

**Myokardiale Ischämie/Reperfusion
und das angeborene Immunsystem.
Die Bedeutung des „Toll-Like-Receptor“ 4**

- Beobachtungen an einem murinen in-vivo-Modell -

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

Vorgelegt von
Steffen Osterkamp
aus Ahaus

Erscheinungsjahr: 2006

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Rainer Meyer

2. Gutachter: Prof. Dr. med. Klaus B. Fink

Tag der mündlichen Prüfung: 10. Oktober 2006

Aus dem Physiologischen Institut II der Universität Bonn,

Wilhelmstraße 33-35, 53111 Bonn

Direktor: Prof. Dr. med. P. Swandulla

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn unter
http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online elektronisch publiziert.

Meinen Eltern zum Dank.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	6
1. Einleitung	7
2. Material und Methoden	13
2.1 Tiermodell	13
2.2 Initialoperation	15
2.3 Ischämie- und Reperfusionprotokoll	18
2.4 Histologie	19
2.5 Statistik	22
3. Ergebnisse	23
3.1 OP	23
3.2 Auswertung	25
3.3. Experimenteller Erfolg	26
4. Diskussion	31
4.1 Klinische Relevanz	37
4.2 Ausblick	38
5. Zusammenfassung	39
6. Literaturverzeichnis	40
7. Danksagung	55
8. Lebenslauf	56

Abkürzungsverzeichnis

AAR	„area-at-risk“
CD-14	„cluster of differentiation“ 14
COX-2	Cyclooxygenase 2
eNOS	„endothelial nitric oxide synthase“
HSP	„heat shock protein“
IL	Interleukin
iNOS	„inducible nitric oxide synthase“
I/R	Ischämie/Reperfusion
IRAK	„IL-1-receptor-associated-kinase“
K _{ATP}	ATP-sensitive Kaliumkanäle
KHK	Koronare Herzkrankheit
LAD	„left anterior descending coronary artery“
LBP	„lipopolysaccharid-binding-protein“
LPS	Lipopolysaccharid
MAPK	„mitogen-activated-protein-kinases“
MLA	„monophosphoryl lipid A“
MyD88	„myeloid differentiation factor 88“
NAAR	„non-area-at-risk“
NF-κB	„nuclear transcription factor κB“
PKC	Proteinkinase C
PKR	dsRNA-abhängige Proteinkinase
PTCA	„percutaneous transluminal coronary angioplasty“
ROS	„reactive oxygen species“
TRAF6	„TNF-receptor-associated factor 6“
TIRAP	„Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor protein“
TLR	„Toll-Like-Receptor“
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor α
TRIF	„Toll/IL-1R-domain-containing-adaptor-inducing-IFN-β“
TTC	Triphenyltetrazoliumchlorid

1. Einleitung

Kardiovaskuläre Krankheiten stellen mit 40% die häufigste Todesursache in der Europäischen Union dar (Eurostat, 2004). Laut Braunwald leiden mehr als 12 Millionen Personen in den USA an einer koronaren Herzkrankheit (KHK). Der große Zuwachs an Risikofaktoren (s.u.) in ärmeren, sich entwickelnden Ländern lässt die KHK und die damit verbundenen Folgen bis zum Jahre 2020 häufigste Todesursache weltweit werden (Braunwald, 1997). Nach Hochrechnungen der Daten des MONICA/KORA-Herzinfarktregisters für die Region Augsburg ereigneten sich im Jahre 2003 295.000 Herzinfarkte im Bundesgebiet. Der aus einer KHK häufig resultierende Myokardinfarkt ist nach diesen Daten in Deutschland jedes Jahr für ca. 171.000 Todesfälle verantwortlich (Loewel, H. et al., 2006) und damit die häufigste Einzeltodesursache. Während 1991 bis 1993 die Letalität des Myokardinfarkts vor Erreichen des Krankenhauses noch bei ca. 60% lag (Loewel, H., 1996a; 1996b), überleben heute 60% der Patienten den ersten Postinfarkttag (Loewel, H. et al., 2006).

Eine Vielzahl von Risikofaktoren für die Entwicklung einer KHK wie Fettstoffwechselstörungen, arterielle Hypertension, Rauchen, genetische Prädisposition, Lebensalter, Übergewicht und Diabetes Mellitus werden als Hauptrisikofaktoren beschrieben (Herold, 2003). Diese können alleine oder in Kombination einer Verengung der Herzkranzgefäße Vorschub leisten und damit eine Ischämie des Myokards verursachen. Welchen genauen Einfluss die oben genannten Risikofaktoren auf die strukturellen und funktionellen Veränderungen der Koronargefäße haben, ist unzureichend geklärt. In den letzten Jahren wurden genetische Faktoren sowie der Einfluss des Immunsystems als weitere wesentliche Faktoren in der Pathogenese der KHK erforscht (Vink et al., 2004).

Die Okklusion einer durch Atherosklerose vorgeschädigten Koronararterie ist eine gefürchtete Komplikation der KHK. Während der daraus resultierenden Ischämie ist das Herz im Zuge der reduzierten Perfusion einem Minderangebot an Sauerstoff und Substraten (z.B. Glukose, ATP) und einem inadäquaten Abtransport von Metaboliten ausgesetzt (Verdouw et al., 1998). Als Konsequenz andauernder Ischämie findet schließlich eine irreversible Schädigung des Myokards statt. Als optimale Therapie dieses Krankheitsbildes wird eine frühzeitige Reperfusionstherapie angesehen, die nach

Möglichkeit durch eine perkutane Koronarintervention mit Ballondilatation oder bei Fehlen dieser Möglichkeit durch systemische Fibrinolyse erreicht wird (Elsasser et al., 2005). Während in den Jahren 1991 bis 1993 nur bei 45 Prozent aller Patienten mit Myokardinfarkt eine Reperfusionstherapie durchgeführt wurde, waren es in den Jahren 2001 bis 2003 bereits 80 Prozent (Loewel, H. et al., 2006). Die Reperfusion des ischämischen Gewebes kann eine Myokardnekrose verhindern oder deren Ausdehnung verringern (Michael et al., 1999), allerdings wird dabei eine zusätzliche Schädigung des Gewebes beobachtet, „reperfusion injury“ genannt. Dies ist eine reperfusionsabhängige Entzündungsreaktion, bei der durch Sauerstoffradikale und freigesetzte Zellmediatoren eine Zytokinkaskade getriggert wird, die im Reparaturprozess des Myokardgewebes eine wichtige Rolle spielt (Baumgarten et al., 2000). Zytokine regulieren unter anderem die Adhäsion und Migration von Entzündungszellen und die Expression beteiligter Rezeptoren (Latini et al., 1994). Klinische Konsequenz der „reperfusion injury“ ist einerseits das vermehrte Auftreten von Arrhythmien (Hearse and Tosaki, 1987), andererseits von myokardialem Gewebsverlust (Hearse and Bolli, 1992) und einer reversiblen kontraktilen Dysfunktion durch vitales aber nicht funktionelles Gewebe, „Stunning“ genannt (Bolli, 2000; 1990). Entscheidend für das Ausmaß dieser Schäden ist die Dauer der Ischämie, bevor eine Reperfusion stattfindet. Die für den „reperfusion injury“ verantwortlichen pathophysiologischen Mechanismen sind bisher nur teilweise erforscht, wobei immunmodulatorischen Vorgängen auch hier eine bedeutende Rolle zugeschrieben wird (Entman and Smith, 1994; Frangogiannis et al., 1998).

Präkonditionierung ist ein weiteres Phänomen, das im Zusammenhang mit myokardialer Ischämie und Reperfusion (I/R) beschrieben wird (Murry et al., 1986). Tierexperimentell wurde eine kurzzeitige Ischämie erzeugt, die nach kurzer Reperfusion wiederholt wurde, wobei es nicht zu einer anhaltenden ventrikulären Dysfunktion kam (Vanoverschelde et al., 1993). Die Präkonditionierung geht mit reversiblen, kurzzeitigen intrazellulären Veränderungen einher, die sich innerhalb von Minuten normalisieren und ohne histomorphologische Veränderungen ablaufen. Dabei wird eine Verminderung des Parenchymschadens durch einen bislang unvollständig geklärten Mechanismus erzielt. Neben diesen tierexperimentellen (Guo et al., 1998; Murry et al., 1986) haben auch klinische Studien gezeigt, dass kurze Phasen von koronarer Okklusion und anschließender Reperfusion vor einem Myokardinfarkt zu einer Reduktion des

nekrotischen Arealen führen und somit kardioprotektive Effekte aufweisen (Kloner and Yellon, 1994; Szmagala et al., 1998). Bolli et al. teilen die Präkonditionierung in eine frühe Phase ein, die nur 2 bis 3 Stunden im Anschluss an die repetitive I/R andauert, und eine späte Phase, die nach 12 bis 24 Stunden einsetzt und mindestens 72 Stunden andauert (Guo et al., 1998). Die späte Phase der Präkonditionierung kann durch verschiedene Stimuli induziert und moduliert werden: Neben der ischämischen Präkonditionierung kann eine Präkonditionierung unter anderem durch Hitze (Marber et al., 1993) und verschiedene Medikamente wie Isofluran (Kato and Foex, 2002) erfolgen. Virulenzfaktoren gramnegativer Bakterien, so genannte Lipopolysaccharide (LPS), können vermittelt durch die angeborene Immunabwehr ebenfalls eine myokardiale Präkonditionierung bewirken. Es konnte gezeigt werden, dass nach einer Administration von LPS als präkonditionierender Stimulus 24 Stunden vor einer Ischämie eine reduzierte Infarktgröße und verringerte Freisetzung von Troponin T in Ratten resultiert (Brown et al., 1989; Zacharowski et al., 1999). Hiasa et al. berichten über eine reduzierte Expression proinflammatorischer Zytokine nach myokardialer Ischämie bei vorangehender Präkonditionierung durch LPS, was dann zu einer verminderten inflammatorischen Antwort und reduzierten Infarktgröße führt (Hiasa et al., 2001). Die Aktivierung verschiedener Adenosin-Rezeptoren (A_1 und A_3) trägt während kurzer repetitiver Phasen einer koronaren Okklusion zu den Effekten der Präkonditionierung bei (Takano et al., 2001). Weiterhin ist eine Aktivierung der Tyrosinkinase (Imagawa et al., 1997) und der Proteinkinase C (PKC) (Baxter et al., 1995; Baxter et al., 1997) in die Mechanismen der Präkonditionierung involviert. ATP-sensitive Kaliumkanäle (K_{ATP}) sind ein weiterer potentieller Mediator der ischämischen (Bernardo et al., 1999) und pharmakologischen (Mei et al., 1996) Präkonditionierung und können unter anderem durch NO aktiviert werden (Sasaki et al., 2000). Durch eNOS („endothelial nitric oxide synthase“) produziertes NO induziert den Beginn der späten Phase der Präkonditionierung (Tag 1), während durch iNOS („inducible nitric oxide synthase“) produziertes NO an Tag 2 bis 4 die protektiven Effekte dieser Phase vermittelt (Bolli et al., 1998). Von der gleichen Arbeitsgruppe wurde gezeigt, dass die Cyclooxygenase (COX)-2 „downstream“ der iNOS in der Vermittlung der Präkonditionierung wirkt (Bolli et al., 2002). Auch wenn dieses Phänomen von vielen Autoren als viel versprechend eingeordnet wird (Bolli, 2000), muss die klinische Bedeutung noch sorgfältig evaluiert werden (Yellon and Dana, 2000).

