrollgruppe; d, Tage.

### 3.4 Induktion von Zytokinen im Modell der Ischämie und Reperfusion

#### 3.4.1 Induktion von Zytokinen in Wildtypmäusen

##### *Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$*

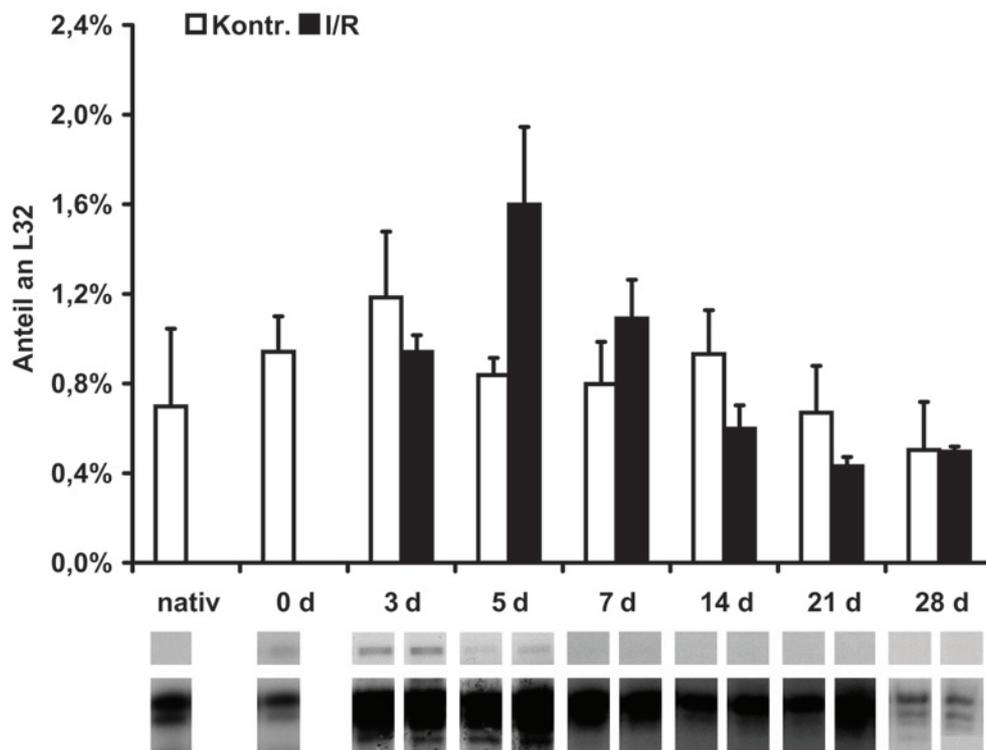
Bei der TNF- $\alpha$ -mRNA-Expression gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen der Nativgruppe und den Kontrollgruppen (Abb. 26). In den I/R-Gruppen war TNF- $\alpha$  nicht signifikant höher exprimiert als in den entsprechenden Kontrollgruppen. Nach 5 Tagen I/R erreichte die TNF- $\alpha$ -mRNA-Synthese den höchsten Wert.



**Abbildung 26.** Induktion der TNF- $\alpha$ -mRNA nach I/R bei WT-Mäusen. Oben: quantitative Daten der TNF- $\alpha$ -mRNA als Anteil an der L32-mRNA. Unten: repräsentative Autoradiographien der mRNA-Banden von TNF- $\alpha$  und L32. mRNA-Expression gemessen mit "RNase Protection Assay". I/R, Ischämie/Reperfusion; d, Tage.

### Interleukin-1 $\beta$

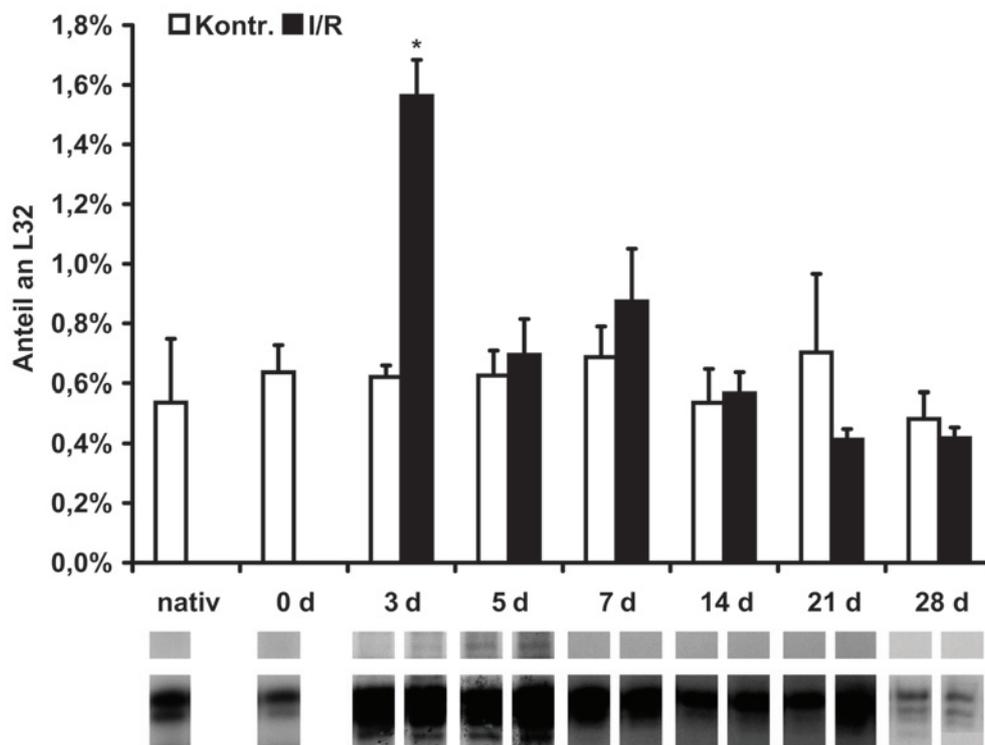
Die mRNA-Expression von IL-1 $\beta$  wich in keiner Kontrollgruppe von der in der Nativgruppe ab (Abb. 27). Verglichen mit den Kontrollgruppen war die IL-1 $\beta$ -mRNA in den jeweiligen I/R-Gruppen nicht signifikant höher exprimiert. Ein tendenzieller Unterschied in der IL-1 $\beta$ -mRNA-Expression war, genauso wie bei TNF- $\alpha$ , zwischen der 5-Tage-I/R- und der 5-Tage-Kontrollgruppe zu erkennen.



**Abbildung 27.** Induktion der IL-1 $\beta$ -mRNA nach I/R bei WT-Mäusen. Oben: quantitative Daten der IL-1 $\beta$ -mRNA als Anteil an der L32-mRNA. Unten: repräsentative Autoradiographien der mRNA-Banden von IL-1 $\beta$  und L32. mRNA-Expression gemessen mit "RNase Protection Assay". I/R, Ischämie/Reperfusion; d, Tage.

### Interleukin-6

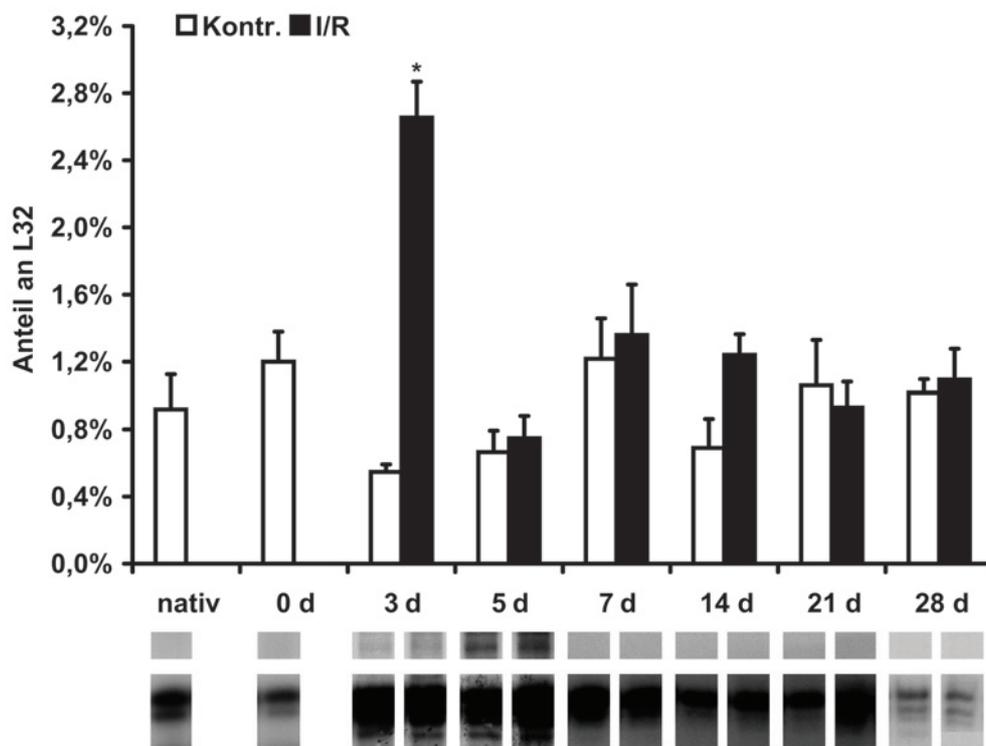
Die mRNA von IL-6 war in den Kontrollgruppen nicht höher exprimiert als in der Nativgruppe (Abb. 28). Nach 3 Tagen I/R kam es zu einer signifikanten Überexpression der IL-6-mRNA im Vergleich zu der 3-Tage-Kontrollgruppe ( $1,56\% \pm 0,12\%$  vs.  $0,62\% \pm 0,04\%$ ,  $p < 0,05$ ).



**Abbildung 28.** Induktion der IL-6-mRNA nach I/R bei WT-Mäusen. Oben: quantitative Daten der IL-6-mRNA als Anteil an der L32-mRNA. Unten: repräsentative Autoradiographien der mRNA-Banden von IL-6 und L32. mRNA-Expression gemessen mit "RNase Protection Assay". I/R, Ischämie/Reperfusion; d, Tage; \*,  $p < 0,05$  vs. jeweilige Kontrollgruppe.

### Interleukin-10

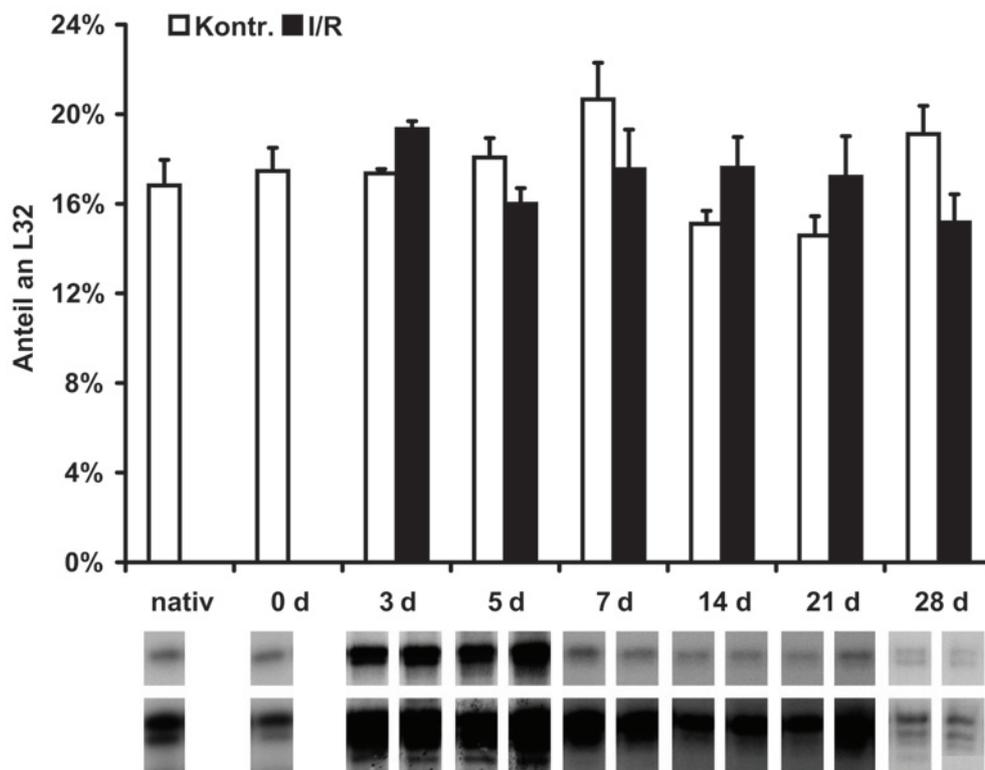
Die IL-10-mRNA-Expression unterschied sich in den Kontrollgruppen und der Nativgruppe nicht signifikant voneinander (Abb. 29). Nach 3 Tagen I/R war die IL-10-mRNA-Expression im Vergleich zu der 3-Tage-Kontrollgruppe signifikant erhöht ( $2,65\% \pm 0,22\%$  vs.  $0,92\% \pm 0,21\%$ ,  $p < 0,05$ ).



**Abbildung 29.** Induktion der IL-10-mRNA nach I/R bei WT-Mäusen. Oben: quantitative Daten der IL-10-mRNA als Anteil an der L32-mRNA. Unten: repräsentative Autoradiographien der mRNA-Banden von IL-10 und L32. mRNA-Expression gemessen mit "RNase Protection Assay". I/R, Ischämie/Reperfusion; d, Tage; \*,  $p < 0,05$  vs. jeweilige Kontrollgruppe.

### *Macrophage Colony-Stimulating Factor*

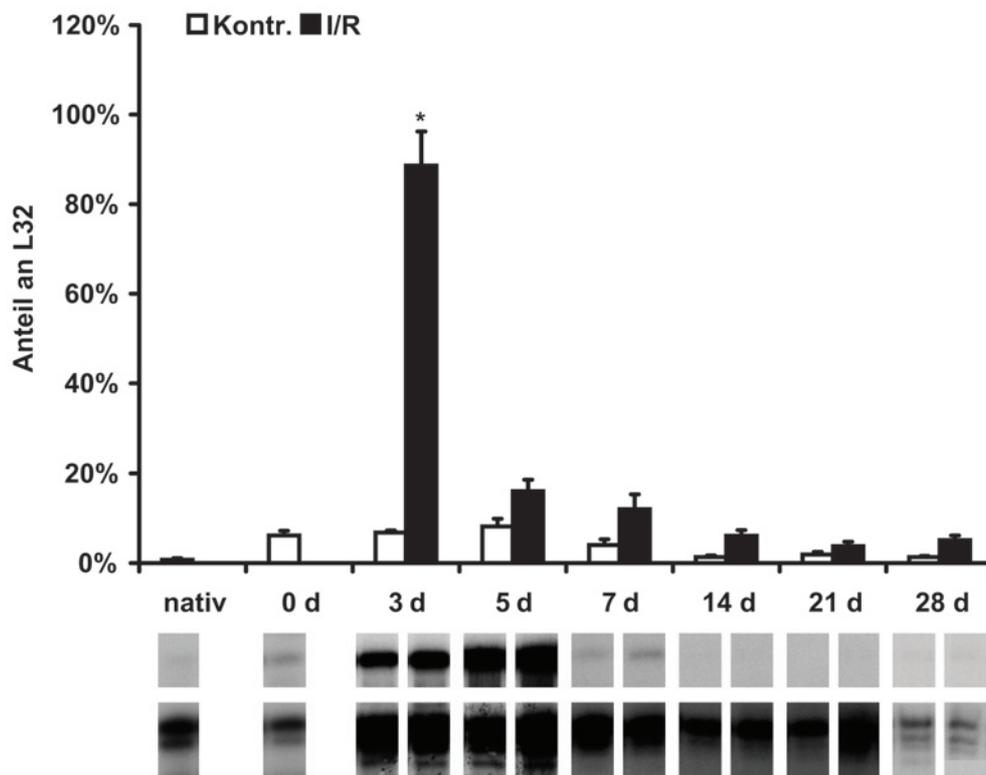
Bei der mRNA-Expression von M-CSF war in der Nativgruppe kein Unterschied gegenüber den Kontrollgruppen zu erkennen (Abb. 30). Ebenso war die M-CSF-mRNA nicht unterschiedlich exprimiert in den verschiedenen I/R-Gruppen verglichen mit den entsprechenden Kontrollgruppen. Bei der M-CSF-mRNA-Expression war daher kein Verlauf zu erkennen.



**Abbildung 30.** Induktion der M-CSF-mRNA nach I/R bei WT-Mäusen. Oben: quantitative Daten der M-CSF-mRNA als Anteil an der L32-mRNA. Unten: repräsentative Autoradiographien der mRNA-Banden von M-CSF und L32. mRNA-Expression gemessen mit "RNase Protection Assay". I/R, Ischämie/Reperfusion; d, Tage.