Neben einer präkonditionierenden Wirkung können Lipopolysaccharide auch die myokardiale Expression inflammatorischer Mediatoren induzieren (Dibbs et al., 1999; Muller-Werdan et al., 1998; Werdan and Muller-Werdan, 1996). Diese Mediatoren können eine myokardiale Dysfunktion bis hin zum linksventrikulären Pumpversagen verursachen (Muller-Werdan et al., 1998). Die Wirkung von LPS auf die Kontraktion des Herzens scheint allerdings nicht nur indirekt durch eine erhöhte Zytokinexpression vermittelt zu werden, sondern LPS wirkt auch direkt negativ inotrop (Nishikawa and Lew, 1995; Yasuda and Lew, 1997), wobei die negativ inotrope Wirkung von LPS bereits nach einstündiger Einwirkzeit auftritt (Baumgarten et al., 2006). Nemoto et al. zeigten die Vermittlung der linksventrikulären Dysfunktion im LPS-induzierten Schock über den Toll-Like-Rezeptor 4 (TLR4) (Nemoto et al., 2002). Weiterhin ist LPS in der Lage, die myokardiale Expression von Zytokinen nach Anbindung an TLR4 zu induzieren (Baumgarten et al., 2001). Insbesondere für den Tumor Nekrose Faktor (TNF) gibt es eine Reihe von Untersuchungen sowohl in vivo als auch an isolierten Herzen und einzelnen Kardiomyozyten (Bozkurt et al., 2001; Goldhaber et al., 1996). Ob die Präkonditionierung durch LPS sich allerdings der gleichen Mechanismen bedient wie die Präkonditionierung durch I/R bleibt ebenso unklar wie die Frage, welche molekularen Mechanismen für diese Effekte verantwortlich sind.

Für die Erkennung des LPS durch den Wirtsorganismus ist das angeborene Immunsystem zuständig. Dieses kommt in fast allen multizellulären Organismen vor und gewährleistet von den ersten Lebenstagen an einen Schutz vor pathogenen Mikroorganismen (Fearon and Locksley, 1996; Hoffmann et al., 1999). Das erworbene Immunsystem hingegen muss sich im Laufe der ersten Lebensmonate und -jahre erst als Reaktion auf die Umwelt entwickeln. In einen Wirt eindringende Pathogene werden primär von „pattern recognition receptors“ (Muster erkennende Rezeptoren) erkannt, die in der Lage sind, angepasste intra- und interzelluläre Mechanismen zu initiieren. Unter ihnen befinden sich die Familie der Toll-Rezeptoren und „Cluster of differentiation“ (CD) 14. Diese Rezeptoren der angeborenen Immunabwehr erfüllen eine wichtige Funktion in der Erkennung des LPS (Haziot et al., 1996), allerdings ist ihre genaue Rolle noch ungenügend erforscht (Knuefermann et al., 2002a).

Die Arbeitsgruppe um Poltorak identifizierte das so genannte LPS-Gen in einer auf LPS hyporesponsiv reagierenden Mauslinie (Poltorak et al., 1998b). Makrophagen dieser

Mauslinie zeigen kaum eine Antwort auf LPS, obwohl sie eine normale Ausstattung an CD14-Rezeptoren aufweisen (Barber et al., 1995). Der identifizierte Genlocus für dieses hyporesponsive Verhalten ist das kodierende Gen für TLR4 (Qureshi et al., 1999). Mutationen des TLR4 sind auch im Menschen für die verminderte Antwort auf einen LPS-Stimulus verantwortlich (Arbour et al., 2000). Die Expression und Dimerisierung von CD14 und TLR4 ist Voraussetzung für die Signaltransduktion des LPS (Lien et al., 2000). In Folge der Stimulierung dieses Rezeptorkomplexes kommt es zu einer Aktivierung von Mitogen Aktivierten Protein Kinasen (MAPK) und von Transkriptionsfaktoren, die für die Genexpression inflammatorischer Zytokine wichtig sind (Baldassare et al., 1999; Burns et al., 1998; Cario et al., 2000; Hultmark, 1994; O'Neill and Greene, 1998; Takeuchi et al., 2000; Wesche et al., 1997; Yoshidome et al., 1999). Sowohl CD14 als auch TLR4 werden nicht nur auf Zellen des Immunsystems exprimiert, sondern auch auf humanen und murinen Kardiomyozyten (Comstock et al., 1998). Von besonderer Bedeutung ist die vermehrte Expression des TLR4 im Myokard nach Ischämie (Frantz et al., 1999). Die funktionelle Bedeutung dieser Expression ist noch unbekannt, interessanterweise führt aber eine Administration von potentiellen Liganden wie LPS (Brown et al., 1989; Zacharowski et al., 1999) oder Monophosphoryl Lipid A (MLA) (Elliott, 1998) zu einem signifikant reduzierten myokardialen I/R-Schaden. Somit ist wahrscheinlich, dass beide Rezeptoren Bestandteile des myokardialen Mechanismus zur Vermittlung der Entzündungsantwort bei LPS-vermittelter Präkonditionierung sind.

Besondere Aufmerksamkeit verdient die Erkenntnis, dass TLR4 nicht nur LPS bindet und erkennt, sondern auch Zellprodukte, die nach myokardialem Zellschaden freigesetzt werden. Unter diesen potentiellen Liganden befinden sich „heat shock protein“ (HSP) 60 (Ohashi et al., 2000) und HSP 70 (Vabulas et al., 2002), Mitglieder der Matrixproteine wie Fibrinogen (Smiley et al., 2001), Fibronectin (Okamura et al., 2001) und Hyaluronsäure (Termeer et al., 2002). Von diesen weiß man, dass sie das angeborene Immunsystem aktivieren können. Jeder der aufgeführten Liganden ist direkt oder indirekt am myokardialen Remodelling und den Prozessen der Reperfusion beteiligt. Insbesondere das Strukturprotein Fibronectin wird bei myokardialen Ischämien freigesetzt und könnte über die Bindung an TLR4 direkt weitere Entzündungs- und Adaptationsprozesse über die angeborene Immunabwehr steuern.

Ziel dieser Arbeit war es, eine Methode zur reproduzierbaren Ischämie und Reperfusion am Mäuseherzen zu etablieren. Zusätzlich sollten die entsprechenden Nachweismethoden getestet und entwickelt werden. Ein weiteres Ziel war es, den Einfluss des TLR4 auf die Ausbreitung eines okklusions- und reperfusionsbedingten Infarktes zu untersuchen. Aus diesem Grund wurden TLR4-hyporesponsive (C3H/HeJ) und Kontrolltiere (C3H/HeN) dem I/R-Protokoll unterzogen. Die Effekte der TLR4-Funktionsuntüchtigkeit auf die Größe des okklusionsbedingten Infarktes sollten mittels histologischer Färbetechniken und planimetrischer Vermessung untersucht werden. Weiterhin sollte die Grundlage geschaffen werden, um die Rolle des TLR4 in der LPS-vermittelten Präkonditionierung zu untersuchen.

2. Material und Methoden

2.1 Tiermodell

Die im vorliegenden Tiermodell verwendeten Wildtypmäuse (C3H/HeN) reagieren mit einer allgemeinen Immunreaktion sensitiv gegenüber LPS, wohingegen Tiere des zweiten eingesetzten Mausstammes (C3H/HeJ) nur schwach reagieren (Poltorak et al., 1998a). Vogel et al. haben gezeigt, dass diese TLR4-funktionsuntüchtigen Mäuse eine die Transduktionsfunktion hemmende Punktmutation im carboxyterminalen Bereich des TLR4 besitzen (Vogel et al., 1999). Männliche C3H/HeN- und C3H/HeJ-Mäuse im Alter von 8 bis 12 Wochen und mit einem Gewicht von 18 bis 25 g wurden von Charles-River (CR, Sulzfeld, Deutschland) bezogen oder im eigenen Tierstall gezüchtet. Die Haltung der Versuchstiere erfolgte in vollklimatisierten Räumen im Physiologischen Institut II der Universität Bonn. Ein Tierversuchsantrag (Aktenzeichen #50.203.2-BN43 13/02, 50.203.2 - BN43 32/04) wurde genehmigt.

Nachdem die Entwicklung von Tiermodellen zur myokardialen Ischämie bei Hunden, Schweinen und Kaninchen schon weiter fortgeschritten war, zeigten sich in den letzten Jahren die enormen Vorteile von Mausmodellen: Das Genom der Maus ist vollständig entschlüsselt und es steht eine Vielzahl von Mausmutanten zur Verfügung. Außerdem bringt das Kleintiermodell auch wirtschaftliche Vorteile: Die Haltung der Mäuse ist wesentlich kostengünstiger, ihre Reproduktionszeit deutlich geringer. Allerdings stellt die Größe der Maus ein chirurgisches Problem dar. Michael et al. beschrieben als Erste das murine I/R-Modell als „open-chest“ Modell, bei dem sowohl die Initialoperation als auch das I/R-Protokoll im selben Eingriff am offenen Thorax durchgeführt werden. Sie identifizierten die „left anterior descending coronary artery“ (LAD) als Hauptversorgungsgefäß des linken Ventrikels und okkludierten sie temporär. Das chirurgische Trauma der Initialoperation rief in diesem Modell eine signifikante Inflammationsreaktion hervor (Michael et al., 1995), welche jedoch die durch das

nachfolgende I/R-Protokoll erzeugte Entzündungsreaktion überlagerte. Daher war in diesem Modell die rein I/R-bedingte Induktion von Inflammation nicht abgrenzbar.

Um den Einfluss des operativen Traumas von der Inflammation durch das I/R-Ereignis abzugrenzen, wurde von Nossuli et al. (Nossuli et al., 2000) das o.g. Mausmodell zu einem „closed-chest“-Tiermodell weiterentwickelt. Hier wurde das I/R-Protokoll 7 bis 10 Tage nach der initialen Operation (OP) und Erholung von dem OP-Trauma am geschlossenen Thorax durchgeführt.

Das von uns verwendete Modell (s. Abbildung 1) basiert auf diesem Mausmodell von Nossuli et al. Wie in Abbildung 2 dargestellt, erfolgte auch hier eine zeitliche Trennung zwischen initialer OP und I/R-Protokoll. Die Okklusionszeit betrug in unserem Modell 60 Minuten, da die Ausdehnung des Infarktgebietes nach 60 Minuten signifikant größer ist als nach 30 Minuten (Michael et al., 1995). Die Infarktgröße nach 24 Stunden Reperfusion ist größer als nach 4 Stunden Reperfusion (Guo et al., 1998), weshalb wir in unserem Modell 24 Stunden als Reperusionszeit wählten.

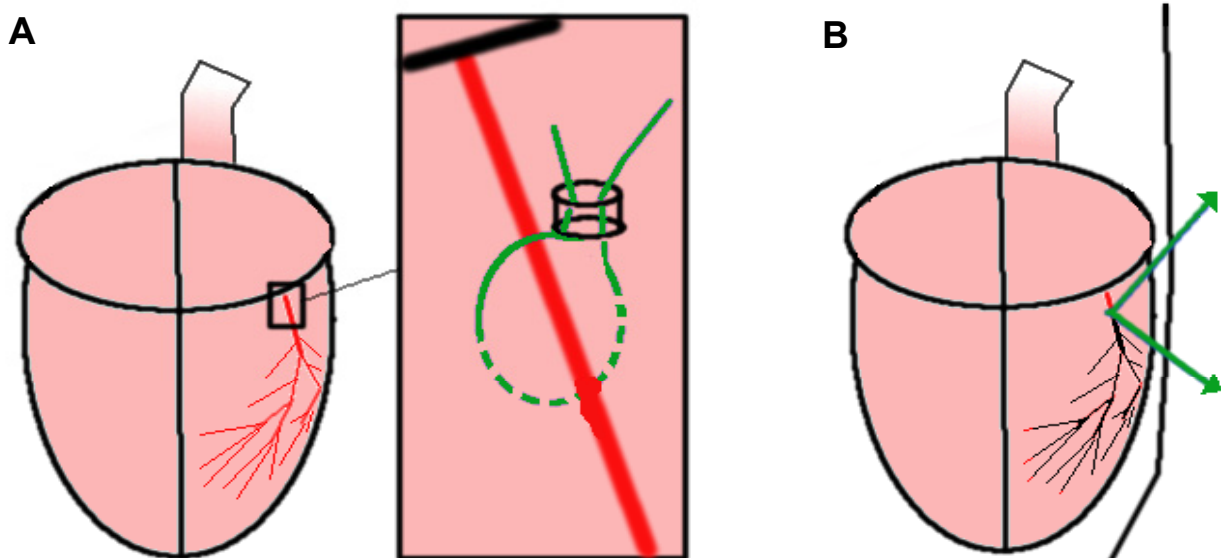


Abb. 1: Prinzip der Ischämie/Reperfusion in unserem „closed-chest“-Modell. **A** initiale OP: Implantation des Fadens um die LAD und Durchfädeln der Fadenenden durch den Okkluder (Tubusstück) **B** I/R-Protokoll: Ischämie durch Okklusion der LAD mittels Zug an den Fadenenden und Senken des Okkluders (Vergrößerung in A). Anschließende Reperfusion durch Freigabe der Fadenenden (rot: LAD; grün: LAD-Ligatur mit Okkluder).

Um den Einfluss präkonditionierender Effekte durch das initiale OP-Trauma oder durch Isofluran (s.u.) auszuschließen, erholten sich die Mäuse nach der Initialoperation 5 bis 7 Tage bis zum Beginn des I/R-Protokolls. Mit 5 bis 7 Tagen post-OP liegt der Zeitpunkt der LAD-Okklusion daher deutlich jenseits der 12 bis maximal 72 Stunden dauernden späten Phase der Präkonditionierung (s.o.).

In unserem Versuchsmodell wurden verschiedene Anästhetika verwendet (s. Abbildung 2). Aufgrund der nachgewiesenen präkonditionierenden Effekte von Isofluran im Tiermodell (Cason et al., 1997; Ludwig et al., 2004) als auch im humanen Myokard (Belhomme et al., 1999) war Isofluran wie auch alle weiteren halogenierten Anästhetika (Kato and Foex, 2002) zur Narkoseführung während der Ischämiephase nicht geeignet. Da die präkonditionierenden Effekte maximal 72 Stunden andauerten, konnte Isofluran allerdings bei der Initialoperation angewendet werden. In der Literatur war kein Hinweis darauf zu finden, dass Propofol präkonditionierende Effekte aufweist. Aus diesem Grunde wählten wir für die Ischämieperiode Propofol als Narkotikum.



Abb. 2: Nach der initialen OP mit Implantation der LAD-Ligatur erholten sich die Mäuse für 5 bis 7 Tage. Nach der einstündigen Ischämie durch Okklusion der LAD erfolgte eine 24-stündige Reperfusion bevor das Herz entnommen und histologisch aufgearbeitet wurde. In der 2. Zeile ist das jeweils verwendete Narkotikum angegeben.

2.2 Initialoperation

Während der Initial-OP wurde mit einem Sauerstoff-Isofluran(Forene®, Abbott GmbH, Wiesbaden, Germany)-Gemisch über ein spezielles Beatmungsgerät (MiniVent-Type-845, Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten) mit einer Frequenz von 110/Minute und einem Tidalvolumen von 200 µl, den physiologischen Parametern der Maus angepasst, ventiliert. Zur Narkoseeinleitung diente eine Plexiglasbox, die mit einem 2,5%igem Isofluran-

Sauerstoffgemisch gefüllt wurde. Nach Narkoseeintritt wurde den in Rückenlage fixierten Mäusen eine Narkosemaske in Form eines Konus aufgesetzt. Bei einem Flow von ca. 1l Sauerstoff pro Minute über den Isofluranverdampfer (Vapor 19.3, Dräger, Lübeck) wurde die Narkose aufrechterhalten. Mittels einer Heizplatte wurden die Mäuse bei 36,8 Grad Celsius Körpertemperatur gehalten, was durch eine rektale Temperatursonde kontrolliert wurde.

Nach Rasur und Wischdesinfektion des Operationsgebietes mit Jodlösung wurde mit Hilfe eines Operationsmikroskops (Zeiss Op-Mi1) ein medianer Hautschnitt vom Mentum bis zum Xiphoid durchgeführt. Die beiden Thyroidealappen und die prätracheale Muskulatur wurden gespreizt. Nach Anheben des Zungengrundes durch Herausziehen der Zunge wurde der Tubus ($\varnothing=1\text{mm}$) in den Larynx vorgeschoben. Anschließend wurde die prätracheale Muskulatur zur Seite geschoben, um unter direkter Sicht auf die Trachea den Tubus optimal platzieren zu können (s. Abbildung 3). Im weiteren Verlauf wurde das Versuchstier

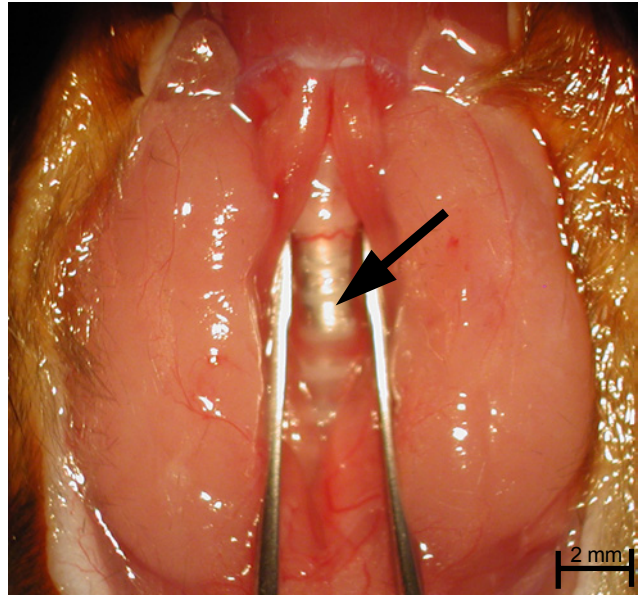


Abb. 3: Sicht auf den in die Trachea eingeführten Tubus (Pfeil). Durch die Pinzette werden vordere Halsmuskulatur und Thyroidealappen zur Seite geschoben.

wie oben geschildert mit einem Isofluran-Sauerstoff-Gemisch kontrolliert beatmet. Es wurden subkutane Elektroden eingesetzt, um ein EKG mit der Extremitätenableitung II nach Einthoven abzuleiten (PowerLab/8SP, ADInstruments, Sperrbach). Dieses wurde auf dem PC mit Chart4Windows aufgezeichnet und überwacht. Neben einem Kontroll-EKG präoperativ konnten wir so eine direkte Erfolgskontrolle der im weiteren Verlauf gesetzten Ligatur im Sinne einer transienten ST-Hebung durchführen.