### Osteopontin

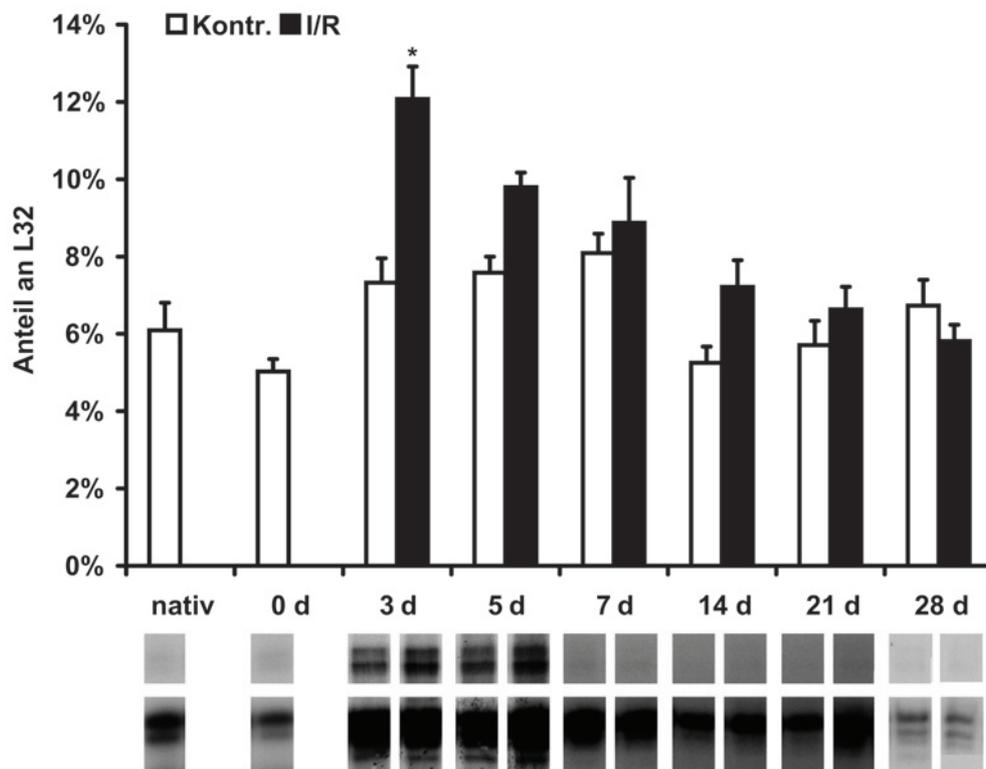
Die mRNA von Osteopontin war in keiner der Kontrollgruppen signifikant höher exprimiert als in der Nativgruppe (Abb. 31). Nur in der 3-Tage-I/R-Gruppe war die Osteopontin-mRNA signifikant höher exprimiert als in der 3-Tage-Kontrollgruppe ( $88,59\% \pm 7,67\%$  vs.  $6,8\% \pm 0,49\%$ ,  $p < 0,05$ ). Bis 5 Tage I/R fiel die Osteopontin-mRNA-Expression stark ab und näherte sich bis 14 Tage I/R den Nativ- und Kontrollgruppenwerten an.



**Abbildung 31.** Induktion der OPN-mRNA nach I/R bei WT-Mäusen. Oben: quantitative Daten der OPN-mRNA als Anteil an der L32-mRNA. Unten: repräsentative Autoradiogramme der mRNA-Banden von OPN und L32. mRNA-Expression gemessen mit "RNase Protection Assay". I/R, Ischämie/Reperfusion; d, Tage; \*,  $p < 0,05$  vs. jeweilige Kontrollgruppe.

### Transforming Growth Factor- $\beta$ 1

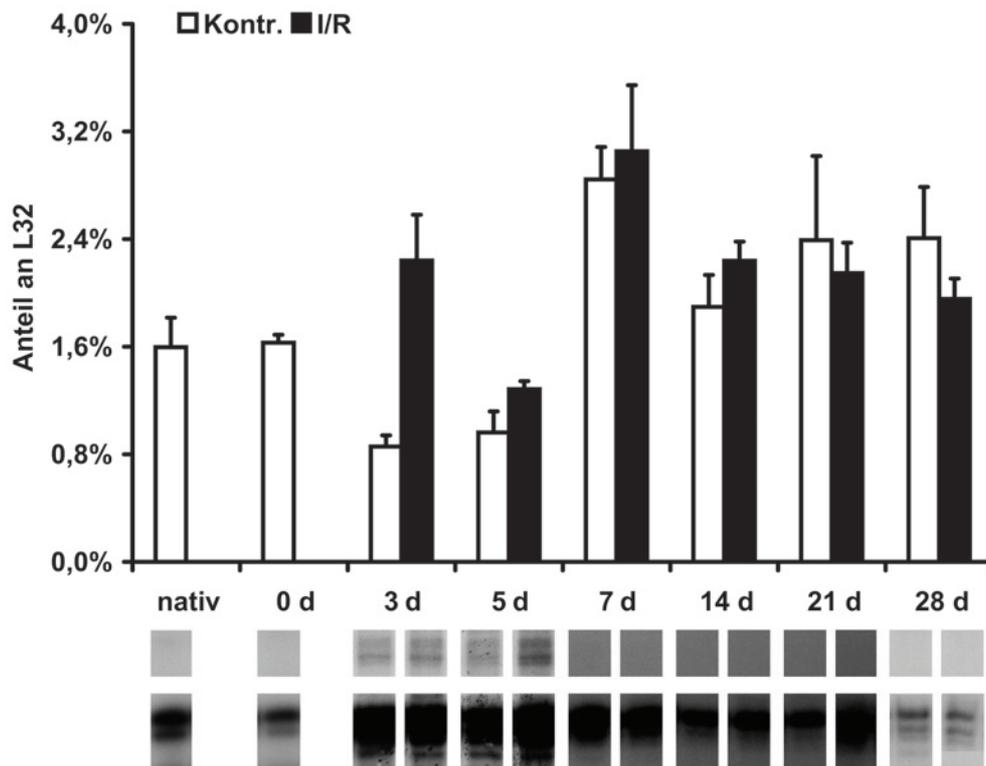
TGF- $\beta$ 1 war in den Kontrollgruppen und in der Nativgruppe gleich exprimiert (Abb. 32). Ein signifikanter Unterschied in der TGF- $\beta$ 1-mRNA-Expression bestand zwischen der 3-Tage-I/R-Gruppe und der 3-Tage-Kontrollgruppe ( $12,07\% \pm 0,84\%$  vs.  $7,33\% \pm 0,63\%$ ,  $p < 0,05$ ). Die TGF- $\beta$ 1-mRNA-Expression nahm nach ihrem Höhepunkt bei 3 Tagen I/R stetig ab, bis sie nach 14 Tagen das Niveau der Kontroll-/Nativtiere erreichte.



**Abbildung 32.** Induktion der TGF- $\beta$ 1-mRNA nach I/R bei WT-Mäusen. Oben: quantitative Daten der TGF- $\beta$ 1-mRNA als Anteil an der L32-mRNA. Unten: repräsentative Autoradiographien der mRNA-Banden von TGF- $\beta$ 1 und L32. mRNA-Expression gemessen mit "RNase Protection Assay". I/R, Ischämie/Reperfusion; d, Tage; \*,  $p < 0,05$  vs. jeweilige Kontrollgruppe.

### Transforming Growth Factor- $\beta$ 2

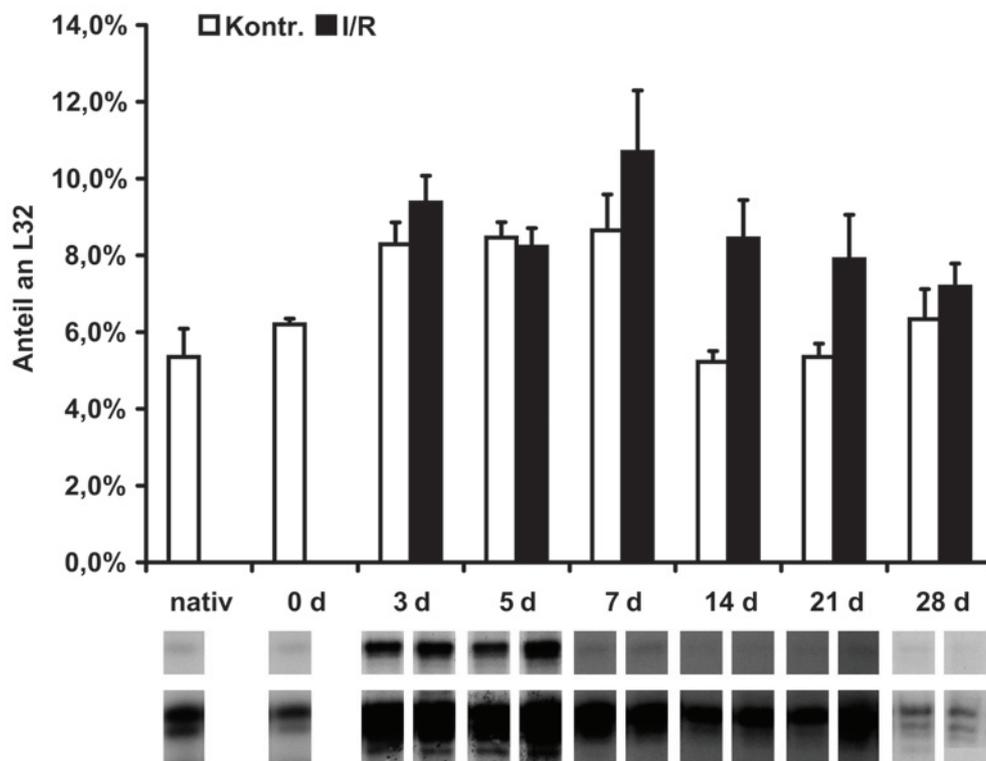
Die TGF- $\beta$ 2-mRNA war in den Kontrollgruppen nicht signifikant höher exprimiert als in der Nativgruppe (Abb. 33). I/R verursachte in keinem untersuchten Zeitraum eine zur jeweiligen Kontrollgruppe signifikant erhöhte mRNA-Expression von TGF- $\beta$ 2. Wenn man die TGF- $\beta$ 2-mRNA-Werte in den I/R-Gruppen im Verhältnis zu den Werten in den entsprechenden Kontrollgruppen betrachtet, lassen sich die insgesamt geringeren TGF- $\beta$ 2-mRNA-Werte in den 3- und 5-Tage-Gruppen als auswertungsbedingt zu niedrig auffassen. Eine verlässliche Aussage über die TGF- $\beta$ 2-Induktion ist daher nicht möglich.



**Abbildung 33.** Induktion der TGF- $\beta$ 2-mRNA nach I/R bei WT-Mäusen. Oben: quantitative Daten der TGF- $\beta$ 2-mRNA als Anteil an der L32-mRNA. Unten: repräsentative Autoradiographien der mRNA-Banden von TGF- $\beta$ 2 und L32. mRNA-Expression gemessen mit "RNase Protection Assay". I/R, Ischämie/Reperfusion; d, Tage.

### Transforming Growth Factor- $\beta$ 3

Bei der TGF- $\beta$ 3-mRNA-Expression gab es in den Kontrollgruppen verglichen mit der Nativgruppe keine signifikanten Unterschiede (Abb. 34). In keiner der I/R-Gruppen waren die Expressionswerte der TGF- $\beta$ 3-mRNA signifikant höher als in der jeweiligen Kontrollgruppe.

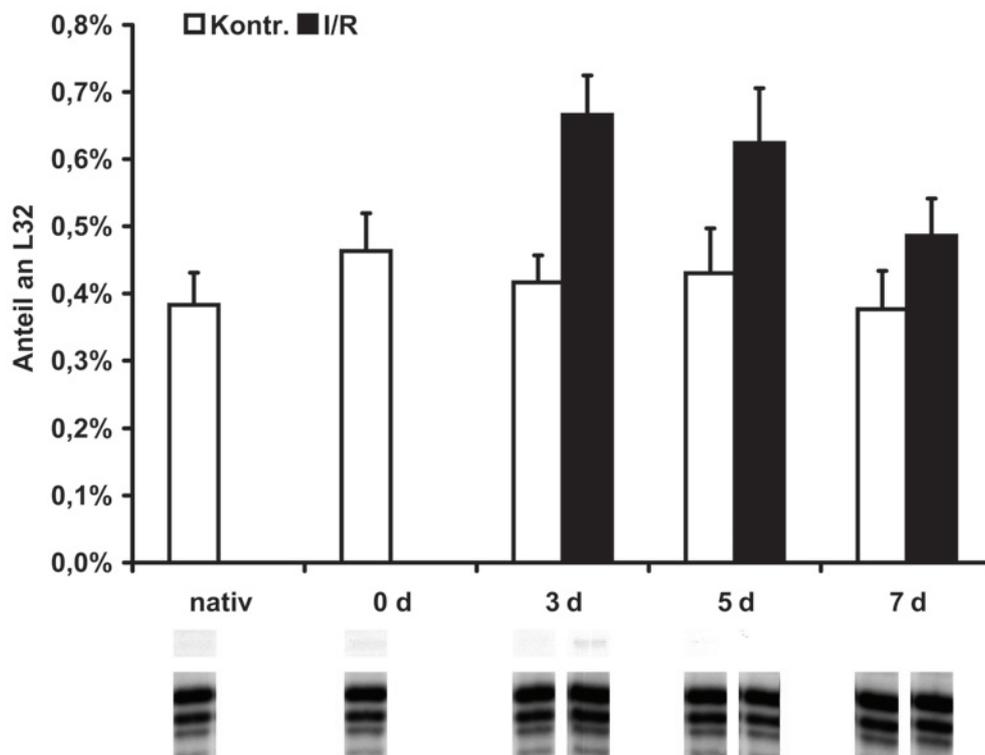


**Abbildung 34.** Induktion der TGF- $\beta$ 3-mRNA nach I/R bei WT-Mäusen. Oben: quantitative Daten der TGF- $\beta$ 3-mRNA als Anteil an der L32-mRNA. Unten: repräsentative Autoradiographien der mRNA-Banden von TGF- $\beta$ 3 und L32. mRNA-Expression gemessen mit "RNase Protection Assay". I/R, Ischämie/Reperfusion; d, Tage.

### 3.4.2 Induktion von Zytokinen in EC-SOD-Mäusen

#### *Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$*

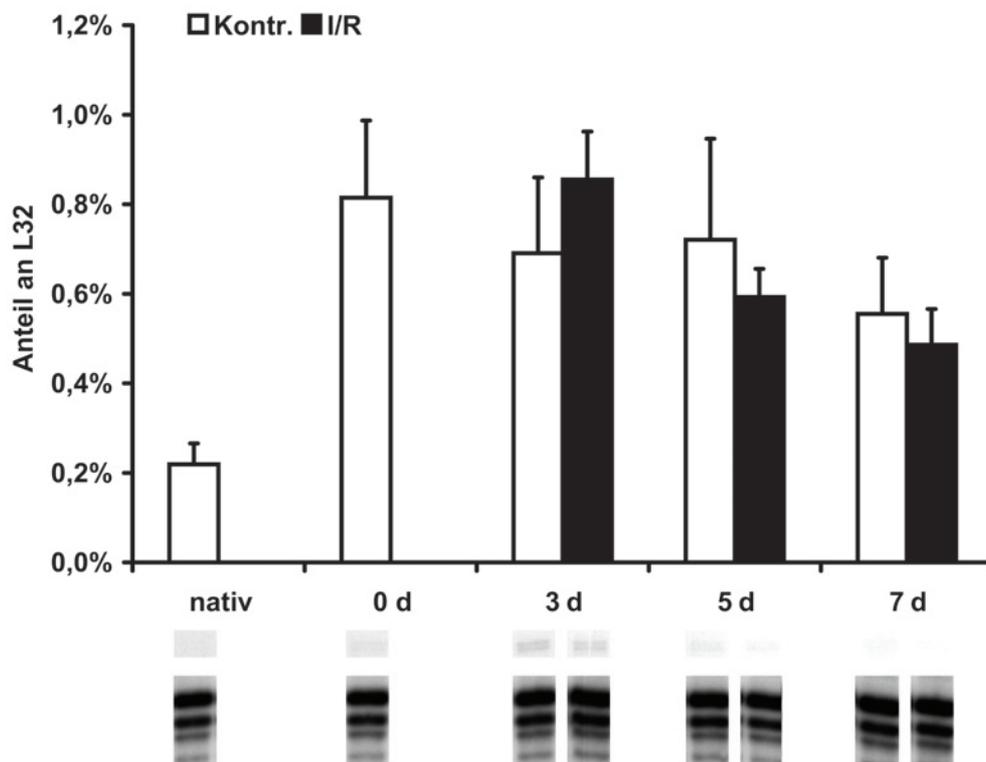
Zu keinem Zeitpunkt nach I/R war die TNF- $\alpha$ -mRNA-Expression signifikant höher als in den Kontrollgruppen (Abb. 35). Allerdings war nach 3 und 5 Tagen I/R die mRNA-Synthese von TNF- $\alpha$  im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollgruppen tendenziell gesteigert. Nach einer Woche ging der TNF- $\alpha$ -mRNA-Wert auf das Niveau der Nativ- und Kontrollgruppen zurück.



**Abbildung 35.** Induktion der TNF- $\alpha$ -mRNA nach I/R bei EC-SOD-Mäusen. Oben: quantitative Daten der TNF- $\alpha$ -mRNA als Anteil an der L32-mRNA. Unten: repräsentative Autoradiographien der mRNA-Banden von TNF- $\alpha$  und L32. mRNA-Expression gemessen mit "RNase Protection Assay". I/R, Ischämie/Reperfusion; d, Tage.

*Interleukin-1 $\beta$* 

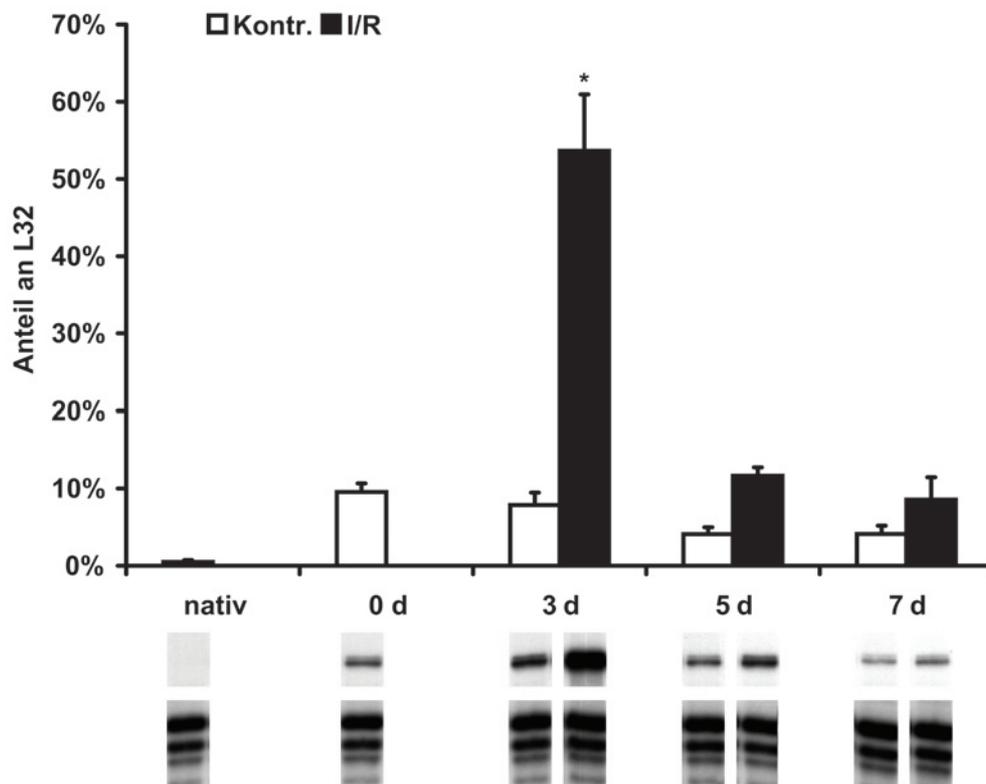
Bei den EC-SOD-Mäusen waren keine signifikanten Unterschiede in der IL-1 $\beta$ -mRNA-Expression zwischen allen I/R- und Kontrollgruppen zu erkennen (Abb. 36).



**Abbildung 36.** Induktion der IL-1 $\beta$ -mRNA nach I/R bei EC-SOD-Mäusen. Oben: quantitative Daten der IL-1 $\beta$ -mRNA als Anteil an der L32-mRNA. Unten: repräsentative Autoradiographien der mRNA-Banden von IL-1 $\beta$  und L32. mRNA-Expression gemessen mit "RNase Protection Assay". I/R, Ischämie/Reperfusion; d, Tage.

### Osteopontin

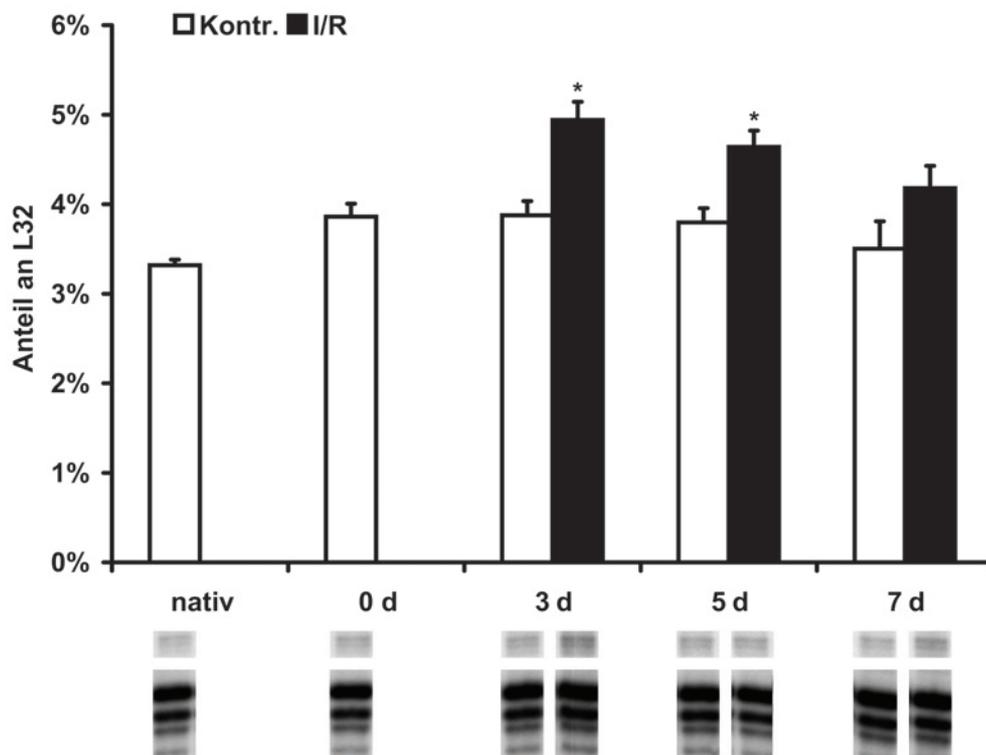
Die mRNA von OPN war in keiner der Kontrollgruppen signifikant höher exprimiert als in der Nativgruppe (Abb. 37). In der 3-Tage-I/R-Gruppe war die OPN-mRNA signifikant höher exprimiert als in der 3-Tage-Kontrollgruppe ( $53,63\% \pm 7,33\%$  vs.  $7,86\% \pm 1,61\%$ ,  $p < 0,05$ ). Bis 5 Tage I/R fiel die OPN-mRNA-Expression stark ab und näherte sich dem Niveau der Nativ- und Kontrollgruppen nach 7 Tage I/R an.



**Abbildung 37.** Induktion der OPN-mRNA nach I/R bei EC-SOD-Mäusen. Oben: quantitative Daten der OPN-mRNA als Anteil an der L32-mRNA. Unten: repräsentative Autoradiographien der mRNA-Banden von OPN und L32. mRNA-Expression gemessen mit "RNase Protection Assay". I/R, Ischämie/Reperfusion; d, Tage; \*,  $p < 0,05$  vs. jeweilige Kontrollgruppe.

### Transforming Growth Factor- $\beta$ 1

Die Transkription der TGF- $\beta$ 1-mRNA (Abb. 38) war bei den EC-SOD-Mäusen nach 3 und 5 Tagen I/R hochreguliert im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollgruppen ( $4,94\% \pm 0,2\%$  vs.  $3,87\% \pm 0,16\%$  und  $4,64\% \pm 0,18\%$  vs.  $3,8\% \pm 0,16\%$ ,  $p < 0,05$ ).



**Abbildung 38.** Induktion der TGF- $\beta$ 1-mRNA nach I/R bei EC-SOD-Mäusen. Oben: quantitative Daten der TGF- $\beta$ 1-mRNA als Anteil an der L32-mRNA. Unten: repräsentative Autoradiographien der mRNA-Banden von TGF- $\beta$ 1 und L32. mRNA-Expression gemessen mit "RNase Protection Assay". I/R, Ischämie/Reperfusion; d, Tage; \*,  $p < 0,05$  vs. jeweilige Kontrollgruppe.

## 4 Diskussion

Die KHK ist eine Herzerkrankung unterschiedlicher Ätiologie, deren Ausprägungen das gemeinsame pathophysiologische Korrelat der Koronarinsuffizienz haben. Die Koronarinsuffizienz ist durch das Missverhältnis zwischen Sauerstoffbedarf und -angebot im Myokard definiert. Die Tatsache, dass die KHK in den Industrieländern die häufigste Todesursache ist [Murray und Lopez, 1996], lenkt großes klinisches und wissenschaftliches Interesse auf deren Behandlung. Eine adäquate Therapie setzt jedoch ein profundes Verständnis der Pathomechanismen, der morphologischen und der funktionellen Merkmale voraus.

Eine Form der KHK ist das hibernierende Myokard, das aufgrund von guten therapeutischen Möglichkeiten ein klinisch sehr relevantes Phänomen darstellt. Ein Merkmal des hibernierenden Myokards ist die regionale linksventrikuläre Dysfunktion, die nach Wiederherstellung der normalen Durchblutung (Revaskularisation) reversibel ist. Pathophysiologisch wird die repetitive I/R als möglicher zugrunde liegender Mechanismus in der Entstehung des hibernierenden Myokard angesehen. Studien an humanem Myokard nach Bypassoperationen und an Tiermodellen mit Revaskularisation nach Ischämie und Reperfusion zeigten eine Verbesserung der ventrikulären Pumpfunktion nach Revaskularisation [Rahimtoola et al., 1982, 1985 a, b, c, 1989, 1995 a, b, 1996, 1997 a, b]. Daher nahmen wir an, dass sich die ventrikuläre Funktion nach repetitiver kurzer I/R in einem Kleintiermodell ebenso verschlechtert und nach Beendigung des I/R-Protokolls (Revaskularisation) wieder normalisiert. Die Entstehung einer ventrikulären Dysfunktion in Tiermodellen wird maßgeblich durch eine inflammatorische Reaktion im Rahmen der Reperfusion eines ischämischen Myokardareals vermittelt. Hierbei kommt es zur Aktivierung verschiedener inflammatorischer Signalkaskaden, unter anderem auch zur Induktion verschiedener Chemokine, mit vielfältiger Auswirkung auf die zelluläre Antwort [Frangogiannis et al., 1998 a, b, c]. Unser Anliegen war es, die Rolle der Chemokine in einem Mausmodell der repetitiven, kurzen I/R ohne Infarkt zu untersuchen. In einem bereits etablierten Mausmodell wurde eine sauerstoffradikalen-vermittelte Chemokin-Induktion nach I/R ohne ventrikuläre Dysfunktion beschrieben [Nossuli et al., 2001]. In unserem Modell der repetitiven I/R wollten wir zunächst die Induktion der Chemokine und die Entwicklung der ventrikulären Dysfunktion untersuchen. In einem zweiten Schritt wollten wir dann den Einfluss der Sauerstoffradikale auf die inflammatorische Antwort und die Entstehung der ventrikulären Dysfunktion objektivieren. Diese Fragestellung haben wir an EC-SOD-überexprimierenden Mäusen geprüft.

## 4.1 Allgemein über das Modell der Ischämie und Reperfusion

Die höhere Überlebensrate nach initialer Operation bei den EC-SOD-Mäusen (92% vs. 76% bei WT-Mäusen) lässt sich mit einer Lernkurve erklären. Die initiale Operation der Mäuse war der schwierigste und damit der übungsbedürftigste Teil der chirurgischen Eingriffe. Zu den Hauptkomplikationen des initialen Eingriffes zählten der Pneumothorax durch mechanische Verletzung der Lunge sowie massive Blutungen durch akzidentielle Verletzungen der Arteria thoracica interna. In beiden Fällen verstarben die Mäuse meist während bzw. unmittelbar nach der Operation. Die WT-Mäuse waren die ersten Tiere, an denen diese Operation durchgeführt wurde. Nach Routinierung der operativen Technik an den WT-Mäusen ging daher die initiale Operation bei den nachfolgenden EC-SOD-Mäusen mit einer geringeren Sterberate einher. Die nahezu 100%ige Überlebensrate nach dem I/R-Eingriff war bei den WT- und EC-SOD-Mäusen gleich. Das lässt sich damit erklären, dass der hierzu erforderliche chirurgische Eingriff um vieles weniger invasiv und somit weniger riskant war als die initiale Operation.

## 4.2 Ventrikuläre Dysfunktion

Ventrikuläre Dysfunktion ist eines der wesentlichen Merkmale der ischämischen Kardiomyopathie. Ischämie kann auch ohne Infarkt zu Schädigung von Myokardarealen führen und somit eine Dysfunktion hervorrufen, die nach Revaskularisation wieder reversibel ist [Rahimtoola et al., 1989]. Dieser Befund hat dazu geführt, dass Tiermodelle zur Simulation der I/R entwickelt wurden, die jedoch bisher nicht alle Charakteristiken einer ischämischen Kardiomyopathie aufwiesen [Verdouw et al., 1998].

In unserem Mausmodell induzierte die repetitive kurze (15 Minuten) I/R eine globale und segmentale linksventrikuläre Dysfunktion, die nach Reperfusion reversibel war. Die Fraktionsverkürzung als Parameter der globalen ventrikulären Funktion verminderte sich nach 7 Tagen I/R signifikant und persistierte bis zum Ende des I/R-Protokolls (Abb. 6). Eine signifikante Einschränkung der regionalen linksventrikulären Pumpfunktion - Vorderwandverdickung - trat bereits nach 3 Tagen I/R auf, war jedoch bis 7 Tage I/R progredient und stagnierte ebenfalls im weiteren Verlauf (Abb. 8). Eine 30-tägige Erholung nach 7-tägiger I/R führte lediglich zu einer tendenziellen Verbesserung der globalen und der regionalen Pumpfunktion, die allerdings jeweils nach 60 Tagen signifikant wurde. Die Erholung nach 28-tägiger I/R führte zu ähnlichen Ergebnissen (Abb. 9 und 10). Die Ausgangswerte (0-Tage-Kontrollgruppe) wurden jedoch nach

Regression für beide Parameter nicht erreicht. Der Vergleich der unveränderten globalen sowie regionalen linksventrikulären Pumpfunktion des Myokards der 0-Tage-Kontrolltiere mit dem normokinetischen Myokard der Nativmäuse bestätigt, dass das initiale Operationstrauma in dem vorliegenden Mausmodell keinen bedeutenden Effekt auf die kontraktile Myokardfunktion ausübt. Somit ist die ventrikuläre Dysfunktion nach den I/R-Ereignissen als ausschliesslich durch diese bedingt anzusehen.

Die Überexpression des EC-SOD-Gens bei den EC-SOD-Mäusen und die daraus resultierende Verringerung der Sauerstoffradikale führte im Gegensatz zu den WT-Mäusen zu keiner signifikanten Veränderung der globalen und regionalen linksventrikulären Pumpfunktion im Verlauf des I/R-Protokolls (Abb. 11 und 12). Nach 3 Tagen I/R war bei den EC-SOD-Mäusen, wie bei den WT-Mäusen, eine tendenzielle Einschränkung der regionalen Ventrikelfunktion zu erkennen. Die globale sowie regionale linksventrikuläre Pumpfunktion der WT-Mäuse jedoch verschlechterten sich bis 7 Tage I/R kontinuierlich. Dagegen blieben sie bei den EC-SOD-überexprimierenden Mäusen nach 3 Tagen I/R unverändert. Die globale linksventrikuläre Pumpfunktion der WT-Mäuse war nach 7 Tagen I/R signifikant stärker reduziert als die der EC-SOD-Mäuse.

Diese Ergebnisse lassen folgende Schlüsse zu: 1.) Im Verlauf des I/R-Protokolls kommt es zu einer progredienten und persistierenden ventrikulären Dysfunktion. 2.) Durch Regression nach Diskontinuierung des I/R-Protokolls kommt es zur Wiederherstellung der Pumpfunktion, jedoch reichen auch 60 Tage Erholung nicht für eine vollständige Wiederherstellung der ventrikulären Funktion aus. 3.) Sauerstoffradikale könnten an der Entstehung der ventrikulären Dysfunktion beteiligt sein.

Die vorliegende Arbeit ist Teil eines größeren Projekts, in dessen Rahmen auch histologische Studien durchgeführt wurden. Die quantitative Auswertung des Kollagenanteils an der linksventrikulären ischämischen Region bei WT-Mäusen ergab eine signifikante Zunahme der Fibrose mit einem Maximum nach 7 Tagen I/R, die parallel zur Entstehung der ventrikulären Dysfunktion auftrat [Dewald et al., 2003]. Nach Beendigung des I/R-Protokolls kam es zur Regression des Kollagenanteils parallel zur Besserung der ventrikulären Pumpfunktion. Bei den EC-SOD-Mäusen fand man dagegen signifikant weniger Kollagenablagerung nach 7 Tagen I/R in Abwesenheit der oben beschriebenen ventrikulären Dysfunktion.

Diese Befunde sind vergleichbar mit Befunden beim menschlichen hibernierenden Myokard, wo ein direkter Zusammenhang zwischen regionaler Dysfunktion und Fibrosegrad

angenommen wurde [Ausma et al., 1995 a, b; Borgers et al., 1993; Borgers und Ausma, 1995; Depre et al., 1995, 1997; Elsässer et al., 1998; Flameng et al., 1981; Maes et al., 1994; Nagueh et al., 1999; Rahimtoola et al., 1989; Vanoverschelde et al., 1993, 2001]. Heusch hat 1998 an verschiedenen Modellen der Hibernation beschrieben, dass der Verlust von kontraktile Funktion eine schnelle und sensitive Konsequenz einer regionalen Ischämie ist [Heusch, 1998]. In einer Studie an chronisch instrumentierten, wachen Hunden erholte sich die regionale kontraktile Funktion nach Reperfusion, vollständige Regression trat jedoch erst nach 7 Tagen ein [Matsuzaki et al., 1983].

### **4.3 Induktion von Chemokinen im Modell der Ischämie und Reperfusion**

Klinische Studien zeigen, dass Reperfusion nach transienter Ischämie zunächst zu einer stärkeren Gewebsschädigung führen kann als Ischämie ohne Reperfusion [Shin et al., 2002], dass jedoch langfristig die Reperfusion für den Gewebserhalt von Vorteil ist. Tierexperimentelle Untersuchungen haben eine massive inflammatorische Reaktion während der ersten Tage der Reperfusion nach Ischämie gezeigt, und Chemokine spielten dabei mit ihren pleiotropen chemotaktischen Effekten auf die Monozyten, Makrophagen und Leukozyten eine entscheidende Rolle [Frangogiannis et al., 1996].

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich, dass repetitive kurze myokardiale I/R die mRNA-Expression von Chemokinen transitorisch mit einem Höhepunkt nach 3 bis 5 Tagen induzierte. Trotz der täglichen I/R waren die Chemokine nach 14 Tagen nicht mehr induziert. Daher kann man vermuten, dass die Chemokine an der Entstehung der Fibrose und der ventrikulären Dysfunktion beteiligt sind, dass aber für deren Aufrechterhaltung im Verlauf des I/R-Protokolls andere Mechanismen verantwortlich sein könnten. Diese Chemokin-vermittelte Reaktion wurde durch Überexpression der EC-SOD im vorliegenden Mausmodell der repetitiven kurzen I/R weitgehend vermindert. Die Befunde bei EC-SOD-überexprimierenden Mäusen weisen damit auf einen Einfluss von Sauerstoffradikalen auf die Induktion der Chemokin-mRNA und die inflammatorische Antwort in diesem I/R-Modell hin. Auf den nächsten Seiten werden die Ergebnisse der einzelnen Chemokine diskutiert.