Um den Thorax zu eröffnen, wurden die 3. bis 5. Rippe parasternal links durchtrennt, wobei es galt, die A. mammaria zu schonen. Mittels Spreizhäkchen eröffnete sich der Blick auf das Perikard, welches stumpf durchtrennt wurde (s. Abbildung 4A). Nach Darstellung der LAD wurde sie proximal nach Hervortreten unter dem linken Vorhof mit

einer U-förmig gebogenen Nadel (8-0-Prolene, atraumatisch, Ethicon, Norderstedt) intramural umstochen (s. Abbildung 4B). Die beiden Fadenenden wurden durch einen ca. 0,5 mm langen Polyethylenschlauch (0,61 mm äußerer Durchmesser, SIMS Portex, UK), der als Okkluder diente, gefädelt. Zur intraoperativen Positionskontrolle der LAD-Ligatur wurde auf beide Fadenenden Zug ausgeübt, woraufhin sich das Myokard distal der Okklusionsstelle kurzfristig entfärbte (s. Abbildung 4C) und eine transiente ST-Strecken-Hebung in der Ableitung II nach Einthoven zeigte. Die Fadenenden wurden mit einer Nadel (1243 Kalt 2, Sutura, Unimed, S.A., Switzerland) durch die Thoraxwand geführt und anschließend in einer Hauttasche deponiert (s. Abbildung 4D).

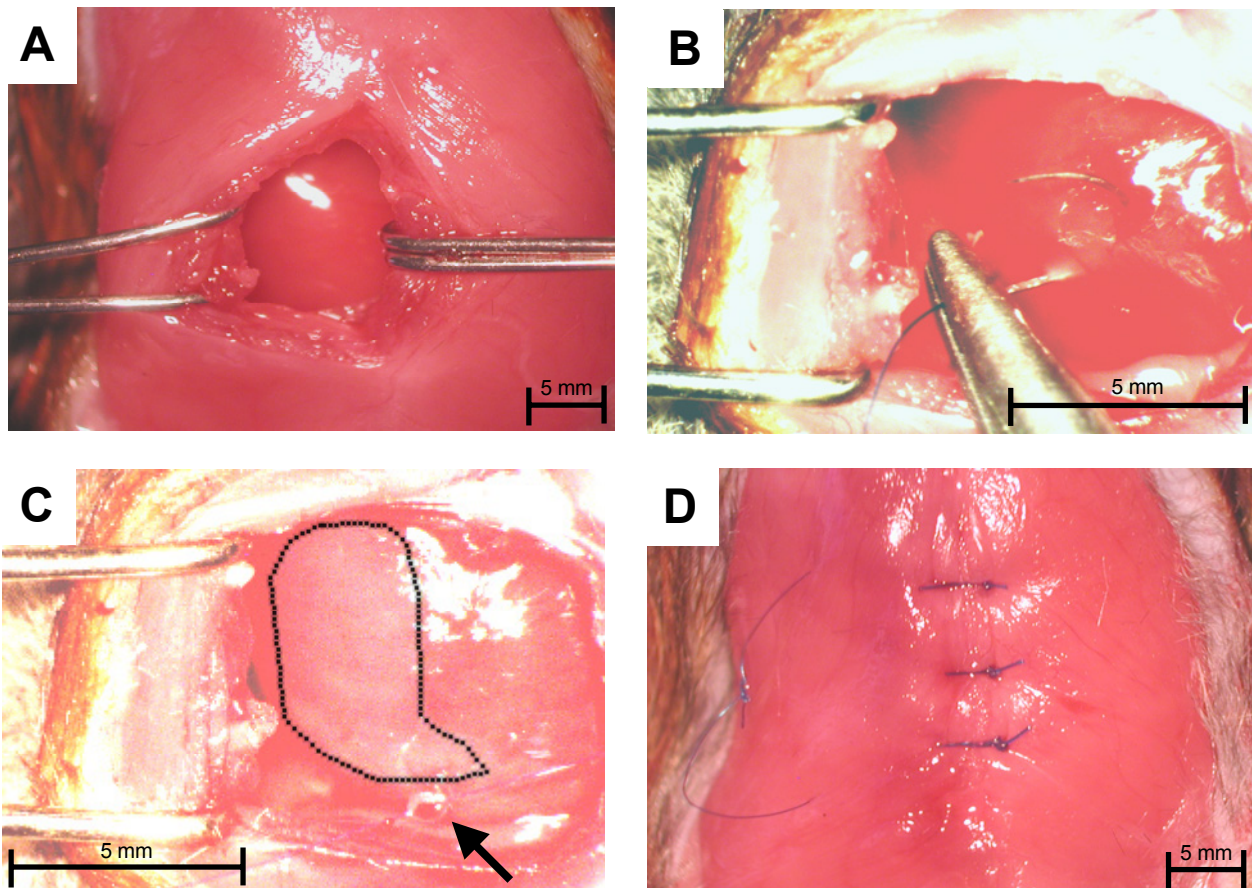


Abb. 4: Die verschiedenen Phasen der Initialoperation: **A:** Einsetzen der Thoraxspanner **B:** Setzen des Ligaturfadens um die LAD **C:** Okklusionstest nach Einfädeln durch den Okkluder (s. Pfeil); Blässe des Myokards distal der Okklusionsstelle (umfahrenes Gebiet) **D:** Verschluss des Thorax mit lateraler Ausführung des Ligaturfadens

Vor dem Verschluss der Thoraxwand (6-0-Prolene, atraumatisch, Ethicon, Norderstedt) wurde die Lunge gebläht, um einem Pneumothorax vorzubeugen (s. Abbildung 4D). Nach Hautverschluss (4-0 Vicryl, Spatula, Ethicon) und Spontanisierung der Atmung wurde die Narkose beendet und die Maus nach Wiederherstellung der Schutzreflexe extubiert.

2.3 Ischämie- und Reperusionsprotokoll

Nach einer 5 bis 7-tägigen Erholung von der Initial-OP begann das I/R-Protokoll. Hierzu wurde den Mäusen initial 0,1 mg/g Körpergewicht Propofol (Disoprivan® 1%, Astra Zeneca, Wedel) intraperitoneal injiziert. Die Spontanatmung blieb hierbei erhalten.

Die Maus wurde auf dem Rücken liegend auf der Wärmeplatte fixiert, ein EKG abgeleitet und die Körpertemperatur rektal kontrolliert. In zahlreichen Publikationen wurde die Körpertemperatur als eine Hauptdeterminante der Infarktgröße (Chien et al., 1994; Duncker et al., 1996; Hale and Kloner, 1997) beschrieben. Nach Wiedereröffnen des Hautschnitts wurde der Faden in der Hauttasche mobilisiert und Zug auf ihn ausgeübt (s. Abbildung 5), bis im EKG eine ST-Hebung als Folge der myokardialen Ischämie zu sehen war. Das EKG wurde vor, während und nach Okklusion dieser LAD-Ligatur aufgezeichnet. Nach Durchführung des I/R-Protokolls wurde die Haut dann mit einer fortlaufenden Hautnaht verschlossen (4-0 Vicryl, Spatula, Ethicon).

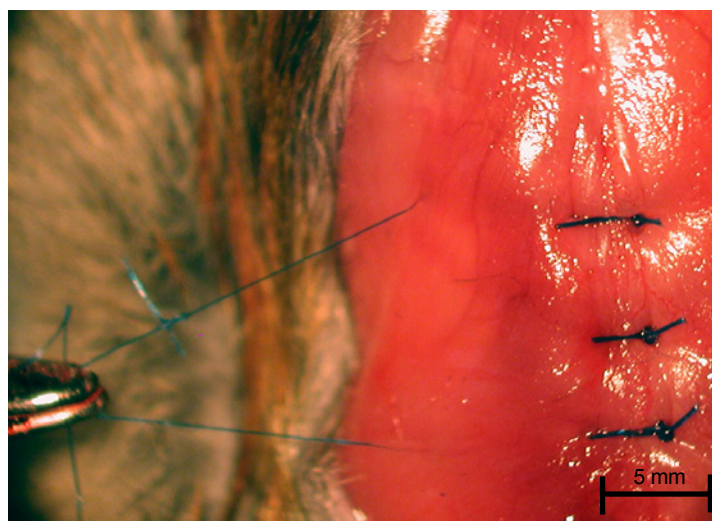


Abb. 5: Ischämie im „closed-chest“-Modell durch Zug am Ligaturfaden.

2.4 Histologie

Die Färbung bestand im Wesentlichen aus zwei Teilen: Zum Einem diente das TTC (Triphenyltetrazoliumchlorid)-Staining der Abgrenzung des infarzierten von nicht infarziertem Gewebe; zum Anderen musste eine Unterscheidung des Myokards, das zur Zeit der Okklusion ischämisch war (AAR = „area-at-risk“) und dem weiterhin perfundierten Myokard (NAAR = „non-area-at-risk“) gewährleistet sein. Dies erfolgte durch erneute Okklusion kurz vor Applikation eines blauen Farbstoffes, der die AAR aussparte.