MIP-1 $\beta$  ist ein proinflammatorisches Chemokin der CC-Gruppe [Birdsall et al., 1997; Wang et al., 1998]. Nossuli et al. zeigten in einem Mausmodell, dass es nach einmaliger kurzer Ischämie (15 Minuten) und Reperfusion (3 Stunden) in Abwesenheit von Infarkt zu einer Sauerstoffradikal-

abhängigen Hochregulation von MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  und MIP-2 im Endothel von Venulen kam [Nossuli et al., 2001]. Venulen unterstützen zwei wichtige Effekte von Chemokinen: 1.) Das postkapilläre Netzwerk ist der Ort der Extravasation von Blutzellen [Hawkins et al., 1996], auf die die Chemokine durch Chemotaxis einen wichtigen Einfluss nehmen [Frangogiannis et al., 2002 c]. 2.) Angiogenese beginnt in dem Endothel von Venulen [Folkman, 1982]. Somit könnte die Induktion von MIP-1 $\beta$  (und ebenso MIP-1 $\alpha$  und MIP-2) Auswirkungen auf Chemotaxis und Extravasation von inflammatorischen Zellen haben und eine Rolle in der Angiogenese im ischämisch-reperfundierten Myokard spielen. Übereinstimmend damit fanden wir in den EC-SOD-überexprimierenden Mäusen eine geringere Induktion von MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  und MIP-2 durch I/R als in den WT-Mäusen. In unserem Tiermodell war MIP-1 $\beta$  nach 3 bis 7 Tagen I/R hochreguliert mit einem Maximum nach 5 Tagen I/R (Abb. 13). Die Induktion der MIP-1 $\beta$ -mRNA fiel zeitlich mit der Entstehung der Fibrose und der ventrikulären Dysfunktion zusammen [Dewald et al., 2003]. Nachdem das linksventrikuläre Remodeling abgeschlossen war, wurde keine Induktion der Chemokine mehr beobachtet. Dasselbe galt auch für die Regression, wo Chemokine zu keinem Zeitpunkt induziert waren. Wir zeigten in unserem Mäusemodell, dass die MIP-1 $\beta$ -mRNA-Expression in EC-SOD-Mäusen im Vergleich zu den entsprechenden WT-Mäusen nach 5 und 7 Tagen I/R signifikant geringer exprimiert war (Abb. 20). Außerdem fiel auf, dass die Verlaufskinetik der MIP-1 $\beta$ -mRNA-Expression in den EC-SOD-Mäusen im Vergleich zu den WT-Mäusen unterschiedlich war. In den WT-Mäusen war ein Induktionsmaximum nach 5 Tagen zu erkennen, während der höchste Expressionswert der MIP-1 $\beta$ -mRNA in den EC-SOD-Mäusen nach 3 Tagen I/R erreicht war. Dieser Befund könnte darauf hinweisen, dass die MIP-1 $\beta$ -mRNA in den EC-SOD-Mäusen nicht nur geringer exprimiert ist als in den WT-Mäusen, sondern auch, dass es durch EC-SOD-Überexpression und damit Verringerung von schädlichen Sauerstoffradikalen zu einer früheren Abschwächung der inflammatorischen Reaktion im ischämisch-reperfundierten Myokard kommt. Der geringere Unterschied in der Chemokinexpression zwischen EC-SOD- und WT-Mäusen nach 3 Tagen I/R im Vergleich zu 5 und 7 Tagen könnte dahingehend interpretiert werden, dass nach 3 Tagen I/R eine andere Isoform der SOD oder andere Enzyme maßgeblich an der Neutralisation der Sauerstoffradikale beteiligt sind. Im Einklang mit Befunden anderer Gruppen [Nossuli et al., 2001] weisen unsere Ergebnisse auf eine entscheidende Rolle der reaktiven Sauerstoffradikale in der Induktion von Chemokinen hin.

Bei MIP-1 $\alpha$  handelt es sich - ebenso wie bei MIP-1 $\beta$  - um ein Chemokin der CC-Gruppe mit inflammatorischen Eigenschaften [Wang et al., 1998]. Unsere Ergebnisse zeigten nach

3 Tagen eine tendenzielle, nach 5 Tagen eine signifikante Hochregulation der MIP-1 $\alpha$ -mRNA durch I/R (Abb. 14). Auch hier lässt sich ein zeitlicher Zusammenhang zwischen Induktion von MIP-1 $\alpha$ -mRNA und Progredienz der Fibrose und der ventrikulären Dysfunktion herstellen. Die Entstehung der Dysfunktion wurde von der MIP-1 $\alpha$ -mRNA-Induktion begleitet. Nach 7 Tagen I/R war MIP-1 $\alpha$  nicht mehr induziert und die Dysfunktion stagnierte. In der vorliegenden Arbeit ist die MIP-1 $\alpha$ -mRNA in den EC-SOD-Mäusen nach 5 Tagen signifikant niedriger exprimiert als in den WT-Mäusen (Abb. 21). Auch nach 7 Tagen ist ein tendenzieller Unterschied zu erkennen. Wie bei MIP-1 $\beta$  lassen die Verlaufskinetiken von MIP-1 $\alpha$  vermuten, dass Sauerstoffradikale einen Effekt auf die mRNA-Induktion von MIP-1 $\alpha$  haben. Fasst man die bisherigen Befunde zusammen, spielt auch dieses Chemokin vermutlich eine Rolle in der Induktion von inflammatorischen Vorgängen im ischämischen Myokard nach dem auf die Reperfusion folgenden "oxidative burst", was dann zu Remodeling und ventrikulärer Dysfunktion führt.

MIP-2 ist ein proinflammatorisches ELR-CXC-Chemokin [Olson und Ley, 2002], das polymorphonukleäre Leukozyten und Monozyten stimuliert und so eine regulatorische Rolle in myokardialer Ischämie spielt [Chandrasekar et al., 2001; Massey et al., 1995; Tarzami et al., 2002]. Unsere Versuche zeigten eine tendenzielle Induktion dieses Chemokins durch 5-tägige I/R (Abb. 15), was mit dem Induktionsmuster von MIP-1 $\alpha$  und MIP- $\beta$  übereinstimmte. Auch hier legt der zeitliche Zusammenhang zwischen MIP-2-Expression, Remodeling und Entwicklung der ventrikulären Dysfunktion die Vermutung nahe, dass MIP-2 eine Rolle bei der Rekrutierung von inflammatorischen Zellen in ischämische Areale und bei der Vermittlung der Inflammation spielt. Auch hier kann man aus den Verlaufskinetiken der MIP-2-Induktion in den EC-SOD- und WT-Mäusen die Vermutung ableiten, dass Sauerstoffradikale einen nachhaltigen Effekt auf die Chemokinexpression haben (Abb. 22). Ebenso könnten Sauerstoffradikale hier nach 3 Tagen von einer anderen Isoform der SOD oder anderen Enzymen abgebaut werden. Insgesamt lassen die Ergebnisse auf eine teilweise Sauerstoffradikal-abhängige Induktion von MIP-2 schließen und darauf, dass MIP-2 ein wichtiger chemotaktischer Faktor für Leukozytenmigration und gegenseitige Leukozytenaktivierung sein könnte.

IP-10 ist ein non-ELR-CXC-Chemokin, das auch bei der Aktivierung von Monozyten bzw. Makrophagen eine Rolle spielt [Angiolillo et al., 1995; Frangogiannis et al., 2001, 2000 b; Loetscher et al., 1998; Luster und Ravetch, 1987, Strieter et al., 1995]. Die vorliegende Arbeit zeigt eine transiente Induktion der IP-10-mRNA durch repetitive kurze I/R nach 3 Tagen, die nach 5 Tagen ihren Höhepunkt erreichte und signifikant war (Abb. 16). Nach 7 Tagen war die IP-10-

mRNA nicht mehr induziert. Der Zeitpunkt der Induktion lässt einen Zusammenhang zwischen der IP-10-Induktion und der Einwanderung und Differenzierung von Makrophagen im I/R-Areal mit einem Höhepunkt nach 5 Tagen I/R vermuten. Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen auf eine Sauerstoffradikal-abhängige Induktion von IP-10 schließen. In EC-SOD-Mäusen war nach 5-tägiger Anwendung des I/R-Protokolls eine signifikant geringere IP-10-Induktion zu sehen als in WT-Tieren (Abb. 23). Der Umstand, dass die IP-10-mRNA nach 3 Tagen bei beiden Mäusegruppen gleich hoch exprimiert war, könnte wie bei den schon genannten Chemokinen zeigen, dass nach 3 Tagen I/R eine andere Isoform der SOD oder andere Enzyme für den Abbau von Sauerstoffradikalen verantwortlich sind.

MCP-1 ist ein Chemokin der CC-Gruppe. Sein wichtigstes Merkmal ist ein starker chemotaktischer Effekt auf monozytäre Zellen [Wang et al., 1998]. Frangogiannis et al. demonstrierten, dass dieses Molekül auch im reperfundierten, infarzierten Myokard ein starkes chemotaktisches Signal für mononukleäre Zellmigration darstellt [Frangogiannis et al., 1998 a; Kummar et al., 1997]. In unserem Mäusemodell wurden parallel zur Induktion der Chemokine auch transient vermehrt Monozyten und Makrophagen im ischämischen Bereich gefunden [Dewald et al., 2003]. Die repetitive kurze I/R führte nach 3 Tagen zu einer signifikanten Induktion von MCP-1, die bis 7 Tage I/R abnahm und nach 14 Tagen das Niveau der Kontrollmäuse erreichte (Abb. 17). Dieser Zeitverlauf entspricht der Progredienz der regionalen ventrikulären Dysfunktion bzw. des Remodelings. Die Induktion dieses Chemokins durch repetitive kurze I/R war, verglichen mit den anderen untersuchten Chemokinen, bei weitem am höchsten. Im weiteren Verlauf des I/R-Protokolls sowie während der Regression wurde keine Induktion von MCP-1 beobachtet (Abb. 19). Diese Befunde lassen einen besonderen Einfluss von MCP-1 auf die frühe Entstehung der Inflammation nach I/R durch Rekrutierung und Extravasation von monozytären Zellen und damit auf die Fibrose und die darauf folgende ventrikuläre Dysfunktion vermuten. In einem Hundemodell mit hydraulischer Okklusion des Ramus circumflexus mit 15-minütiger Ischämie und 5-stündiger Reperfusion zeigten Lakshminarayanan et al., dass die allgemeine Induktion von TNF- $\alpha$  im ischämischen Gewebe nicht die hochspezifische Lokalisierung der MCP-1-Induktion im Endothel der Venulen während der frühen Reperfusion erklärt. Außerdem wurde MCP-1-mRNA-Induktion nach Infusion des Radikalfängers N-2-Mercaptopropionylglycin (MPG) nicht beobachtet. Diese Daten ließen darauf schließen, dass möglicherweise durch diese reversiblen ischämischen Episoden generierte reaktive Sauerstoffradikale MCP-1 in den Venulen induzieren [Lakshminarayanan et al., 2001]. In der vorliegenden Arbeit wurde ein Einfluss von Sauerstoffradikalen auf die Induktion von MCP-1-

mRNA nachgewiesen. Durch Verminderung der Sauerstoffradikale in EC-SOD-überexprimierenden Mäusen kam es teilweise zu einer signifikant geringeren Induktion von MCP-1 im ischämisch-reperfundierten Myokard im Vergleich zu WT-Mäusen (Abb. 24). Der Einfluss der Sauerstoffradikale konnte jedoch nur als partiell angesehen werden, da I/R auch bei den EC-SOD-Mäusen zu einer Induktion der MCP-1-Transkription führte. Der Höhepunkt der MCP-1-mRNA-Induktion im untersuchten Zeitintervall lag sowohl bei den WT- als auch bei den EC-SOD-Mäusen bei 3 Tagen I/R, anders als bei den MIP-Chemokinen, bei denen er sich am 5. Tag manifestierte. Dieser Unterschied in der Induktionskinetik könnte verschiedene Ursachen haben, z.B. die Verstärkung der MCP-1-Induktion durch eingewanderte monozytäre Zellen, die Aktivierung einer anderen Isoform der Superoxiddismutasen oder andere beteiligte Enzyme.

CXCR3 ist ein Rezeptor für einige Chemokine der CXC-Gruppe, wie z.B. IP-10 [Loetscher et al., 1998]. Er wird ausschließlich auf Zellen der lymphozytären Linie exprimiert [Balashov et al., 1999; Forster et al., 1994; Qin et al., 1998; Unutmaz et al., 2000] und interagiert nicht mit Neutrophilen [Horuk, 2001]. Der Anteil der mRNA von CXCR3 an der L32-mRNA war mit nur etwa 0,01% nach maximaler Induktion durch 3-tägige I/R sehr gering und liegt damit in einem Bereich, in welchem die Sensitivität der angewendeten Methode (RPA) in Frage gestellt werden muss (Abb. 18). Dies wird auch aus dem Vergleich der relativ hohen Werte der CXCR3-mRNA in der Nativgruppe mit denen der I/R-Gruppen klar. Auch ein Einfluss von Sauerstoffradikalen konnte durch die in der vorliegenden Arbeit hervorgebrachten Ergebnisse nicht nachgewiesen werden (Abb. 25). Der Befund, dass die CXCR3-mRNA nach 3 und 5 Tagen I/R nur tendenziell induziert war, könnte damit erklärt werden, dass lymphozytäre Zellen im ischämisch-reperfundierten Myokard nicht häufig auftreten und somit keine wesentliche Rolle im inflammatorischen Prozess spielen.

Zusammengefasst passen diese Ergebnisse in das Konzept, dass es nach Reperfusion des ischämischen Myokards zu einem Sauerstoffradikal-vermittelten "oxidative burst" kommt, der zu einer Induktion von Chemokinen, vornehmlich MCP-1, führt und über Rekrutierung von v.a. Monozyten und Makrophagen die Inflammationsreaktion im ischämischen Gewebe induziert. Bei der MCP-1-Induktion spielen auch TNF- $\alpha$  und andere proinflammatorische Zytokine wie IL-1 $\beta$  eine Rolle, welche ihrerseits eine zur inflammatorischen Antwort beitragende Zytokinkaskade auslösen (s.u.).

#### 4.4 Induktion von Zytokinen im Modell der Ischämie und Reperfusion

In dem vorliegenden Mausmodell konnten wir zeigen, dass durch repetitive kurze I/R bei WT-Mäusen die mRNA-Expression einiger mit der inflammatorischen Antwort assoziierter Zytokine sequentiell und reversibel mit einem Maximum nach 3 bzw. 5 Tagen induziert war. Sämtliche Zytokine erreichten nach 7 Tagen I/R wieder die Werte der 0-Tage-Kontrollgruppe. Diese transiente Induktion war vergleichbar mit der der Chemokine und steht damit wahrscheinlich in Zusammenhang mit der transienten zellulären Infiltration in den ersten Tagen des I/R-Protokolls. Im Folgenden werden die Ergebnisse der einzelnen Zytokine diskutiert.

TNF- $\alpha$  ist ein proinflammatorisches Zytokin, welches im Zusammenhang mit I/R von verschiedenen Arbeitsgruppen untersucht wurde. Aus Mastzellen freigesetztes TNF- $\alpha$  wird als "upstream"-Zytokin in der die Inflammation auslösenden Zytokinkaskade angesehen [Frangogiannis et al., 1998 b, 2002 c]. Mastzellen wurden von Gordon et al. als eine wichtige Quelle von präformiertem und immunologisch induziertem TNF- $\alpha$  identifiziert [Gordon und Galli, 1990; Gordon et al., 1990]. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen nur eine tendenzielle Induktion der mRNA von TNF- $\alpha$  durch 5-tägige I/R auf (Abb. 26). Dieser Befund lässt sich auch mit den Ergebnissen an Hunderversuchen von Gordon et al. und Frangogiannis et al. untermauern: TNF- $\alpha$  wird demnach als frühe Folge der Myokardischämie aus präformierten Vesikeln von Mastzellen freigesetzt und setzt die Zytokinkaskade in Gang, die letztlich zur Inflammation führt. Komplementfaktor C5a, Adenosin und Sauerstoffradikale werden als Stimuli für die Mastzelldegranulation angesehen. Mastzelldegranulation scheint auf die ischämischen Gebiete beschränkt zu sein und resultiert in der schnellen Freisetzung von TNF- $\alpha$ , was wiederum IL-6 in infiltrierenden mononukleären Zellen induziert [Frangogiannis et al., 1998 b, 2002 b, c]. In einer weiteren Studie konnten wir zeigen, dass ein Myokardinfarkt bei Mäusen nicht mit einer Einwanderung von Mastzellen einhergeht [Gersch et al., 2002]. Daher bleibt anzunehmen, dass die Monozyten/Makrophagen in diesem Modell der repetitiven I/R die Quelle der TNF- $\alpha$ -Freisetzung darstellen. Anhaltende TNF- $\alpha$ -Expression spielt auch in postischämischen reparativen Prozessen eine Rolle [Jacobs et al., 1999]. In unserem Modell konnten wir nachweisen, dass die tendenzielle Induktion der TNF- $\alpha$ -mRNA durch I/R lediglich nach 5 Tagen und somit zeitgleich mit der massiven zellulären Infiltration und Fibrogenese auftrat [Dewald et al., 2003]. Der Einfluss von Sauerstoffradikalen auf die Expression von TNF- $\alpha$ -mRNA konnte in unserem Modell nicht eindeutig abgeklärt werden, da die Induktion bei WT-Mäusen nur tendenziell erhöht und bei EC-SOD-Mäusen fast nicht vorhanden war. Außerdem konnten die

mRNA-Werte von den WT- und EC-SOD-Mäusen aus auswertungstechnischen Gründen (siehe Methoden) nicht direkt miteinander verglichen werden.