Zur Färbung des ischämischen und reperfundierten Herzens folgten wir verschiedenen in der Literatur beschriebenen Färbeprotokollen. Als Vorlage diente uns zunächst ein Protokoll von Guo et al. (Guo et al., 1998), das nach einer 30-minütigen Okklusionsphase eine 24-stündige Reperfusion vorsieht. Den Mäusen wurde 1 Einheit Heparin /g Körpergewicht intraperitoneal gegeben, bevor sie mit Isofluran narkotisiert wurden. Nach Intubation wurde ein intravenöser KCl-Bolus appliziert, woraufhin der Herzschlag sistierte. Das Herz wurde exzidiert und per Langendorff-Perfusion retrograd über die Aorta mit Krebs-Henseleit-Puffer (KHB, Zusammensetzung: NaCl 116 mmol/l, KCl 4,63 mmol/l, KH_2PO_4 1,18 mmol/l, MgSO_4 1,1 mmol/l, NaHCO_3 24,9 mmol/l, Glucose Monohydrat 8,32 mmol/l, Pyruvat 2,0 mmol/l, CaCl_2 2,52 mmol/l) und 1%iger TTC-Lösung in Phosphatpuffer perfundiert. Anschließend wurde nach Okklusion der LAD mit 5%igem „phthalo-blue“ (Heucotech, Fairless Hill, PA, USA) in physiologischer Kochsalzlösung perfundiert. Zur Verbesserung der Farbstoffperfusion wurde in einer Versuchreihe der TTC-Lösung der Ca^{2+} -Chelator EGTA („ethylene glycol tetraacetic acid“) in einer Konzentration von 2mmol/l hinzugefügt. Im Vergleich zu der in-vitro-Färbung an der Langendorff-Apparatur wurde auch eine TTC-Färbung am Gewebsschnitt getestet: Die Herzen wurden zuerst mit KHB und nach Okklusion der LAD mit „phthalo-blue“ an der Langendorff-Apparatur perfundiert. Anschließend wurden die Herzen in 1 mm dicke Gewebsscheiben geschnitten und 15 Minuten in 2%igem TTC inkubiert, wie bei Takano beschrieben (Takano et al., 2000). Aufgrund minimaler Infarktareale, erhöhten wir die Okklusionszeit von 30 Minuten auf 60 Minuten.

Letztlich verwandten wir ein Färbeprotokoll ohne Langendorff-Perfusion, das im Folgenden näher dargelegt wird. Nach der auf die 60-minütige Ischämie folgenden 24-stündigen Reperfusionphase des I/R-Protokolls wurden die Mäuse mit Isofluran

narkotisiert und intubiert. Anschließend wurde eine mediane Laparotomie durchgeführt und das Diaphragma in seiner gesamten Zirkumferenz durchtrennt. Um gute Sicht auf das Herz zu erlangen, wurde eine beidseitige parasternale Thorakotomie durchgeführt und die Thoraxvorderwand mobilisiert. Die Fadenenden der LAD-Ligatur wurden von innen durch die Thoraxwand gezogen und die LAD durch einen Knoten jetzt irreversibel verschlossen. Das Versorgungsgebiet der LAD, welches distal der Okklusionsstelle lag und somit nicht mehr perfundiert wurde, entspricht der „area-at-risk“ (AAR). Das weiterhin perfundierte Areal entspricht der „non-area-at-risk“ (NAAR). Um es zu markieren, wurden 0,5 ml einer 5-prozentigen „phthalo-blue“-Lösung in den linken Vorhof injiziert. Der Farbstoff gelangte durch die Aktivität des Herzens in den linken Ventrikel und schließlich in Aorta und Koronarien und somit in das noch perfundierte Myokard. Das Herz wurde entnommen, sobald eine klare Abgrenzung der durch die „phthalo-blue“-Lösung blau gefärbten NAAR von der hierdurch nicht gefärbten AAR möglich war (s. Abbildung 6). Um Blut und Färbemittelreste aus den Ventrikeln und Vorhöfen zu spülen, wurde das sich

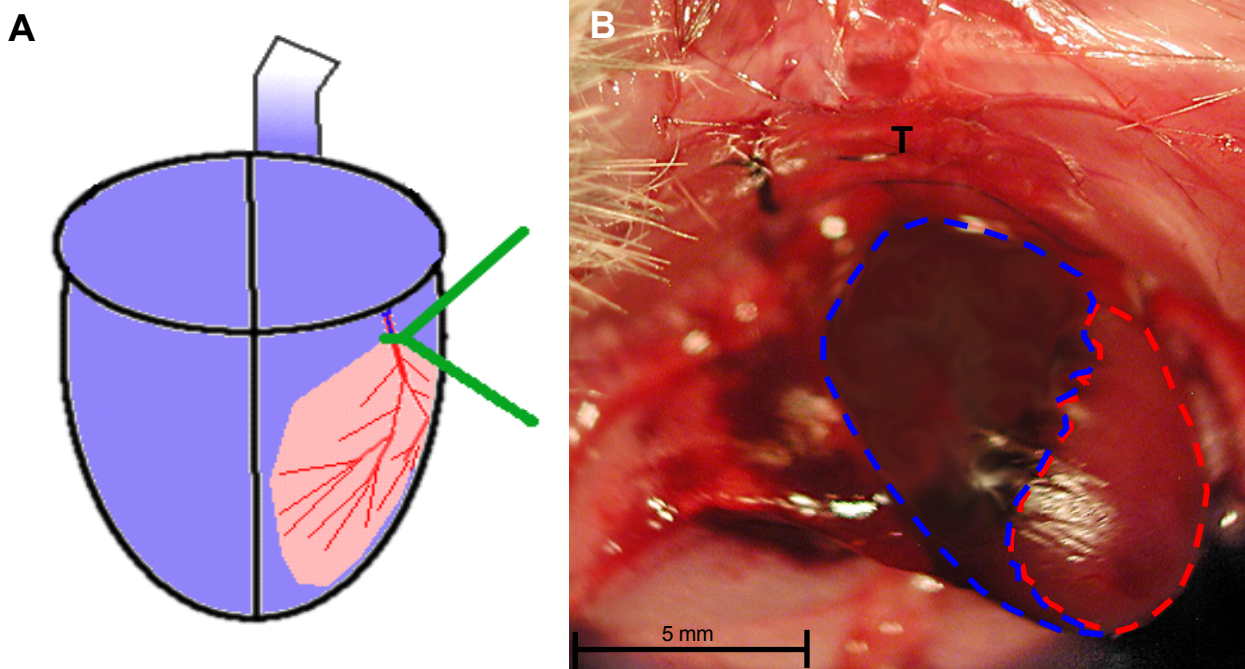


Abb. 6: Injektion von „Evans Blue“ bei okkludierter LAD mit Unterscheidung der NAAR (blau gefärbt) von der AAR (rot); **A:** Modell: grün: Okklusionsfaden, rot: LAD **B:** AAR: rot umfahrene apikale Aussparung der Blaufärbung (mit Lichtreflex als Artefakt); NAAR und Vorhof als blaugefärbtes Gewebe (blau umfahren); T: aufgeklappte Thoraxvorderwand.

noch kontrahierende Herz in eine Petrischale mit KHB-Puffer gegeben. Daraufhin wurden das atriale Myokard sowie der rechte Ventrikel abgetrennt. Um das anschließende Schneiden des Herzens zu ermöglichen, wurde das Herz für eine Minute in Isopentan, gekühlt durch flüssigen Stickstoff, schockgefroren. Mittels eines Kardiotoms wurden durch das gefrorene Herz 5 bis 7 parallel zur Klappenebene liegende Schnittebenen gelegt. Diese 1 mm dicken Gewebsschnitte wurden 20 Minuten in einer 1,5%igen TTC-Lösung (2,3,5 Triphenyltetrazoliumchlorid, Sigma-Aldrich-Chemie, Steinheim) bei 37°C inkubiert. TTC bewirkt eine intensive Rotfärbung des vitalen Myokards, wodurch das infarzierte Myokard als ungefärbte Fläche ausgespart wird. Um ein direktes Aufliegen der Schnitte auf dem Boden der Petrischale und somit eine insuffiziente Färbung zu vermeiden, wurden sie zwischen Whatman-Filterpapier gelegt.

Zur Fixierung wurden die Gewebeschnitte schließlich in 4%ige Formalinlösung eingelegt. Nach 30-minütiger Fixierung wurden die Schnitte zwischen zwei Objektträger gelegt, die durch Glasplättchen einen konstanten Abstand von 1 mm einhielten. Nach Anschließen einer digitalen Kamera (Olympus Camedia 3030) an das OP Mikroskop konnten die Schnitte einzeln und von beiden Seiten fotografiert werden (s. Abbildung 7A). Die

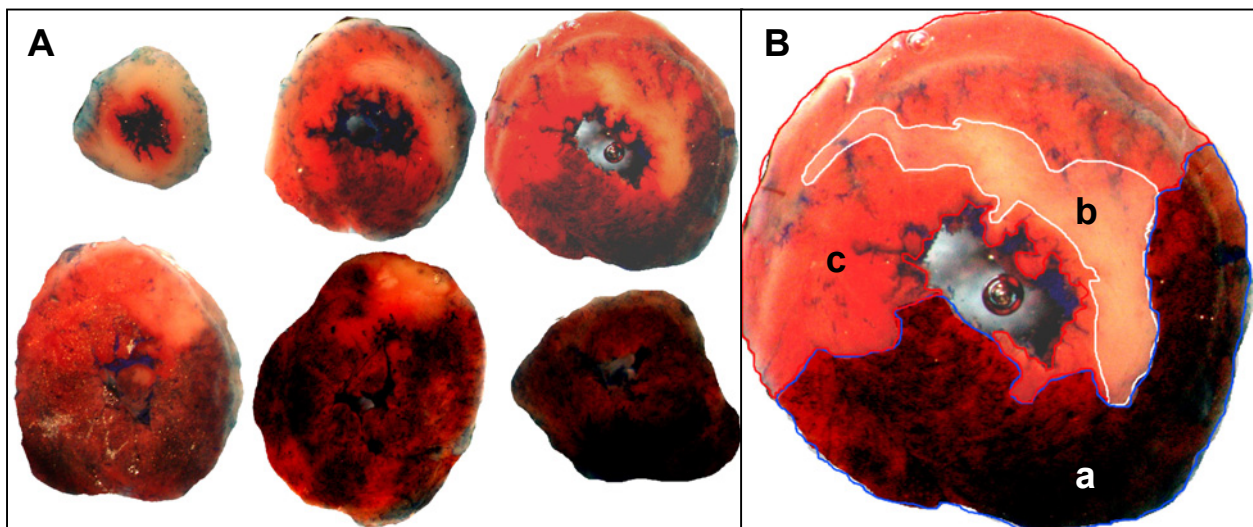


Abb. 7: **A** Horizontale Gewebeschnitte des linken Ventrikels nach erfolgter Färbung; links oben apikaler Schnitt, dann nach basal fortschreitend. **B** Vergrößerter Einzelschnitt zur Darstellung der Abgrenzung von „non-area-at-risk (blaues Areal:a), Infarktgewebe (weisses Areal: b) und „area-at-risk“ (weisse und rote Areale: b+c).

gespeicherten Bilder zeigten klar abgrenzbare Areale auf den Gewebeschnitten. Das bei LAD-Okklusion infundierte „phthalo-blue“ verteilte sich im gesamten Myokard, welches durch die Okklusion der LAD nicht betroffen war (NAAR, s. Abbildung 7Ba). Das nicht blau gefärbte Gewebe wurde als AAR (s. Abbildung 7Bb+c) deklariert. In diesem Gebiet ließ sich das vom TTC rötlich gefärbte, vitale Gewebe (s. Abbildung 7Bc) von dem weiterhin ungefärbten, weil infarzierten Myokard (s. Abbildung 7Bb), unterscheiden.

Die Bilder wurden kalibriert und ihre Auswertung erfolgte nach dem Prinzip des Blindversuchs. Anhand von ImageJ 1.30v (National Institute of Health, USA) konnten die Areale umfahren und die eingeschlossene Fläche berechnet werden. Die Gewebeschnitte wurden zwecks Mittelwertbildung jeweils von beiden Seiten ausgemessen. Aufgrund der festgelegten Dicke der Gewebeschnitte von 1mm konnten die jeweils ermittelten Werte von AAR, NAAR und Infarktgebiet addiert werden und anschließend ins Verhältnis gesetzt werden. Dabei handelt es sich um Volumenverhältnisse, die sich auf die gesamte Muskelmasse des linken Ventrikels beziehen. Obwohl es sich also um Volumenverhältnisse handelt, übernahmen wir die in der Literatur üblichen Begriffe AAR, NAAR und Infarktareal (Guo et al., 1998; Ito et al., 1997; Michael et al., 1995). Die Größe des Infarktes wurde kalkuliert als Anteil der AAR in Prozent.

2.5 Statistik

Alle Daten wurden als Mittelwert (MW) und Standardfehler des Mittelwerts (SEM) dargestellt. Die Unterschiede zwischen den Gruppen wurden mit einem Student-t-Test überprüft und das Signifikanzniveau mit $p < 0,05$ angenommen.

3. Ergebnisse

Für die Entwicklung der Methode wurden im Vorfeld der endgültig in die Statistik aufgenommenen Versuchstiere 185 Mäuse operiert, von denen 112 die Implantation des Ligaturfadens und die Reperfusionphase überlebten. Ein 30-minütiges Ischämieintervall überlebten 43 von 53 (81%) Versuchstieren, während nur 40 von 59 (68%) die 60-minütige Ischämie überstanden. Nachdem die Methodik etabliert war, wurden zusätzlich 62 Tiere operiert, die in die Auswertung aufgenommen wurden (s. auch Kapitel 3.3, Tabelle 1).

3.1 OP

Aufgrund der Größe der Mäuse war mit anästhesiologischen Komplikationen während des Versuchs gerechnet worden. Die Intubation unter visueller Kontrolle der Trachea beim Ersteingriff erwies sich als weniger schwierig als erwartet. Hingegen waren die Auswahl, Steuerung und Applikation der Narkotika sehr komplex.

Bei dem hier etablierten Modell der Ischämie/Reperfusion waren zwei verschiedene operative Eingriffe notwendig. Während der Instrumentierung mussten die Mäuse intubiert und in tiefer Narkose gehalten werden, um den Thorax eröffnen zu können. Zu Beginn der Versuchsreihe wurde mit einer intraperitonealen Applikation von Xylazin (0,05-0,1 mg/g Körpergewicht) und Ketanest S (0,1 mg/g Körpergewicht) gearbeitet. Unter einer für die Operation ausreichenden Narkose zeigten sich deutliche Bradykardien. Außerdem war ein schnelles An- und Abfluten dieser Anästhetika nicht gegeben, so dass die Einleitung sehr zeitintensiv und die postoperative Phase durch Narkoseüberhang kritisch war. Somit war ein Narkotikum notwendig, das schnell an- und abflutet, gut steuerbar ist und gewisse analgetische Wirkungen hat. Diese Eigenschaften vereinen die meisten volatilen Anästhetika. Da Isofluran auch im klinischen Alltag häufig verwandt wird und damit bei den Operateuren eine gewisse Erfahrung im Umgang mit Isofluran vorlag, wurde dieses Narkosegas getestet. Zur Narkoseeinleitung wurde eine inspiratorische Isoflurankonzentration von 2,5% eingestellt, im weiteren Verlauf der Operation konnte auf

Werte zwischen 1,5% und 2,0% reduziert werden. Diese Werte richten sich nach der MAC_{50} von Isofluran, die beim Menschen 1,2% beträgt. Die MAC_{50} ist per definitionem die minimale alveoläre Konzentration, bei der 50% der Patienten keine Reaktion auf einen Hautschnitt mehr zeigen.

Bei der Induktion des Infarktes musste die Narkose dem komplizierten Anspruch gerecht werden, die Tiere in tiefer Narkose zu halten, die Spontanatmung allerdings weiterhin zu ermöglichen. Weiterhin war die Auswahl des Narkotikums bei der Induktion des Infarktes limitiert, da sowohl die volatilen Anästhetika als auch Xylazin/Ketanest präkonditionierende Effekte aufweisen. Deshalb wurde Propofol ausgewählt. Im Gegensatz zu Xylazin/Ketanest hatte Propofol nur eine geringere dämpfende Wirkung auf die Herzfrequenz. Diese wurde bei den C3H/HeN-Tieren etwas stärker verringert als die der C3H/HeJ-Tiere (vgl. Diagramm 1). Diese Beobachtung wird in Kapitel 3.3 genauer besprochen.

Die intraperitoneale Applikation von Propofol stellte ein großes Problem dar, da nur ein langsames und unsicheres An- und Abfluten des Hypnotikums erreicht werden konnte. Während beim Menschen zur Narkoseeinleitung eine Dosis von 1-2 mg/kg Körpergewicht intravenös gegeben wird, musste den Mäusen Propofol intraperitoneal verabreicht werden. Ein langsames Titrieren und Herantasten an die optimale Dosis war notwendig, schließlich wurden als Initialdosis 100 mg/kg und bei Nachinjektion 30 mg/kg Körpergewicht gegeben. Diese deutlich höhere Dosis war vonnöten, um die Versuchstiere suffizient zu narkotisieren, hatte allerdings häufig eine Ateminsuffizienz mit Versterben der Maus zur Folge.

Das „closed-chest“-Modell der I/R wurde von Nossuli et al. (2000) übernommen. Komplikationen bei der Primäroperation wie Verletzung der A. mammaria oder anderer Gefäße, die Verletzung des Herzens beim Setzen des Ligaturfadens oder auch ein Pneumothorax konnten schnell minimiert werden. Die Überlebensrate dieses intrathorakalen Eingriffes war sehr hoch und die Mäuse erholten sich während der fünf Tage nach der Operation fast vollständig. Das Setzen der Infarkte wurde anhand der ST-Hebung im EKG verifiziert und war reproduzierbar, nur vereinzelt traten ventrikuläre Arrhythmien als Todesursache auf. Nicht differenziert werden konnte zwischen den übrigen Todesursachen wie Propofol-Überdosierungen oder Herzinsuffizienz.

3.2 Auswertung

Nach Beherrschung der Operationstechnik widmeten wir uns vermehrt dem Färbeprotokoll. Zunächst diente uns das Protokoll von Guo et al. (1998) als Vorlage, das nach einer 30-minütigen Okklusionsphase eine 24-stündige Reperfusion vorsah. Bei diesem Modell erhielten die Mäuse Heparin und nach Narkotisierung wurde mit einem intravenösen KCl-Bolus ein Herzstillstand herbeigeführt. Anschließend wurde das Herz exzidiert und per Langendorff-Perfusion mit Krebs-Henseleit-Puffer (KHB) und einer TTC-Phosphatpuffer-Lösung durchspült. Nach Verschluss der noch implantierten Ligatur wurde schließlich mit „phthalo-blue“ perfundiert. Während der Perfusion mit TTC trat in unserem Modell allerdings regelmäßig eine Kontraktur auf, die eine weitere Perfusion und damit Färbung unmöglich machte. Um einer Kontraktur vorzubeugen, verwandten wir in einem folgenden Schritt eine TTC-EGTA-Lösung. Leider zeigte sich auch bei diesem Versuchsaufbau eine Kontraktur des Myokards.

Aus diesem Grunde änderten wir das Procedere: Die Herzen wurden per Langendorff-Anlage mit KHB und nach Verschluss der Ligatur mit „phthalo-blue“ perfundiert. Anschließend wurde das Herz in Gewebsscheiben geschnitten und 15 Minuten in TTC inkubiert. Obwohl dieses Verfahren bei Gelingen eine gute Abgrenzung der AAR/NAAR ermöglichte, war es aufgrund seiner geringen Erfolgsrate nicht ideal. Von 63 Herzen konnten nur 7 erfolgreich gefärbt werden, die restlichen zeigten keine ausreichende Abgrenzung AAR/NAAR, kein Infarktgebiet oder aber waren aufgrund der Präparation nicht weiter verwertbar. Da die Färbungen bei uns nach dem genannten Protokoll nur minimale Infarktareale zeigten, erhöhten wir die Okklusionszeit von 30 Minuten auf eine Stunde wie bei Takano et al. (2000).