IL-1 $\beta$  ist ein proinflammatorisches Zytokin [Frangogiannis et al., 1998 b, 2000 b, 2000 c; Hwang et al., 2001]. Ihm wird eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie des Remodelings nach Myokardinfarkt zugeschrieben [Francis, 1998; Ono et al., 1998; Swynghedauw, 1999]. IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  induzieren Hypertrophie der Myozyten in vitro [Horio et al., 1998; Neumann et al., 1993; Yokoyama et al., 1997] und vermitteln Gewebsfibrose in vivo [Neumann et al., 1993; Ono et al., 1998; Yue et al., 1998]. IL-1 $\beta$ -Expression ist proportional zum Grad der interstitiellen Fibrose in einem Myokardinfarktmodell bei Ratten [Ono et al., 1998]. In einem anderen Modell suppressierte anti-IL-1 $\beta$ -Behandlung Prokollagen-Genexpression und verzögerte Mechanismen der Wundheilung und damit des Remodelings [Hwang et al., 2001]. Ein Zusammenhang zwischen IL-1 $\beta$ -Induktion und Fibrose mit konsekutiver ventrikulärer Dysfunktion kann auch im vorliegenden Modell der kurzen repetitiven I/R ohne Myokardinfarkt vermutet werden: nach 5 Tagen I/R kam es zu einer tendenziellen Induktion der IL-1 $\beta$ -mRNA (Abb. 27) mit gleichzeitig zunehmender Fibrose [Dewald et al., 2003], wobei sich die globale linksventrikuläre Pumpfunktion erst nach 7 Tagen I/R signifikant verschlechterte. Die IL-1 $\beta$ -Induktion bei EC-SOD-Mäusen zeigte ein mit der TNF- $\alpha$ -Induktion vergleichbares Bild und lässt hier ebenfalls keine weiteren Aussagen zu.

Eine myokardiale Ischämie bei Hunden führte zur Freisetzung von TNF- $\alpha$  aus Mastzellen, welches dann IL-6 in infiltrierenden mononukleären Zellen und Kardiomyozyten induzierte [Frangogiannis et al., 1998 b, 2002 c; Gwechenberger et al., 1999; Youker et al., 1992]. IL-6 ist ein reperfusionsabhängig induziertes, proinflammatorisches Zytokin, das Neutrophilenadhäsion am Endothel und an Kardiomyozyten über ICAM-1 vermittelt und zum "oxidative burst" führt, der Myozytenschädigung zur Folge hat [Entman et al., 1992; Finkel et al., 1992, 1993; Frangogiannis et al., 1998 b, 2002 c; Kukielka et al., 1995 a; Youker et al., 1992]. IL-6 ist im Entzündungsgeschehen ein sehr frühzeitig induziertes proinflammatorisches Zytokin, weshalb es in der modernen Medizin oft als vorzeitiger Entzündungsmarker verwendet und damit zum Teil der Aussagekraft von z.B. CRP (C-reaktives Protein) vorgezogen wird [Oberholzer et al., 2005]. In unserem Mausmodell der repetitiven kurzen I/R war IL-6 bereits nach 3 Tagen I/R signifikant induziert (Abb. 28). Zum selben Zeitpunkt kam es zur signifikanten Verschlechterung der regionalen linksventrikulären Pumpfunktion, der dann nach 7 Tagen I/R auch eine signifikante Beeinträchtigung der globalen linksventrikulären Pumpfunktion folgte. Diese Befunde unterstützen die Hypothese, dass IL-6 in der frühen Entstehungsphase der Inflammation und myokardialen

Dysfunktion eine Rolle spielt, zumal die Induktion des Zytokins auf diesen frühen Zeitpunkt limitiert ist. Nach 5 Tagen I/R liegt die IL-6-mRNA-Expression auf dem Niveau der Kontrollgruppe.

IL-10 ist ein antiinflammatorisches Zytokin, das von infiltrierenden Lymphozyten und Makrophagen in reperfundiertem Myokard produziert wird und die Induktion von proinflammatorischen Zytokinen (IL-1 $\alpha$ , IL- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8) gegenreguliert. Dadurch wird die inflammatorische Antwort abgeschwächt [Frangogiannis et al., 1998 a, 2000 a, 2002 c; Yang et al., 2000]. Außerdem hat IL-10 eine wichtige Funktion im extrazellulären Matrixremodeling durch die Modulierung von MMPs und TIMPs [Lacratz et al., 1995]. In dem vorliegenden Mausmodell könnte also die signifikante Induktion der IL-10-mRNA lediglich nach 3 Tagen I/R mit einer inflammatorischen Gegenregulation sowie dem beginnenden Kollagenaufbau erklärt werden (Abb. 29). Dies könnte auch eine weitere mögliche Erklärung dafür sein, dass TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  erst nach 5 Tagen I/R ein Maximum ihrer mRNA-Expression erreichen. Eine Abhängigkeit der Expression der proinflammatorischen Zytokine TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  von IL-10 müsste erst noch unter Verwendung von transgenen Tieren geprüft werden. IL-10 könnte schon zu einem frühen Zeitpunkt regulativ in die Inflammation eingreifen und eine Suppression der Gewebsschädigung und die Regulation des Remodeling vermitteln [Frangogiannis et al., 2000 a].

M-CSF ist ein Wachstumsfaktor, der während der Reperfusion induziert wird und die Monozytenmaturation und deren Differenzierung zu Makrophagen vermittelt. Frangogiannis et al. haben in einem Hundemodell mit hydraulischer Okklusion (1 Stunde) des Ramus circumflexus demonstriert, dass M-CSF sehr früh während der Reperfusion (24 Stunden) nach Myokardinfarkt induziert war [Frangogiannis et al., 1998 a]. Zwar sind die Expressionswerte der M-CSF-mRNA in dem vorliegenden Mausmodell der repetitiven I/R vergleichsweise hoch ausgeprägt, aber es ist keine Induktion durch I/R gegenüber den Kontrollgruppen und den Nativtieren in dem untersuchten Zeitraum (3 bis 28 Tage) zu erkennen (Abb. 30). Dieser Wachstumsfaktor ist im Mäusemyokard konstitutiv exprimiert und scheint im Modell der repetitiven kurzen I/R nicht maßgeblich an der Makrophagenmaturation durch I/R-Stress beteiligt zu sein. Für die Rekrutierung und Maturation neuer Makrophagen könnten aber andere Faktoren zuständig sein, z.B. OPN (s.u.).

OPN ist ein extrazelluläres Matrixprotein, das von mehreren Zelltypen einschließlich

Kardiomyozyten, Endothelzellen, Fibroblasten und Makrophagen exprimiert wird [Giachelli et al., 1995, 1998]. OPN spielt eine wichtige Rolle beim Matrixremodeling nach Myokardinfarkt durch Induktion der Kollagensynthese und Kollagenakkumulation sowie durch Interaktion mit Fibronectin [Trueblood et al., 2001]. Außerdem ist OPN ein Marker der Makrophagenmaturation [Frangogiannis et al., 1998 a]. Seine genaue Rolle in der Makrophagenfunktion ist unbekannt, aber neuerliche Studien haben nahegelegt, dass Infiltration und Funktion von Makrophagen durch OPN-Antikörper verändert werden können [Giachelli et al., 1998]. Wir konnten in unserem Modell der repetitiven I/R eine starke, signifikante Induktion der OPN-mRNA nach 3 Tagen I/R um das fast Zehnfache des Kontrollgruppen-Wertes nachweisen (Abb. 31). Dies könnte auf eine intensive Infiltration reifender mononukleärer Zellen und gereifter Makrophagen in das ischämisch-reperfundierte Myokard zurückzuführen sein und mit einer starken Kollagensynthese und -akkumulation im Extrazellulärraum einhergehen. Sowohl starke Makrophageninfiltration nach 5 Tagen I/R als auch signifikante interstitielle Kollagenzunahme im I/R-Areal nach 7 Tagen I/R wurden im vorliegenden Mausmodell histologisch bzw. immunhistochemisch beschrieben [Dewald et al., 2003]. Die Folge war die bereits oben beschriebene Entstehung der ventrikulären Dysfunktion. EC-SOD-überexprimierende Mäuse zeigten ebenfalls eine signifikante I/R-abhängige Induktion der OPN-mRNA nach 3 Tagen (Abb. 37). Der Unterschied der OPN-Expression zwischen der 3-Tage-I/R- und der 3-Tage-Kontrollgruppe bei den EC-SOD-Mäusen war viel geringer als der entsprechende Unterschied bei den WT-Mäusen. Außerdem trat bei den EC-SOD-Mäusen in diesem Zusammenhang signifikant weniger Fibrose auf [Dewald et al., 2003]. Dies lässt die Überlegung zu, dass Sauerstoffradikale auch einen Einfluss auf die OPN-Expression in ischämisch-reperfundiertem Myokard haben.

TGF- $\beta$ 1 ist ein Zytokin mit pleiotropen Eigenschaften. Es sorgt in infarziertem Myokard nach C5a-Aktivierung für eine frühe Leukozyten- und Monozytenrekrutierung [Birdsall et al., 1997; Frangogiannis et al., 2002 a, b, c]. TGF- $\beta$ 1 reguliert Fibroblastenwachstum und deren Differenzierung zu Myofibroblasten, moduliert extrazellulären Matrixmetabolismus (stimuliert MMPs und TIMPs) und somit Fibroseentstehung [Desmouliere et al., 1993; O'Kane und Ferguson, 1997; Sappino et al., 1990 a, b; Thompson et al., 1988]. TGF- $\beta$ 1 ist einer der potentesten und weitest verbreiteten profibrotischen Mediatoren im Körper [Wells, 2000]. Bei fibrotischen Erkrankungen verschiedener Organe zeigen Regionen mit vermehrter Matrix eine erhöhte Expression von TGF- $\beta$ , vor allem aber der Isoform TGF- $\beta$ 1 [Branton und Kopp, 1999; Roulot et al., 1999]. Die signifikante Induktion der mRNA von TGF- $\beta$ 1 nach 3 Tagen repetitiver I/R in dem vorliegenden Mausmodell (Abb. 32) fand zusammen mit dem beginnenden

Remodeling [Dewald et al., 2003] sowie der beginnenden linksventrikulären Dysfunktion statt und könnte damit erklärt werden. Die immunhistochemische Untersuchung des Mäusemyokards nach repetitiver I/R zeigte zeitgleich mit der TGF- $\beta$ 1-Induktion ein vermehrtes Auftreten von Makrophagen und Myofibroblasten im I/R-Areal, begleitet von zunehmender Kollagenablagerung und Entwicklung der Fibrose im ischämischen Bereich. Die EC-SOD-Mäuse zeigten eine signifikante, aber weniger ausgeprägte Induktion von TGF- $\beta$ 1 (Abb. 38). Dies korreliert gut mit der geringeren Fibrose und abwesenden ventrikulären Dysfunktion in EC-SOD-Mäusen. TGF- $\beta$ 1 scheint auch in diesem Mausodell der potenteste profibrotische Wachstumsfaktor zu sein.

Der biologische Effekt der verschiedenen TGF- $\beta$ -Isoformen wird durch deren Verhältnis untereinander bestimmt [Deten et al., 2001; Massague, 1990; Wells, 2000]. TGF- $\beta$ 2 kommt in vielen embryonalen Geweben vor [Deten et al., 2001; Jakowlew et al., 1994], ist wie TGF- $\beta$ 1 auch ein potenter Faktor der Fibroseentstehung und damit wichtig für Remodeling. Wir zeigten, dass 3-tägige repetitive I/R zu einer eher tendenziellen Induktion der TGF- $\beta$ 2-mRNA führte (Abb. 33). Der insgesamt geringere Anstieg der mRNA-Expression nach 3 und 5 Tagen könnte ein auswertungsbedingtes Artefakt sein, aber auch die geringere Potenz von TGF- $\beta$ 2 im Vergleich zu TGF- $\beta$ 1 widerspiegeln. Die mit der Induktion von TGF- $\beta$ 1 zeitgleich stattfindende tendenzielle Expression von TGF- $\beta$ 2 lässt ähnliche Effekte bezüglich der Fibroseinduktion und des Remodelings durch Aktivierung von MMPs und TIMPs vermuten. TGF- $\beta$ 2 wurde bei EC-SOD-Mäusen nach repetitiver I/R nicht induziert und scheint daher im weitesten Sinne durch die Sauerstoffradikale mitreguliert zu sein.

TGF- $\beta$ 3 ist in die embryonale Herzentwicklung involviert [Potts et al., 1991]. Deten et al. wiesen eine starke Korrelation zwischen TGF- $\beta$ 3- und Kollagenexpression und zwischen TGF- $\beta$ 3- und MMP-2- und TIMP-2-Expression in einem Myokardinfarktmodell an Ratten nach [Deten et al., 2001]. In dem vorliegend beschriebenen Mausmodell war die TGF- $\beta$ 3-mRNA nach I/R zu keinem Zeitpunkt signifikant höher exprimiert als in den Kontrollgruppen (Abb. 34). Dies lässt in diesem Modell keine weiteren Schlüsse zu.

## 4.5 Schlussfolgerung

In unserem Mausmodell der repetitiven kurzen I/R kam es nach 3 bis 7 Tagen I/R zu einer transienten Induktion von Chemokinen und nur geringfügigen Induktion von Zytokinen. Die Chemokininduktion wurde begleitet von einer Einwanderung und Aktivierung von Makrophagen, die nach 5 Tagen I/R ein Maximum erreichte [Dewald et al., 2003]. Zeitgleich wurde eine Anhäufung von Myofibroblasten gefunden, die zu einem Remodeling mit Kollagenablagerungen und damit zu interstitieller Fibrose führte. Die Fibrose trat parallel zur Entstehung der ventrikulären Dysfunktion auf und erreichte ein Plateau nach 7 Tagen I/R. Nach 14 Tagen I/R war die Chemokininduktion auf das Niveau der Nativ- und Kontrolltiere zurückgegangen, während Fibrose und ventrikuläre Dysfunktion bis 28 Tage I/R auf ihrem Niveau bestehen blieben. Nach Beendigung des I/R-Protokolls kam es zur Regression der Fibrose und Normalisierung der linksventrikulären Pumpfunktion ohne Beteiligung von inflammatorischen Mediatoren. Da das menschliche hibernierende Myokard ähnliche Merkmale aufweist, kann man das vorliegende Modell als ein Kleintiermodell der myokardialen Hibernation ansehen.

Die Untersuchung der Chemokininduktion an EC-SOD-Mäusen wies auf eine Abhängigkeit der Chemokinregulation von Sauerstoffradikalen hin. Die EC-SOD-Mäuse hatten zusätzlich signifikant weniger Kollagenablagerung in Abwesenheit der oben beschriebenen ventrikulären Dysfunktion [Dewald et al., 2003]. Daraus lässt sich schliessen, dass Sauerstoffradikale an der Chemokininduktion und der Entstehung von ventrikulärer Dysfunktion beteiligt sind.

Es kann daher angenommen werden, dass die Sauerstoffradikal-vermittelte Chemokininduktion und die darauf folgende inflammatorische Antwort in der Pathogenese des hibernierenden Myokards und der ischämischen Kardiomyopathie bei Menschen eine wesentliche Rolle spielen. Therapeutische Maßnahmen, die auf die Neutralisierung dieses Sauerstoffradikal-vermittelten Prozesses hinzielen, könnten einen Einfluss auf die Entstehung der myokardialen Fibrose und der ventrikulären Dysfunktion haben.

## 4.6 Ausblick

Den verschiedenen Großtiermodellen der I/R und damit des hibernierenden Myokards steht seit dieser Arbeit auch ein Kleintiermodell gegenüber. Einen entscheidenden Vorteil der Kleintiermodelle brachte die Entschlüsselung des Mausgenoms, wodurch die Möglichkeiten geschaffen wurden, die vielfältigen und sehr komplexen Mechanismen in der Pathogenese des hibernierenden Myokards auf molekularer Ebene zu untersuchen.

Die vorliegenden Ergebnisse an EC-SOD-überexprimierenden Mäusen wurden für eine neue Fragestellung verwendet. Die vor kurzem veröffentlichte Arbeit von Dewald et al. beschäftigte sich mit der Expression des Peroxisom Proliferator-aktivierten Rezeptor- $\alpha$  (PPAR- $\alpha$ ), einem Transkriptionsfaktor mit Schlüsselrolle im Fettsäuremetabolismus, im Modell der repetitiven I/R [Dewald et al., 2005]. Die Myokardischämie bei Ratten führte zur Herabregulation von PPAR- $\alpha$  und damit zu einem Umschalten der Substratpräferenz von Fettsäuren auf Glucose in Kardiomyozyten [Razeghi et al., 2001; Young et al., 2001]. Dewald et al. fanden heraus, dass die PPAR- $\alpha$ -Expression nach 7 Tagen I/R Sauerstoffradikal-abhängig supprimiert wird und dadurch auch der Fettsäuremetabolismus mit erhöhter Produktion der Sauerstoffradikale reduziert wird. Sie postulieren, dass diese Sauerstoffradikal-vermittelte Herabregulation von PPAR- $\alpha$  ein adaptiver Mechanismus ist, der Triglyceridablagerung und damit Lipotoxizität im ischämischen Myokard mit der Folge einer irreversiblen Myokardschädigung mit Pumpfunktionsverlust verhindern kann. Diese Ergebnisse passen in das bestehende Konzept der myokardialen Hibernation, wo es nach repetitiver, kurzer I/R zu reversibler kontraktile Dysfunktion kommt, die mit erhöhter Glukoseverwertung und vermindertem Fettsäuremetabolismus einhergeht [Kim et al., 2003; Schulz und Heusch, 2000].

Ein Vergleich zum menschlichen Herzen ist aus heutiger Sicht immer noch schwierig und erfordert weitere Studien an Mäusen und Menschen um die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf die Patienten zu verbessern.

## 5 Zusammenfassung

Die koronare Herzerkrankung manifestiert sich durch Episoden der Ischämie und Reperfusion, z.B. stille Ischämie, Angina pectoris, Rhythmusstörungen bis zu schweren Formen wie Myokardinfarkt oder plötzlichem Herztod und führt zu einer anhaltenden ventrikulären Dysfunktion. Der Funktionsverlust wurde primär als irreversibel bezeichnet. Daher war die Demonstration, dass wegen stenotischer Koronararterien chronisch asynergisches Myokard seine Funktion nach Revaskularisation wiedererlangen kann, von sehr großem klinischem Interesse. Klinische und tierexperimentelle Studien haben einen Zusammenhang zwischen zunehmender Fibrose und Entstehung der ventrikulären Dysfunktion beschrieben und dabei eine Beteiligung der Inflammation vorgeschlagen.

Die vorliegende Arbeit beschreibt ein Mausmodell der repetitiven kurzen I/R mit Charakteristiken des hibernierenden Myokards und der ischämischen Kardiomyopathie. Es wurde die Beteiligung der Inflammation an der Pathogenese von ventrikulärer Dysfunktion und die Rolle der Sauerstoffradikale in diesem Prozess untersucht. Zu diesem Zweck wurde die Expression der Chemokine und Zytokine an WT-Mäusen und EC-SOD-überexprimierenden Mäusen gemessen.

Die Ergebnisse zeigten eine transiente Induktion der vornehmlich die Monozyten- und Makrophagenfunktion regulierenden Chemokine MCP-1, MIP-1 $\alpha$  und MIP-1 $\beta$  in den ersten Tagen des I/R-Protokolls. Die Zytokine TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, OPN und TGF- $\beta$ 1 waren dabei nur zum Teil induziert. Dies führte zur Einwanderung von Makrophagen und Differenzierung von Myofibroblasten und damit zum interstitiellen Remodeling mit Fibrose des ischämischen Myokards. Die Folge war eine signifikante ventrikuläre Dysfunktion, die ebenso wie die Fibrose im Verlauf des I/R-Protokolls persistierte. Trotz der täglichen I/R-Episoden wurde nach 14 Tagen keine inflammatorische Reaktion mehr beobachtet. Erstmalig konnte so in einem Tiermodell die Beteiligung der Inflammation an der Pathogenese der ventrikulären Dysfunktion im Rahmen einer ischämischen Kardiomyopathie ohne Myokardinfarkt gezeigt werden. Die Persistenz der Fibrose und der ventrikulären Dysfunktion ohne inflammatorische Aktivität lässt die Beteiligung von anderen Mechanismen vermuten, z.B. von MMPs, Stickstoffmonoxid, u.s.w.

Ein weiterer wesentlicher Befund der vorliegenden Arbeit ist die Reversibilität der ischämischen Kardiomyopathie nach Beendigung der täglichen I/R-Episoden. Unabhängig von der Dauer des I/R-Protokolls kam es nach Beendigung des Protokolls und einer 60-tägigen

Erholung zur Regression der interstitieller Fibrose und der ventrikulären Dysfunktion. Diese Befunde lassen sich mit der klinischen Situation vergleichen, in der ein chronisch ischämisches, hibernierendes Myokard revaskularisiert wird und nach 6 Monaten eine Verbesserung der Pumpfunktion auftritt.

Die tägliche I/R an EC-SOD-Mäusen führte zu einer abgeschwächten Induktion von Chemokinen und weniger Fibrose in Abwesenheit von ventrikulärer Dysfunktion. Damit konnte in dieser Arbeit ein wesentlicher Einfluss der Sauerstoffradikal-vermittelten Inflammation auf die Pathogenese der ventrikulären Dysfunktion im Rahmen einer ischämischen Kardiomyopathie nachgewiesen werden.

Das Mäusemodell der kurzzeitigen, repetitiven I/R könnte damit als ein wichtiges Instrument zur weiteren Erforschung von Pathomechanismen der ventrikulären Dysfunktion im Rahmen der ischämischen Kardiomyopathie dienen. Die neu gewonnenen Kenntnisse könnten eine Grundlage für die Entwicklung neuer Therapieansätze bilden.

## 6 Tabellenanhang

An dieser Stelle werden exemplarisch für die Abbildungen des Ergebnisteils die Wertetabellen zu den Histogrammen der Abbildungen 11, 12 und 24 dargestellt.

Die Tabellen eins bis drei zeigen den Einfluss der repetitiven, kurzen I/R auf die globale Ventrikelfunktion (Tab. 1, vgl. Abb. 11), auf die regionale linksventrikuläre Pumpfunktion (Tab. 2, vgl. Abb. 12) sowie auf die Induktion der Chemokin-mRNA-Expression am Beispiel von MCP-1 (Tab. 3, vgl. Abb. 24) bei EC-SOD- und WT-Mäusen. Durch den methodenbedingten direkten Vergleich der jeweiligen Daten der EC-SOD- und WT-Tiere kann hier der unmittelbare Einfluss von Sauerstoffradikalen auf die globale ventrikuläre und regionale linksventrikuläre Pumpfunktion sowie auf die Induktion von MCP-1 verdeutlicht werden.

Ein signifikanter Unterschied zwischen den jeweiligen Gruppen ist kursiv hervorgehoben.

<b>FS</b>	<b>EC-SOD</b>		<b>WT</b>	
<b>Gruppe</b>	MW	SEM	MW	SEM
<b>nativ</b>	43,9%	1,0%	46,8%	2,7%
<b>0 d</b>	44,2%	1,9%	45,4%	1,1%
<b>3 d</b>	40,9%	1,4%	40,5%	1,0%
<b>5 d</b>	40,1%	0,6%	40,4%	1,0%
<b>7 d</b>	<i>41,1%</i>	<i>1,5%</i>	<i>35,1%</i>	<i>1,2%</i>

**Tabelle 1.** Die Fraktionsverkürzung (FS) als Parameter der globalen ventrikulären Pumpfunktion war nach 7 Tagen repetitiver, kurzer I/R bei den EC-SOD-Mäusen signifikant ( $p < 0,05$ ) besser als bei den 7-Tage-WT-Tieren. MW, Mittelwert; SEM, Standardfehler des Mittelwerts; d, Tage.

<b>AWT</b>	<b>EC-SOD</b>		<b>WT</b>	
<b>Gruppe</b>	MW	SEM	MW	SEM
<b>nativ</b>	54,6%	4,1%	63,1%	5,9%
<b>0 d</b>	49,8%	5,2%	70,2%	4,4%
<b>3 d</b>	49,9%	5,1%	48,3%	4,7%
<b>5 d</b>	50,6%	3,5%	45,4%	4,1%
<b>7 d</b>	44,5%	4,0%	35,7%	2,4%

**Tabelle 2.** Auch die Vorderwandverdickung (AWT), welche die regionale Pumpfunktion der linksventrikulären Vorderwand darstellt, zeigte nach 7 Tagen repetitiver, kurzer I/R bei den EC-SOD-Mäusen bessere Werte als bei den WT-Tieren (nicht signifikant). MW, Mittelwert; SEM, Standardfehler des Mittelwerts; d, Tage.

<b>MCP-1</b>	<b>EC-SOD</b>		<b>WT</b>	
<b>Gruppe</b>	MW	SEM	MW	SEM
<b>nativ</b>	0,22%	0,03%	0,15%	0,02%
<b>0d KG</b>	2,26%	0,37%	1,25%	0,15%
<b>3d KG</b>	1,92%	0,23%	1,38%	0,20%
<b>3d I/R</b>	8,52%	1,36%	11,51%	0,66%
<b>5d KG</b>	1,37%	0,09%	1,62%	0,34%
<b>5d I/R</b>	5,50%	0,69%	5,81%	0,51%
<b>7d KG</b>	1,10%	0,17%	1,19%	0,24%
<b>7d I/R</b>	2,20%	0,29%	4,16%	0,73%

**Tabelle 3.** MCP-1-mRNA-Expression nach I/R. Bei den EC-SOD-Mäusen war die MCP-1-mRNA-Expression nach 3 und 7 Tagen I/R signifikant niedriger als bei den entsprechenden WT-Mäusen ( $p < 0,05$ ) und erreichte nach 7 Tagen I/R das Niveau der EC-SOD-7-Tage-Kontrolltiere. Bei den WT-Tieren führte 7-tägige I/R noch zu einer signifikanten Induktion von MCP-1. MW, Mittelwert; SEM, Standardfehler des Mittelwerts; I/R, Ischämie/Reperfusion; KG, Kontrollgruppe; d, Tage.

## 7 Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

Abb. 1.	Paradigmatisches Ventrikulogramm eines Patienten mit Okklusion des Ramus interventricularis anterior (RIVA) und hibernierendem Myokard.	14
Abb. 2.	Verlauf des Initialeingriffs.	25
Abb. 3.	Skizze des Versuchsaufbaus der täglichen I/R.	27
Abb. 4.	EKG-Aufzeichnung (Ableitung II) der täglichen Ischämie und Reperfusion.	27
Abb. 5.	Repräsentative Autoradiographie eines RPA-Gels.	38
Abb. 6.	Fraktionsverkürzung (FS) während des I/R-Protokolls bei WT-Mäusen.	41
Abb. 7.	Ventrikuläre Pumpfunktion während des I/R-Protokolls: M-Mode-Echokardiographie.	41
Abb. 8.	Vorderwandverdickung (AWT) während des I/R-Protokolls bei WT-Mäusen.	42
Abb. 9.	Regression der Fraktionsverkürzung (FS) nach Diskontinuierung des I/R-Protokolls bei WT-Mäusen.	43
Abb. 10.	Regression der Vorderwandverdickung (AWT) nach Diskontinuierung des I/R-Protokolls bei WT-Mäusen.	43
Abb. 11.	Fraktionsverkürzung (FS) während des I/R-Protokolls im Vergleich zwischen WT- und EC-SOD-Mäusen.	44
Abb. 12.	Vorderwandverdickung (AWT) während des I/R-Protokolls im Vergleich zwischen WT- und EC-SOD-Mäusen.	45
Abb. 13.	MIP-1 $\beta$ bei WT-Mäusen. Quantitative Daten und Autoradiographie.	47
Abb. 14.	MIP-1 $\alpha$ bei WT-Mäusen. Quantitative Daten und Autoradiographie.	48
Abb. 15.	MIP-2 bei WT-Mäusen. Quantitative Daten und Autoradiographie.	49
Abb. 16.	IP-10 bei WT-Mäusen. Quantitative Daten und Autoradiographie.	50
Abb. 17.	MCP-1 bei WT-Mäusen. Quantitative Daten und Autoradiographie.	51

Abb. 18.	CXCR3 bei WT-Mäusen. Quantitative Daten und Autoradiographie.	52
Abb. 19.	Regression von MCP-1 bei WT-Mäusen nach Diskontinuierung des I/R-Protokolls. Quantitative Daten und Autoradiographie.	53
Abb. 20.	MIP-1 $\beta$ vergleichend bei WT- und EC-SOD-Mäusen. Quantitative Daten und Autoradiographie.	55
Abb. 21.	MIP-1 $\alpha$ vergleichend bei WT- und EC-SOD-Mäusen. Quantitative Daten und Autoradiographie.	56
Abb. 22.	MIP-2 vergleichend bei WT- und EC-SOD-Mäusen. Quantitative Daten und Autoradiographie.	57
Abb. 23.	IP-10 vergleichend bei WT- und EC-SOD-Mäusen. Quantitative Daten und Autoradiographie.	58
Abb. 24.	MCP-1 vergleichend bei WT- und EC-SOD-Mäusen. Quantitative Daten und Autoradiographie.	59
Abb. 25.	CXCR3 vergleichend bei WT- und EC-SOD-Mäusen. Quantitative Daten und Autoradiographie.	60
Abb. 26.	TNF- $\alpha$ bei WT-Mäusen. Quantitative Daten und Autoradiographie.	61
Abb. 27.	IL-1 $\beta$ bei WT-Mäusen. Quantitative Daten und Autoradiographie.	62
Abb. 28.	IL-6 bei WT-Mäusen. Quantitative Daten und Autoradiographie.	63
Abb. 29.	IL-10 bei WT-Mäusen. Quantitative Daten und Autoradiographie.	64
Abb. 30.	M-CSF bei WT-Mäusen. Quantitative Daten und Autoradiographie.	65
Abb. 31.	OPN bei WT-Mäusen. Quantitative Daten und Autoradiographie.	66
Abb. 32.	TGF- $\beta$ 1 bei WT-Mäusen. Quantitative Daten und Autoradiographie.	67
Abb. 33.	TGF- $\beta$ 2 bei WT-Mäusen. Quantitative Daten und Autoradiographie.	68
Abb. 34.	TGF- $\beta$ 3 bei WT-Mäusen. Quantitative Daten und Autoradiographie.	69
Abb. 35.	TNF- $\alpha$ bei EC-SOD-Mäusen. Quantitative Daten und Autoradiographie.	70

Abb. 36.	IL-1 $\beta$ bei EC-SOD-Mäusen. Quantitative Daten und Autoradiographie.	71
Abb. 37.	OPN bei EC-SOD-Mäusen. Quantitative Daten und Autoradiographie.	72
Abb. 38.	TGF- $\beta$ 1 bei EC-SOD-Mäusen. Quantitative Daten und Autoradiographie.	73
Tab. 1.	Fraktionsverkürzung (FS) während des I/R-Protokolls im Vergleich zwischen EC-SOD- und WT-Mäusen.	91
Tab. 2.	Vorderwandverdickung (AWT) während des I/R-Protokolls im Vergleich zwischen EC-SOD- und WT-Mäusen.	92
Tab. 3.	MCP-1 vergleichend bei EC-SOD- und WT-Mäusen.	92

## 8 Literaturverzeichnis

1. Allen JW, Cox TA, Kloner RA. Myocardial stunning: a post-ischemic syndrome with delayed recovery. *Exs* 1996;76:443-452.
2. Anaya-Prado R, Toledo-Pereyra LH, Lentsch AB, Ward PA. Ischemia/reperfusion injury. *J Surg Res* 2002;105(2):248-258.
3. Angiolillo AL, Sgadari C, Taub DD, Liao F, Farber JM, Maheshwari S, et al. Human interferon-inducible protein 10 is a potent inhibitor of angiogenesis in vivo. *J Exp Med* 1995;182(1):155-162.
4. Ausma J, Cleutjens J, Thone F, Flameng W, Ramaekers F, Borgers M. Chronic hibernating myocardium: interstitial changes. *Mol Cell Biochem* 1995a;147(1-2):35-42.
5. Ausma J, Furst D, Thone F, Shivalkar B, Flameng W, Weber K, et al. Molecular changes of titin in left ventricular dysfunction as a result of chronic hibernation. *J Mol Cell Cardiol* 1995b;27(5):1203-1212.
6. Baggiolini M, Dewald B, Moser B. Interleukin-8 and related chemotactic cytokines--CXC and CC chemokines. *Adv Immunol* 1994;55:97-179.
7. Baggiolini M. Chemokines and leukocyte traffic. *Nature* 1998;392(6676):565-568.
8. Balashov KE, Rottman JB, Weiner HL, Hancock WW. CCR5(+) and CXCR3(+) T cells are increased in multiple sclerosis and their ligands MIP-1alpha and IP-10 are expressed in demyelinating brain lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96(12):6873-6878.
9. Belin D. The RNase protection assay. *Methods Mol Biol* 1996;58:131-136.
10. Birdsall HH, Green DM, Trial J, Youker KA, Burns AR, MacKay CR, et al. Complement C5a, TGF-beta 1, and MCP-1, in sequence, induce migration of monocytes into ischemic canine myocardium within the first one to five hours after reperfusion. *Circulation* 1997;95(3):684-692.
11. Birnbaum Y, Leor J, Kloner RA. Pathobiology and Clinical Impact of Reperfusion Injury. *J Thromb Thrombolysis* 1995;2(3):177-186.

12. Booth V, Keizer DW, Kamphuis MB, Clark-Lewis I, Sykes BD. The CXCR3 binding chemokine IP-10/CXCL10: structure and receptor interactions. *Biochemistry* 2002;41(33):10418-10425.
13. Borgers M, De Nollin S, Thone F, Wouters L, Van Vaeck L, Flameng W. Distribution of calcium in a subset of chronic hibernating myocardium in man. *Histochem J* 1993;25(4):312-318.
14. Borgers M, Ausma J. Structural aspects of the chronic hibernating myocardium in man. *Basic Res Cardiol* 1995;90(1):44-46.
15. Bowler RP, Nicks M, Warnick K, Crapo JD. Role of extracellular superoxide dismutase in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002;282(4):L719-726.
16. Branton MH, Kopp JB. TGF-beta and fibrosis. *Microbes Infect* 1999;1(15):1349-1365.
17. Camici PG, Wijns W, Borgers M, De Silva R, Ferrari R, Knuuti J, et al. Pathophysiological mechanisms of chronic reversible left ventricular dysfunction due to coronary artery disease (hibernating myocardium). *Circulation* 1997;96(9):3205-3214.
18. Camici PG, Rimoldi O. Myocardial hibernation vs repetitive stunning in patients. *Cardiol Rev* 1999;7(1):39-43.
19. Canty JM, Jr., Fallavollita JA. Chronic hibernation and chronic stunning: a continuum. *J Nucl Cardiol* 2000;7(5):509-527.
20. Chandrasekar B, Smith JB, Freeman GL. Ischemia-reperfusion of rat myocardium activates nuclear factor-KappaB and induces neutrophil infiltration via lipopolysaccharide-induced CXC chemokine. *Circulation* 2001;103(18):2296-2302.
21. Chatterjee K, Swan HJ, Parmley WW, Sustaita H, Marcus H, Matloff J. Depression of left ventricular function due to acute myocardial ischemia and its reversal after aortocoronary saphenous-vein bypass. *N Engl J Med* 1972;286(21):1117-1122.
22. Chosay JG, Essani NA, Dunn CJ, Jaeschke H. Neutrophil margination and extravasation in sinusoids and venules of liver during endotoxin-induced injury. *Am J Physiol* 1997;272(5 Pt 1):G1195-1200.