Um die Erfolgsrate zu erhöhen, wurde ein Verfahren ohne die technisch aufwendige Langendorff-Perfusion getestet. Dabei wurde „phthalo-blue“ nach Verschluss der Ligatur in vivo in den linken Vorhof gespritzt, anschließend das Herz exzidiert, eingefroren in Gewebsscheiben geschnitten und in TTC-Lösung inkubiert. Allerdings war auch diese Färbung sehr komplex, so musste beim narkotisierten Tier der Brustkorb eröffnet werden, die Adhäsionen gelöst, der Ligaturfaden erneut verschlossen und TTC in den linken

Vorhof injiziert werden. Zunächst war die Erfolgsrate auch bei diesem Verfahren gering, jedoch konnte sie im Laufe der Studie auf nahezu 90% gesteigert werden.

3.3. Experimenteller Erfolg

Die erfolgreiche Induktion einer Ischämie wurde an Hand einer simultanen EKG-Aufzeichnung überprüft. Das EKG vor der Okklusion entspricht dem normalen Maus-EKG (s. Abbildung 8A). Aufgrund des schnelleren Ablaufs des Aktionspotentials und der deutlich höheren Herzfrequenz bei Mäusen gestaltet sich die Morphologie von QRS-Komplex und T-Welle beim Mäuseherzen anders als beim Menschen.

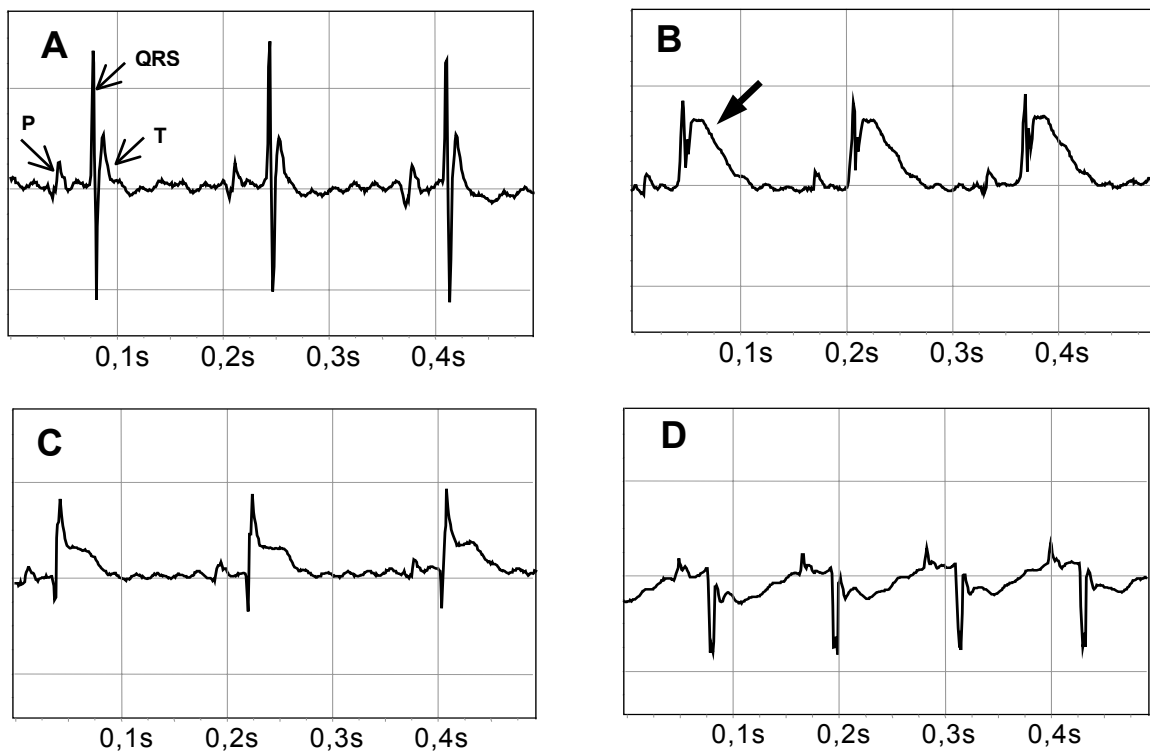


Abb. 8: EKG: Ableitung II nach Einthoven zu verschiedenen Zeitpunkten des I/R-Protokolls: **A** normales EKG vor Okklusion; **B** ST-Elevation (Pfeil) zu Beginn der Okklusion und **C** kurz nach Okklusionsende; **D** ST-Negativierung als Zeichen eines abgelaufenen Infarktes 24h nach Okklusionsende.

Trotz Hintergrundrauschens erkennt man jedoch deutlich die P-Welle, den QRS-Komplex und schließlich die direkt dem QRS-Komplex folgende T-Welle. Kurz nach Beginn der Ischämie durch LAD-Okklusion war eine deutliche ST-Hebung sichtbar (8B), die während der gesamten 60-minütigen Okklusion fortbestand. Eine erfolgreiche Reperfusion wurde im EKG durch eine Verringerung der ST-Strecken-Hebung bestätigt (8C). Nach 24-stündiger Reperfusion war im EKG eine ST-Senkung zu erkennen (8D), was dem Bild eines abgelaufenen Infarktes entspricht.

Aus den EKG-Ableitungen wurde die Herzfrequenz bestimmt. Im Vorfeld der Ischämie hatten WT-Mäuse eine signifikant niedrigere Herzfrequenz ($371,5 \pm 21,9$ / Minute) als TLR4-hypo-responsive Mäuse ($459,3 \pm 18,6$ / Minute).

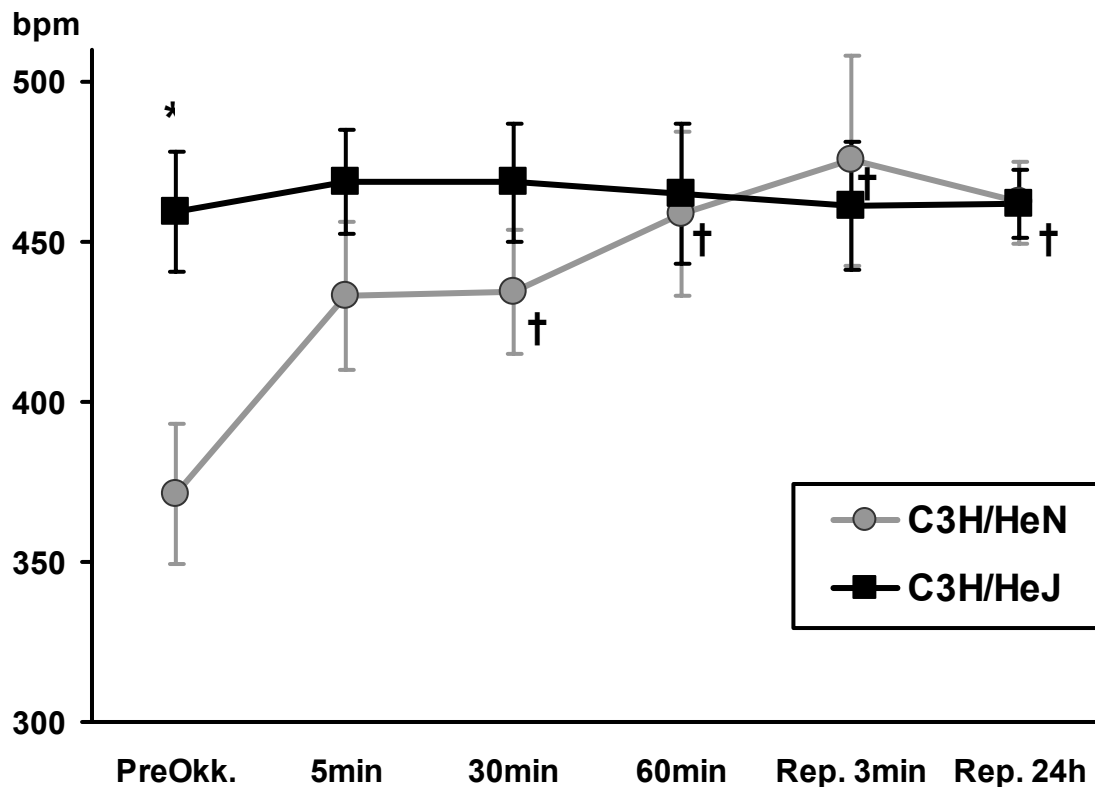


Diagramm 1: Herzfrequenz / Minute (bpm) der narkotisierten Mäuse vor (PreOkk), während (5min – 60min) und nach der Ischämie durch LAD-Okklusion (Rep. 3min – 24h). Darstellung als Mittelwert \pm Standardfehler. C3H/HeN = Wildtypmäuse, C3H/HeJ = TLR4-hypo-responsive Mäuse. Messung Reperfusion 24h unter Propofol, ansonsten unter Isofluran.

* : $p < 0,05$ C3H/HeN vs. C3H/HeJ, † : $p < 0,05$ PreOkk vs. späterer Zeitpunkt bei C3H/HeN.

Während der Ischämiephase stieg die Herzfrequenz der WT-Mäuse schnell an und erreichte das Niveau der C3H/HeJ-Tiere. Daher hatten die C3H/HeN-Tiere nach 30 und 60 Minuten Okklusion ($434,4 \pm 19,3$ / Minute und $458,9 \pm 25,8$ / Minute) und während der Reperfusionphase (nach 3 Minuten: $475,5 \pm 32,9$ /Minute und nach 24 Stunden: $462,3 \pm 12,6$ /Minute) signifikante Erhöhungen der Herzfrequenz. Dieser Anstieg der Herzfrequenz war bei C3H/HeJ-Mäusen nicht nachweisbar (s. Diagramm 1).

Während I/R zeigte sich eine erhöhte Überlebensrate der C3H/HeJ-Tiere (s. Tab. 1). 18 der 25 dem I/R-Protokoll unterzogenen TLR4-hyporesponsiven Mäuse (72%) überlebten die Prozedur, während dies bei den Wildtypmäusen nur 15 von 31 (48%) waren. Bei der Initialoperation starben 4 WT-Tiere und 2 TLR4-hyporesponsive Mäuse, die somit dem I/R-Protokoll nicht unterzogen wurden.