23. Covell JW. Factors influencing diastolic function. Possible role of the extracellular matrix. *Circulation* 1990;81(2 Suppl):III155-58.
24. Depre C, Vanoverschelde JL, Melin JA, Borgers M, Bol A, Ausma J, et al. Structural and metabolic correlates of the reversibility of chronic left ventricular ischemic dysfunction in humans. *Am J Physiol* 1995;268(3 Pt 2):H1265-1275.
25. Depre C, Vanoverschelde JL, Gerber B, Borgers M, Melin JA, Dion R. Correlation of functional recovery with myocardial blood flow, glucose uptake, and morphologic features in patients with chronic left ventricular ischemic dysfunction undergoing coronary artery bypass grafting. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1997;113(2):371-378.
26. Desmouliere 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(1):103-111.
27. Deten A, Holzl A, Leicht M, Barth W, Zimmer HG. Changes in extracellular matrix and in transforming growth factor beta isoforms after coronary artery ligation in rats. *J Mol Cell Cardiol* 2001;33(6):1191-1207.
28. Dewald O, Frangogiannis NG, Zoerlein M, Duerr GD, Klemm C, Knuefermann P, et al. Development of murine ischemic cardiomyopathy is associated with a transient inflammatory reaction and depends on reactive oxygen species. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100(5):2700-2705.
29. Dewald O, Sharma S, Adroque J, Salazar R, Duerr GD, Crapo JD, et al. Downregulation of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-(alpha) Gene Expression in a Mouse Model of Ischemic Cardiomyopathy Is Dependent on Reactive Oxygen Species and Prevents Lipotoxicity. *Circulation* 2005 Jul 19;112(3):407-415.
30. Dhalla NS, Temsah RM, Netticadan T. Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. *J Hypertens* 2000a;18(6):655-673.
31. Dhalla NS, Elmoselhi AB, Hata T, Makino N. Status of myocardial antioxidants in ischemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 2000b;47(3):446-456.
32. Diamond GA, Forrester JS, deLuz PL, Wyatt HL, Swan HJ. Post-extrasystolic potentiation of ischemic myocardium by atrial stimulation. *Am Heart J* 1978;95(2):204-209.

33. Dispersyn GD, Ausma J, Thone F, Flameng W, Vanoverschelde JL, Allessie MA, et al. Cardiomyocyte remodelling during myocardial hibernation and atrial fibrillation: prelude to apoptosis. *Cardiovasc Res* 1999;43(4):947-957.
34. Doering CW, Jalil JE, Janicki JS, Pick R, Aghili S, Abrahams C, et al. Collagen network remodelling and diastolic stiffness of the rat left ventricle with pressure overload hypertrophy. *Cardiovasc Res* 1988;22(10):686-695.
35. Elsasser A, Schaper J. Hibernating myocardium: adaptation or degeneration? *Basic Res Cardiol* 1995;90(1):47-48.
36. Elsasser A, Schlepper M, Klovekorn WP, Cai WJ, Zimmermann R, Muller KD, et al. Hibernating myocardium: an incomplete adaptation to ischemia. *Circulation* 1997;96(9):2920-2931.
37. Elsasser A, Schlepper M, Zimmermann R, Muller KD, Strasser R, Klovekorn WP, et al. The extracellular matrix in hibernating myocardium--a significant factor causing structural defects and cardiac dysfunction. *Mol Cell Biochem* 1998;186(1-2):147-158.
38. Entman ML, Youker K, Shoji T, Kukielka G, Shappell SB, Taylor AA, et al. Neutrophil induced oxidative injury of cardiac myocytes. A compartmented system requiring CD11b/CD18-ICAM-1 adherence. *J Clin Invest* 1992;90(4):1335-1345.
39. Entman ML, Youker KA, Frangogiannis N, Lakshminarayanan V, Nossuli T, Evans A, et al. Is inflammation good for the ischemic heart--perspectives beyond the ordinary. *Z Kardiol* 2000;89 Suppl 9:IX/82-87.
40. Fallavollita JA, Lim H, Canty JM, Jr. Myocyte apoptosis and reduced SR gene expression precede the transition from chronically stunned to hibernating myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 2001;33(11):1937-1944.
41. Finkel MS, Oddis CV, Jacob TD, Watkins SC, Hattler BG, Simmons RL. Negative inotropic effects of cytokines on the heart mediated by nitric oxide. *Science* 1992;257(5068):387-389.
42. Finkel MS, Hoffman RA, Shen L, Oddis CV, Simmons RL, Hattler BG. Interleukin-6 (IL-6) as a mediator of stunned myocardium. *Am J Cardiol* 1993;71(13):1231-1232.

43. Flameng W, Suy R, Schwarz F, Borgers M, Piessens J, Thone F, et al. Ultrastructural correlates of left ventricular contraction abnormalities in patients with chronic ischemic heart disease: determinants of reversible segmental asynergy postrevascularization surgery. *Am Heart J* 1981;102(5):846-857.
44. Folkman J. Angiogenesis: initiation and control. *Ann N Y Acad Sci* 1982;401:212-227.
45. Forster R, Emrich T, Kremmer E, Lipp M. Expression of the G-protein--coupled receptor BLR1 defines mature, recirculating B cells and a subset of T-helper memory cells. *Blood* 1994;84(3):830-840.
46. Frangogiannis NG, Youker KA, Entman ML. The role of the neutrophil in myocardial ischemia and reperfusion. *Exs* 1996;76:263-284.
47. Frangogiannis NG, Youker KA, Rossen RD, Gwechenberger M, Lindsey MH, Mendoza LH, et al. Cytokines and the microcirculation in ischemia and reperfusion. *J Mol Cell Cardiol* 1998a;30(12):2567-2576.
48. Frangogiannis NG, Lindsey ML, Michael LH, Youker KA, Bressler RB, Mendoza LH, et al. Resident cardiac mast cells degranulate and release preformed TNF-alpha, initiating the cytokine cascade in experimental canine myocardial ischemia/reperfusion. *Circulation* 1998b;98(7):699-710.
49. Frangogiannis NG, Perrard JL, Mendoza LH, Burns AR, Lindsey ML, Ballantyne CM, et al. Stem cell factor induction is associated with mast cell accumulation after canine myocardial ischemia and reperfusion. *Circulation* 1998c;98(7):687-698.
50. Frangogiannis NG, Mendoza LH, Lindsey ML, Ballantyne CM, Michael LH, Smith CW, et al. IL-10 is induced in the reperfused myocardium and may modulate the reaction to injury. *J Immunol* 2000a;165(5):2798-2808.
51. Frangogiannis NG, Mendoza LH, Smith CW, Michael LH, Entman ML. Induction of the synthesis of the C-X-C chemokine interferon-gamma-inducible protein-10 in experimental canine endotoxemia. *Cell Tissue Res* 2000b;302(3):365-376.
52. Frangogiannis NG, Mendoza LH, Lewallen M, Michael LH, Smith CW, Entman ML. Induction and suppression of interferon-inducible protein 10 in reperfused myocardial infarcts may regulate angiogenesis. *Faseb J* 2001;15(8):1428-1430.

53. Frangogiannis NG, Shimoni S, Chang SM, Ren G, Dewald O, Gersch C, et al. Active interstitial remodeling: an important process in the hibernating human myocardium. *J Am Coll Cardiol* 2002a;39(9):1468-1474.
54. Frangogiannis NG, Shimoni S, Chang SM, Ren G, Shan K, Aggeli C, et al. Evidence for an active inflammatory process in the hibernating human myocardium. *Am J Pathol* 2002b;160(4):1425-1433.
55. Frangogiannis NG, Smith CW, Entman ML. The inflammatory response in myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 2002c;53(1):31-47.
56. Gaziano JM. *Global Burden of Cardiovascular Disease*. 6th ed. Philadelphia: Saunders; 2001.
57. Gerber BL, Wijns W, Vanoverschelde JL, Heyndrickx GR, De Bruyne B, Bartunek J, et al. Myocardial perfusion and oxygen consumption in reperfused noninfarcted dysfunctional myocardium after unstable angina: direct evidence for myocardial stunning in humans. *J Am Coll Cardiol* 1999;34(7):1939-1946.
58. Gersch C, Dewald O, Zoerlein M, Michael LH, Entman ML, Frangogiannis NG. Mast cells and macrophages in normal C57/BL/6 mice. *Histochem Cell Biol* 2002;118(1):41-49.
59. Gerszten RE, Garcia-Zepeda EA, Lim YC, Yoshida M, Ding HA, Gimbrone MA, Jr., et al. MCP-1 and IL-8 trigger firm adhesion of monocytes to vascular endothelium under flow conditions. *Nature* 1999;398(6729):718-723.
60. Giachelli CM, Liaw L, Murry CE, Schwartz SM, Almeida M. Osteopontin expression in cardiovascular diseases. *Ann N Y Acad Sci* 1995;760:109-126.
61. Giachelli CM, Lombardi D, Johnson RJ, Murry CE, Almeida M. Evidence for a role of osteopontin in macrophage infiltration in response to pathological stimuli in vivo. *Am J Pathol* 1998;152(2):353-358.
62. Gordon JR, Galli SJ. Mast cells as a source of both preformed and immunologically inducible TNF-alpha/cachectin. *Nature* 1990a;346(6281):274-276.
63. Gordon JR, Burd PR, Galli SJ. Mast cells as a source of multifunctional cytokines. *Immunol Today* 1990b;11(12):458-464.

64. Gwechenberger M, Mendoza LH, Youker KA, Frangogiannis NG, Smith CW, Michael LH, et al. Cardiac myocytes produce interleukin-6 in culture and in viable border zone of reperfused infarctions. *Circulation* 1999;99(4):546-551.
65. Hawkins HK, Entman ML, Zhu JY, Youker KA, Berens K, Dore M, et al. Acute inflammatory reaction after myocardial ischemic injury and reperfusion. Development and use of a neutrophil-specific antibody. *Am J Pathol* 1996;148(6):1957-1969.
66. Heusch G. Hibernating myocardium. *Physiol Rev* 1998;78(4):1055-1085.
67. Horio T, Nishikimi T, Yoshihara F, Nagaya N, Matsuo H, Takishita S, et al. Production and secretion of adrenomedullin in cultured rat cardiac myocytes and nonmyocytes: stimulation by interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha. *Endocrinology* 1998;139(11):4576-4580.
68. Horiuchi K, Tsukamoto T, Saito M, Nakayama M, Fujibayashi Y, Saji H. The development of (99m)Tc-analog of Cu-DTS as an agent for imaging hypoxia. *Nucl Med Biol* 2000;27(4):391-399.
69. Horuk R. Chemokine receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 2001;12(4):313-335.
70. Hwang MW, Matsumori A, Furukawa Y, Ono K, Okada M, Iwasaki A, et al. Neutralization of interleukin-1beta in the acute phase of myocardial infarction promotes the progression of left ventricular remodeling. *J Am Coll Cardiol* 2001;38(5):1546-1553.
71. Jacobs M, Staufenberger S, Gergs U, Meuter K, Brandstatter K, Hafner M, et al. Tumor necrosis factor-alpha at acute myocardial infarction in rats and effects on cardiac fibroblasts. *J Mol Cell Cardiol* 1999;31(11):1949-1959.
72. Jaeschke H, Smith CW. Cell adhesion and migration. III. Leukocyte adhesion and transmigration in the liver vasculature. *Am J Physiol* 1997a;273(6 Pt 1):G1169-1173.
73. Jaeschke H, Smith CW. Mechanisms of neutrophil-induced parenchymal cell injury. *J Leukoc Biol* 1997b;61(6):647-653.
74. Jageneau AH, Schaper WK, Rens W. A simple pneumatic cuff for occlusion of small arteries in dogs, pigs and sheep. *Pflugers Arch* 1969;310(2):182-184.

75. Jakowlew SB, Ciment G, Tuan RS, Sporn MB, Roberts AB. Expression of transforming growth factor-beta 2 and beta 3 mRNAs and proteins in the developing chicken embryo. *Differentiation* 1994;55(2):105-118.
76. Jalil JE, Doering CW, Janicki JS, Pick R, Clark WA, Abrahams C, et al. Structural vs. contractile protein remodeling and myocardial stiffness in hypertrophied rat left ventricle. *J Mol Cell Cardiol* 1988;20(12):1179-1187.
77. Jalil JE, Doering CW, Janicki JS, Pick R, Shroff SG, Weber KT. Fibrillar collagen and myocardial stiffness in the intact hypertrophied rat left ventricle. *Circ Res* 1989a;64(6):1041-1050.
78. Jalil JE, Janicki JS, Pick R, Abrahams C, Weber KT. Fibrosis-induced reduction of endomyocardium in the rat after isoproterenol treatment. *Circ Res* 1989b;65(2):258-264.
79. Jolly SR, Kane WJ, Bailie MB, Abrams GD, Lucchesi BR. Canine myocardial reperfusion injury. Its reduction by the combined administration of superoxide dismutase and catalase. *Circ Res* 1984;54(3):277-285.
80. Kim SJ, Peppas A, Hong SK, Yang G, Huang Y, Diaz G, et al. Persistent stunning induces myocardial hibernation and protection: flow/function and metabolic mechanisms. *Circ Res* 2003;92(11):1233-1239.
81. Kloner RA, Jennings RB. Consequences of brief ischemia: stunning, preconditioning, and their clinical implications: part 1. *Circulation* 2001a;104(24):2981-2989.
82. Kloner RA, Jennings RB. Consequences of brief ischemia: stunning, preconditioning, and their clinical implications: part 2. *Circulation* 2001b;104(25):3158-3167.
83. Kloner RA, Arimie RB, Kay GL, Cannom D, Matthews R, Bhandari A, et al. Evidence for stunned myocardium in humans: a 2001 update. *Coron Artery Dis* 2001c;12(5):349-356.
84. Koenig W. [Epidemiology of coronary heart disease]. *Z Kardiol* 1998;87(Suppl 2):3-7.
85. Kukielka GL, Smith CW, Manning AM, Youker KA, Michael LH, Entman ML. Induction of interleukin-6 synthesis in the myocardium. Potential role in postreperfusion inflammatory injury. *Circulation* 1995a;92(7):1866-1875.

86. Kukielka GL, Smith CW, LaRosa GJ, Manning AM, Mendoza LH, Daly TJ, et al. Interleukin-8 gene induction in the myocardium after ischemia and reperfusion in vivo. *J Clin Invest* 1995b;95(1):89-103.
87. Kumar AG, Ballantyne CM, Michael LH, Kukielka GL, Youker KA, Lindsey ML, et al. Induction of monocyte chemoattractant protein-1 in the small veins of the ischemic and reperfused canine myocardium. *Circulation* 1997;95(3):693-700.
88. Lacraz S, Nicod LP, Chicheportiche R, Welgus HG, Dayer JM. IL-10 inhibits metalloproteinase and stimulates TIMP-1 production in human mononuclear phagocytes. *J Clin Invest* 1995;96(5):2304-2310.
89. Lakshminarayanan V, Lewallen M, Frangogiannis NG, Evans AJ, Wedin KE, Michael LH, et al. Reactive oxygen intermediates induce monocyte chemotactic protein-1 in vascular endothelium after brief ischemia. *Am J Pathol* 2001;159(4):1301-1311.
90. Lefer DJ, Granger DN. Oxidative stress and cardiac disease. *Am J Med* 2000;109(4):315-323.
91. Lim H, Fallavollita JA, Hard R, Kerr CW, Canty JM, Jr. Profound apoptosis-mediated regional myocyte loss and compensatory hypertrophy in pigs with hibernating myocardium. *Circulation* 1999;100(23):2380-2386.
92. Loetscher M, Gerber B, Loetscher P, Jones SA, Piali L, Clark-Lewis I, et al. Chemokine receptor specific for IP10 and mig: structure, function, and expression in activated T-lymphocytes. *J Exp Med* 1996;184(3):963-969.
93. Loetscher M, Loetscher P, Brass N, Meese E, Moser B. Lymphocyte-specific chemokine receptor CXCR3: regulation, chemokine binding and gene localization. *Eur J Immunol* 1998;28(11):3696-3705.
94. Loetscher P, Pellegrino A, Gong JH, Mattioli I, Loetscher M, Bardi G, et al. The ligands of CXC chemokine receptor 3, I-TAC, Mig, and IP10, are natural antagonists for CCR3. *J Biol Chem* 2001;276(5):2986-2991.
95. Lukacs NW, Hogaboam C, Campbell E, Kunkel SL. Chemokines: function, regulation and alteration of inflammatory responses. *Chem Immunol* 1999;72:102-120.

96. Luster AD, Ravetch JV. Biochemical characterization of a gamma interferon-inducible cytokine (IP-10). *J Exp Med* 1987;166(4):1084-1097.
97. Maes A, Flameng W, Nuyts J, Borgers M, Shivalkar B, Ausma J, et al. Histological alterations in chronically hypoperfused myocardium. Correlation with PET findings. *Circulation* 1994;90(2):735-745.
98. Maes A, Flameng W, Borgers M, Nuyts J, Ausma J, Bormans G, et al. Regional myocardial blood flow, glucose utilization and contractile function before and after revascularization and ultrastructural findings in patients with chronic coronary artery disease. *Eur J Nucl Med* 1995;22(11):1299-1305.
99. Massague J. The transforming growth factor-beta family. *Annu Rev Cell Biol* 1990;6:597-641.
100. Massey KD, Strieter RM, Kunkel SL, Danforth JM, Standiford TJ. Cardiac myocytes release leukocyte-stimulating factors. *Am J Physiol* 1995;269(3 Pt 2):H980-987.
101. Matsuzaki M, Gallagher KP, Kemper WS, White F, Ross J, Jr. Sustained regional dysfunction produced by prolonged coronary stenosis: gradual recovery after reperfusion. *Circulation* 1983;68(1):170-182.
102. Michael LH, Lewis RM, Brandon TA, Entman ML. Cardiac lymph flow in conscious dogs. *Am J Physiol* 1979;237(3):H311-317.
103. Michael LH, Entman ML, Hartley CJ, Youker KA, Zhu J, Hall SR, et al. Myocardial ischemia and reperfusion: a murine model. *Am J Physiol* 1995;269(6 Pt 2):H2147-2154.
104. Millard RW. Induction of functional coronary collaterals in the swine heart. *Basic Res Cardiol* 1981;76(5):468-473.
105. Muller K, Ehlers S, Solbach W, Laskay T. Novel multi-probe RNase protection assay (RPA) sets for the detection of murine chemokine gene expression. *J Immunol Methods* 2001;249(1-2):155-165.
106. Murray CJ, Lopez AD. Evidence-based health policy--lessons from the Global Burden of Disease Study. *Science* 1996;274(5288):740-743.

107. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 1986;74(5):1124-1136.
108. Nagueh SF, Mikati I, Weilbaecher D, Reardon MJ, Al-Zaghrini GJ, Cacula D, et al. Relation of the contractile reserve of hibernating myocardium to myocardial structure in humans. *Circulation* 1999;100(5):490-496.
109. Neumann DA, Lane JR, Allen GS, Herskowitz A, Rose NR. Viral myocarditis leading to cardiomyopathy: do cytokines contribute to pathogenesis? *Clin Immunol Immunopathol* 1993;68(2):181-190.
110. Nossuli TO, Lakshminarayanan V, Baumgarten G, Taffet GE, Ballantyne CM, Michael LH, et al. A chronic mouse model of myocardial ischemia-reperfusion: essential in cytokine studies. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000;278(4):H1049-1055.
111. Nossuli TO, Frangogiannis NG, Knuefermann P, Lakshminarayanan V, Dewald O, Evans AJ, et al. Brief murine myocardial I/R induces chemokines in a TNF-alpha-independent manner: role of oxygen radicals. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001;281(6):H2549-2558.
112. Oberholzer A, Souza SM, Tschoeke SK, Oberholzer C, Abouhamze A, Pribble JP, et al. Plasma Cytokine Measurements Augment Prognostic Scores as Indicators of Outcome in Patients with Severe Sepsis. *Shock* 2005;23(6):488-493.
113. Ohmori Y, Wyner L, Narumi S, Armstrong D, Stoler M, Hamilton TA. Tumor necrosis factor-alpha induces cell type and tissue-specific expression of chemoattractant cytokines in vivo. *Am J Pathol* 1993;142(3):861-870.
114. O'Kane S, Ferguson MW. Transforming growth factor beta's and wound healing. *Int J Biochem Cell Biol* 1997;29(1):63-78.
115. Olson TS, Ley K. Chemokines and chemokine receptors in leukocyte trafficking. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2002;283(1):R7-28.
116. Ono K, Matsumori A, Shioi T, Furukawa Y, Sasayama S. Cytokine gene expression after myocardial infarction in rat hearts: possible implication in left ventricular remodeling. *Circulation* 1998;98(2):149-156.

117. Oury TD, Ho YS, Piantadosi CA, Crapo JD. Extracellular superoxide dismutase, nitric oxide, and central nervous system O<sub>2</sub> toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89(20):9715-9719.
118. Paigen K. A miracle enough: the power of mice. *Nat Med* 1995;1(3):215-220.
119. Patel B, Kloner RA, Przyklenk K, Braunwald E. Postischemic myocardial "stunning": a clinically relevant phenomenon. *Ann Intern Med* 1988;108(4):626-628.
120. Potts JD, Dagle JM, Walder JA, Weeks DL, Runyan RB. Epithelial-mesenchymal transformation of embryonic cardiac endothelial cells is inhibited by a modified antisense oligodeoxynucleotide to transforming growth factor beta 3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88(4):1516-1520.
121. Prediger EA. Detection and quantitation of mRNAs using ribonuclease protection assays. *Methods Mol Biol* 2001;160:495-505.
122. Qin S, Rottman JB, Myers P, Kassam N, Weinblatt M, Loetscher M, et al. The chemokine receptors CXCR3 and CCR5 mark subsets of T cells associated with certain inflammatory reactions. *J Clin Invest* 1998;101(4):746-754.
123. Rahimtoola SH. Coronary bypass surgery for chronic angina--1981. A perspective. *Circulation* 1982;65(2):225-241.
124. Rahimtoola SH. Are the findings from the randomized Coronary Artery Surgery Study (CASS) of value in the management of patients soon after acute myocardial infarction? *Am J Cardiol* 1985a;56(1):179-181.
125. Rahimtoola SH. A perspective on the three large multicenter randomized clinical trials of coronary bypass surgery for chronic stable angina. *Circulation* 1985b;72(6 Pt 2):V123-135.
126. Rahimtoola SH. Some unexpected lessons from large multicenter randomized clinical trials. *Circulation* 1985c;72(3):449-455.
127. Rahimtoola SH. The hibernating myocardium. *Am Heart J* 1989;117(1):211-221.
128. Rahimtoola SH. The hibernating myocardium in ischaemia and congestive heart failure. *Eur Heart J* 1993;14 Suppl A:22-26.

129. Rahimtoola SH. From coronary artery disease to heart failure: role of the hibernating myocardium. *Am J Cardiol* 1995a;75(13):16E-22E.
130. Rahimtoola SH. Hibernating myocardium: a brief article. *Basic Res Cardiol* 1995b;90(1):38-40.
131. Rahimtoola SH. Clinical aspects of hibernating myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 1996;28(12):2397-2401.
132. Rahimtoola SH. Hibernating myocardium is hypoperfused. *Basic Res Cardiol* 1997a;92 Suppl 2:9-11.
133. Rahimtoola SH. Importance of diagnosing hibernating myocardium: how and in whom? *J Am Coll Cardiol* 1997b;30(7):1701-1706.
134. Rahimtoola SH. Concept and evaluation of hibernating myocardium. *Annu Rev Med* 1999;50:75-86.
135. Razeghi P, Young ME, Abbasi S, Taegtmeier H. Hypoxia in vivo decreases peroxisome proliferator-activated receptor alpha-regulated gene expression in rat heart. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;287(1):5-10.
136. Rees G, Bristow JD, Kremkau EL, Green GS, Herr RH, Griswold HE, et al. Influence of aortocoronary bypass surgery on left ventricular performance. *N Engl J Med* 1971;284(20):1116-1120.
137. Rossi D, Zlotnik A. The biology of chemokines and their receptors. *Annu Rev Immunol* 2000;18:217-242.
138. Roulot D, Sevcik AM, Coste T, Strosberg AD, Marullo S. Role of transforming growth factor beta type II receptor in hepatic fibrosis: studies of human chronic hepatitis C and experimental fibrosis in rats. *Hepatology* 1999;29(6):1730-1738.
139. Sappino AP, Schurch W, Gabbiani G. Differentiation repertoire of fibroblastic cells: expression of cytoskeletal proteins as marker of phenotypic modulations. *Lab Invest* 1990a;63(2):144-161.
140. Sappino AP, Masouye I, Saurat JH, Gabbiani G. Smooth muscle differentiation in scleroderma fibroblastic cells. *Am J Pathol* 1990b;137(3):585-591.

141. Schaper W, Schaper J, Xhonneux R, Vandesteene R. The morphology of intercoronary anastomoses in chronic coronary artery occlusion. *Cardiovasc Res* 1969a;3(3):315-323.
142. Schaper W, Remijnsen P, Xhonneux R. The size of myocardial infarction after experimental coronary artery ligation. *Z Kreislaufforsch* 1969b;58(8):904-909.
143. Schulz R, Heusch G. Hibernating myocardium. *Heart* 2000;84(6):587-594.
144. Selye H. [Development of the stress concept. Stress and heart diseases]. *Med Welt* 1969;16:915-918 passim.
145. Shimoni S, Frangogiannis NG, Aggeli CJ, Shan K, Quinones MA, Espada R, et al. Microvascular structural correlates of myocardial contrast echocardiography in patients with coronary artery disease and left ventricular dysfunction: implications for the assessment of myocardial hibernation. *Circulation* 2002;106(8):950-956.
146. Shin WS, Szuba A, Rockson SG. The role of chemokines in human cardiovascular pathology: enhanced biological insights. *Atherosclerosis* 2002;160(1):91-102.
147. Shyy JY, Lin MC, Han J, Lu Y, Petrim M, Chien S. The cis-acting phorbol ester "12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate"-responsive element is involved in shear stress-induced monocyte chemotactic protein 1 gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92(17):8069-8073.
148. Sica A, Wang JM, Colotta F, Dejana E, Mantovani A, Oppenheim JJ, et al. Monocyte chemotactic and activating factor gene expression induced in endothelial cells by IL-1 and tumor necrosis factor. *J Immunol* 1990;144(8):3034-3038.
149. Smith RE, Strieter RM, Phan SH, Lukacs N, Kunkel SL. TNF and IL-6 mediate MIP-1alpha expression in bleomycin-induced lung injury. *J Leukoc Biol* 1998;64(4):528-536.
150. Strieter RM, Polverini PJ, Kunkel SL, Arenberg DA, Burdick MD, Kasper J, et al. The functional role of the ELR motif in CXC chemokine-mediated angiogenesis. *J Biol Chem* 1995;270(45):27348-27357.
151. Sustaita H, Chatterjee K, Matloff JM, Marty AT, Swan HJ, Fields J. Emergency bypass surgery in impending and complicated acute myocardial infarction. *Arch Surg* 1972;105(1):30-35.

152. Swynghedauw B. Molecular mechanisms of myocardial remodeling. *Physiol Rev* 1999;79(1):215-262.
153. Tarpey MM, Fridovich I. Methods of detection of vascular reactive species: nitric oxide, superoxide, hydrogen peroxide, and peroxynitrite. *Circ Res* 2001;89(3):224-236.
154. Tarzami ST, Cheng R, Miao W, Kitsis RN, Berman JW. Chemokine expression in myocardial ischemia: MIP-2 dependent MCP-1 expression protects cardiomyocytes from cell death. *J Mol Cell Cardiol* 2002;34(2):209-221.
155. Tessier PA, Naccache PH, Clark-Lewis I, Gladue RP, Neote KS, McColl SR. Chemokine networks in vivo: involvement of C-X-C and C-C chemokines in neutrophil extravasation in vivo in response to TNF-alpha. *J Immunol* 1997;159(7):3595-3602.
156. Thompson NL, Bazoberry F, Speir EH, Casscells W, Ferrans VJ, Flanders KC, et al. Transforming growth factor beta-1 in acute myocardial infarction in rats. *Growth Factors* 1988;1(1):91-99.
157. Trueblood NA, Xie Z, Communal C, Sam F, Ngoy S, Liaw L, et al. Exaggerated left ventricular dilation and reduced collagen deposition after myocardial infarction in mice lacking osteopontin. *Circ Res* 2001;88(10):1080-1087.
158. Unutmaz D, Xiang W, Sunshine MJ, Campbell J, Butcher E, Littman DR. The primate lentiviral receptor Bonzo/STRL33 is coordinately regulated with CCR5 and its expression pattern is conserved between human and mouse. *J Immunol* 2000;165(6):3284-3292.
159. Vanoverschelde JL, Wijns W, Depre C, Essamri B, Heyndrickx GR, Borgers M, et al. Mechanisms of chronic regional postischemic dysfunction in humans. New insights from the study of noninfarcted collateral-dependent myocardium. *Circulation* 1993;87(5):1513-1523.
160. Vanoverschelde JL, Pasquet A, Gerber B, Melin JA. Pathophysiology of myocardial hibernation. Implications for the use of dobutamine echocardiography to identify myocardial viability. *Heart* 1999;82 Suppl 3:III1-7.
161. Vanoverschelde JL, Melin JA. The pathophysiology of myocardial hibernation: current controversies and future directions. *Prog Cardiovasc Dis* 2001;43(5):387-398.

162. Verdouw PD, van den Doel MA, de Zeeuw S, Duncker DJ. Animal models in the study of myocardial ischaemia and ischaemic syndromes. *Cardiovasc Res* 1998;39(1):121-135.
163. Vlahovic A, Popovic A. [Reversible left ventricular dysfunction in coronary disease (part one): myocardial stunning]. *Med Pregl* 2000;53(1-2):39-44.
164. Wang JM, Su S, Gong W, Oppenheim JJ. Chemokines, receptors, and their role in cardiovascular pathology. *Int J Clin Lab Res* 1998;28(2):83-90.
165. Weber KT, Brilla CG, Janicki JS. Myocardial fibrosis: functional significance and regulatory factors. *Cardiovasc Res* 1993a;27(3):341-348.
166. Weber C, Draude G, Weber KS, Wubert J, Lorenz RL, Weber PC. Downregulation by tumor necrosis factor-alpha of monocyte CCR2 expression and monocyte chemotactic protein-1-induced transendothelial migration is antagonized by oxidized low-density lipoprotein: a potential mechanism of monocyte retention in atherosclerotic lesions. *Atherosclerosis* 1999b;145(1):115-123.
167. Weber C, Erl W, Weber KS, Weber PC. Effects of oxidized low density lipoprotein, lipid mediators and statins on vascular cell interactions. *Clin Chem Lab Med* 1999c;37(3):243-251.
168. Weber KS, von Hundelshausen P, Clark-Lewis I, Weber PC, Weber C. Differential immobilization and hierarchical involvement of chemokines in monocyte arrest and transmigration on inflamed endothelium in shear flow. *Eur J Immunol* 1999d;29(2):700-712.
169. Weber KS, Nelson PJ, Grone HJ, Weber C. Expression of CCR2 by endothelial cells : implications for MCP-1 mediated wound injury repair and In vivo inflammatory activation of endothelium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999e;19(9):2085-2093.
170. Weber KS, Draude G, Erl W, de Martin R, Weber C. Monocyte arrest and transmigration on inflamed endothelium in shear flow is inhibited by adenovirus-mediated gene transfer of IkappaB-alpha. *Blood* 1999f;93(11):3685-3693.
171. Weber KS, Klickstein LB, Weber C. Specific activation of leukocyte beta2 integrins lymphocyte function-associated antigen-1 and Mac-1 by chemokines mediated by distinct pathways via the alpha subunit cytoplasmic domains. *Mol Biol Cell* 1999g;10(4):861-873.

172. Wells RG. Fibrogenesis. V. TGF-beta signaling pathways. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000;279(5):G845-850.
173. Willems IE, Arends JW, Daemen MJ. Tenascin and fibronectin expression in healing human myocardial scars. *J Pathol* 1996;179(3):321-325.
174. Yang Z, Zingarelli B, Szabo C. Crucial role of endogenous interleukin-10 production in myocardial ischemia/reperfusion injury. *Circulation* 2000;101(9):1019-1026.
175. Yokoyama T, Nakano M, Bednarczyk JL, McIntyre BW, Entman M, Mann DL. Tumor necrosis factor-alpha provokes a hypertrophic growth response in adult cardiac myocytes. *Circulation* 1997;95(5):1247-1252.
176. Youker K, Smith CW, Anderson DC, Miller D, Michael LH, Rossen RD, et al. Neutrophil adherence to isolated adult cardiac myocytes. Induction by cardiac lymph collected during ischemia and reperfusion. *J Clin Invest* 1992;89(2):602-609.
177. Young ME, Laws FA, Goodwin GW, Taegtmeyer H. Reactivation of peroxisome proliferator-activated receptor alpha is associated with contractile dysfunction in hypertrophied rat heart. *J Biol Chem* 2001;276(48):44390-44395.
178. Yue P, Massie BM, Simpson PC, Long CS. Cytokine expression increases in nonmyocytes from rats with postinfarction heart failure. *Am J Physiol* 1998;275(1 Pt 2):H250-258.

## 9 Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Armin Welz möchte ich für die freundliche Überlassung der Thematik und die Möglichkeit der Bearbeitung herzlich danken.

Mein besonderer Dank gilt auch Herrn Prof. Mark L. Entman, MD., der mir in seinem Labor am "Baylor College of Medicine" des Texas Medical Center in Houston, Texas, USA, die denkbar besten Arbeitsbedingungen ermöglichte.

Dr. med. Oliver Dewald, der mir nicht nur als exzellenter Betreuer und Berater sowohl in Houston, als auch in Bonn, sondern auch als sehr guter Freund eine unbeschreibliche Hilfe war - und immer noch ist - bin ich zu grösstem Dank verpflichtet.

Bedanken möchte ich mich auch bei den zahlreichen Mitarbeitern des Departement of Casdiovascular Sciences des "Baylor College of Medicine", allen voran Nicolaos G. Frangogiannis, MD., PhD., der mich durch seine konstruktive und kritische Anleitung und seine fachlich kompetente Beratung hilfreich unterstützte, ausserdem Mark Lewallen für seine wertvollen praktischen Hinweise zu den molekularebiologischen Versuchen und für seine Hilfe bei EDV-Problemen. Derselbe Dank gebührt Dr. Sandra B. Haudek, Martin Zörlein und Peter Krings für ihre Hilfe bei der Korrektur der Arbeit.

Nicht zuletzt danke ich meinen Eltern, die mir meinen Werdegang ermöglichen und mich in jeder Lage unterstützen.