	C3H/HeN	C3H/HeJ
intraoperativ gestorben	4	2
während Ischämie gestorben	14	7
bei Reperfusion gestorben	2	0
nicht verwertbar	3	1
verwertbar	12	17
gesamt	35	27

Tabelle 1: Von 35 verwendeten Wildtypmäusen (C3H/HeN) konnten nur 12 planimetrisch ausgewertet werden. Bei 17 von 27 TLR4-hyporesponsiven Mäusen (C3H/HeJ) konnte die Planimetrie erfolgreich durchgeführt werden.

Auch die Infarktgröße der C3H/HeJ-Mäuse nach dem I/R-Protokoll war im Vergleich zu den C3H/HeN-Mäusen signifikant reduziert (s. Diagramm 2 und Tabelle 2). Bei C3H/HeN-Mäusen zeigte sich eine Infarktgröße von $50,69\% \pm 7,02\%$ der AAR. Die C3H/HeJ-Mäuse wiesen mit $30,13\% \pm 4,81\%$ der AAR eine im Vergleich deutlich geringere Infarktgröße auf ($p < 0,05$). Die Größe der AAR bei den zwei Mausgruppen war nicht unterschiedlich. Bei C3H/HeN-Mäusen belief sie sich auf $46,28\% \pm 1,96\%$ und bei C3H/HeJ-Mäusen auf $42,57\% \pm 1,74\%$ des linken Ventrikels.

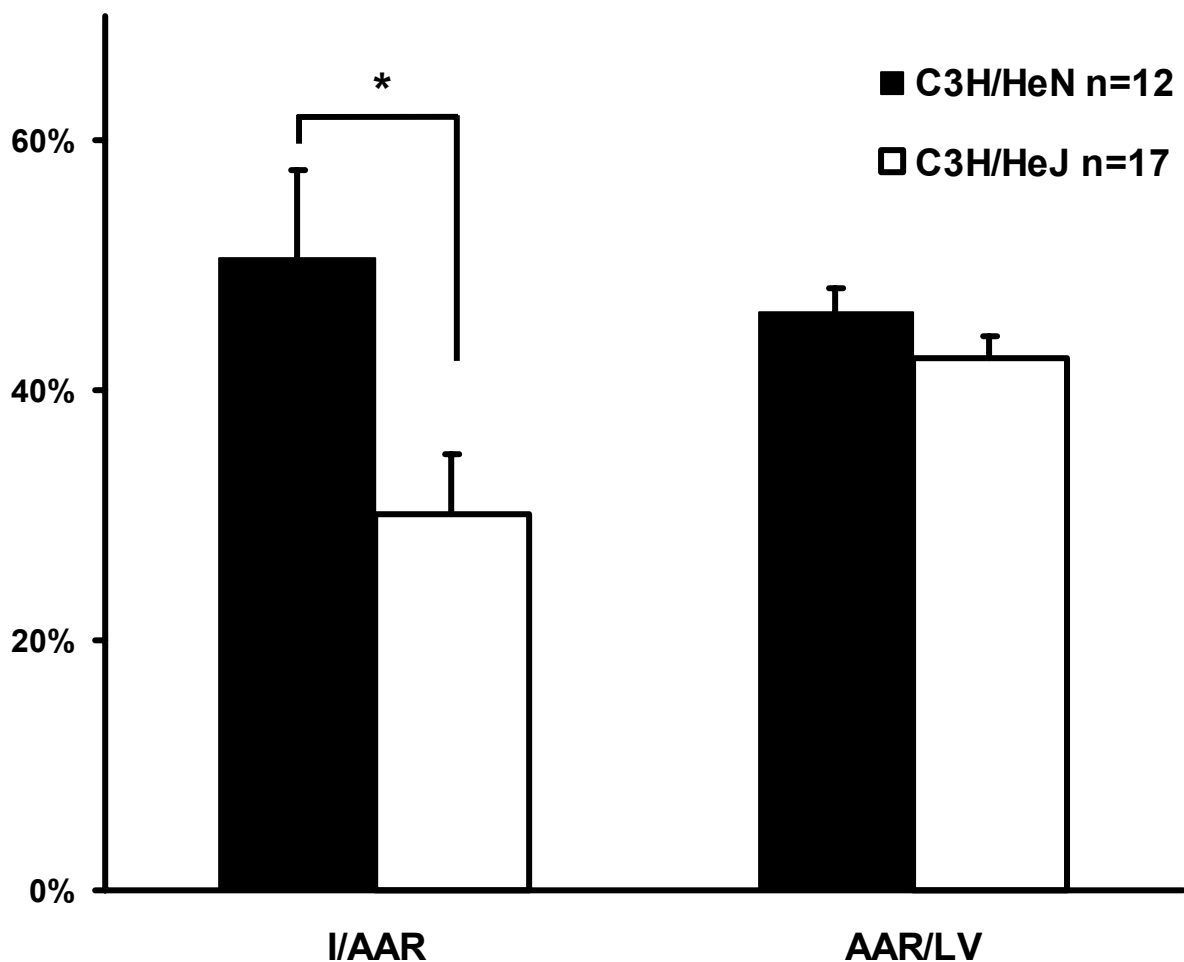


Diagramm 2: Ergebnisse der Planimetrie als Mittelwert \pm Standardfehler in prozentualen Anteilen: I/AAR und AAR/LV (I = Infarkt, LV = Linker Ventrikel, AAR = „area-at-risk“), * $p < 0,05$. C3H/HeN = Wildtypmäuse, C3H/HeJ = TLR4-hyporesponsive Mäuse (s. Tabelle 1)

	AAR/LV		I/AAR	
	C3H/HeN	C3H/HeJ	C3H/HeN	C3H/HeJ
1	44,11	52,63	16,97	59,20
2	53,36	49,19	29,76	1,45
3	43,59	33,69	87,60	18,95
4	56,17	33,03	42,70	31,50
5	37,33	50,04	75,84	40,81
6	54,58	40,96	47,74	39,90
7	35,86	42,22	57,90	28,79
8	55,92	41,02	54,14	2,22
9	45,53	54,29	46,67	58,56
10	43,33	36,81	16,76	3,61
11	41,18	36,73	42,05	22,99
12	44,42	35,61	90,17	15,11
13		39,55		15,83
14		39,31		40,24
15		43,87		61,36
16		55,37		22,27
17		39,37		49,45
mean	46,28	42,57	50,69	30,13
sd	7,07	7,18	24,32	19,83
sem	1,96	1,74	7,02	4,81
t-test	0,1789		0,0186	

Tabelle 2: Planimetrie: Messung der gefärbten Gewebsanteile in Prozent. Dargestellt sind die Diagramm 2 zugrundeliegenden Zahlenwerte.

C3H/HeN: Wildtypmäuse, C3H/HeJ:TLR4-hyporesponsive Mäuse, I: Infarktgewebe, LV: Linker Ventrikel, AAR: „area at risk“, mean: Mittelwert, sd: Standardabweichung, sem: Standardfehler, t-test: Student-t-Test zwischen C3H/HeN und C3H/HeJ.

4. Diskussion

Neuere Untersuchungen zeigen, dass das angeborene Immunsystem einen entscheidenden Einfluss auf die Infarktgröße nach I/R hat. Die Toll-Like-Rezeptoren, eine kürzlich beschriebene und charakterisierte Gruppe der Muster erkennenden Rezeptoren, spielen dabei eine besondere Rolle (Brown et al., 1989; Elliott, 1998). Von diesen Rezeptoren sind TLR2 und TLR4 am besten untersucht. Shisido et al. haben gezeigt, dass TLR2 die myokardiale Funktion nach einem I/R-Schaden moduliert. Bei TLR2-defizienten Mäusen bleibt nach myokardialer I/R die Herzfunktion besser erhalten und die Überlebensrate ist höher (Shishido et al., 2003).

Die Daten unserer Arbeit veranschaulichen, dass es in TLR4-hyporesponsiven (C3H/HeJ) Mäusen nach I/R zu einem reduzierten Myokardinfarkt kommt. Nach Etablierung der Methode konnten wir die Daten von Oyama et al. (2004) bestätigen, nach denen TLR4-hyporesponsive Tiere geringere Infarktareale nach I/R aufweisen. Obwohl das „TTC-Staining“ als Goldstandard für die Erfassung von Infarktgröße, AAR und NAAR gilt, waren zahlreiche Modifikationen notwendig, um eine suffiziente Färbung zu gewährleisten.

Ähnlich wie Shisido et al. an TLR2-defizienten Mäusen zeigten, konnten wir an C3H/HeJ-Tieren eine erhöhte Überlebensrate im Vergleich zu Wildtypmäusen feststellen. Während Ischämie und Reperfusion zeigten sich keine Herzfrequenzunterschiede zwischen C3H/HeJ- und C3H/HeN-Mäusen. Die signifikant geringere Herzfrequenz im Vorfeld der Untersuchungen und der signifikante Anstieg der Herzfrequenz während Ischämie und Reperfusion bei C3H/HeN-Tieren wird im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter untersucht, könnte allerdings auch eine Auswirkung auf die Ausdehnung des induzierten Infarktes haben.

TLR4 wird nicht nur auf Zellen des Immunsystems, sondern auch auf koronaren Endothelzellen und Kardiomyozyten exprimiert (Frantz et al., 1999; Zeuke et al., 2002) und ist für die Signaltransduktion von LPS verantwortlich (Poltorak et al., 1998b). Es gibt verschiedene Hinweise dafür, dass TLR4 außerdem die Antwort des Immunsystems auf Stimuli, wie z.B. HSP 60, HSP 70, Fibrinogenpeptide, Hyaluronsäure und Fibronectin in Abwesenheit einer Infektion vermittelt. Diese werden durch Oxidativen Stress und Gewebsschaden (z.B. durch Ischämie oder Hitze) induziert. Eine wichtige Gruppe dieser

Stimulatoren sind die gerade genannten Hitzeschockproteine (HSP), die eine Chaperonfunktion besitzen, also in Faltung und Transport von Proteinen involviert sind (Ohtsuka and Hata, 2000). HSP 60 wird unter anderem von Kardiomyozyten, die ischämischem Stress ausgesetzt sind, vermehrt exprimiert und freigesetzt (Schett et al., 1999). Es induziert eine Reaktion ähnlich der, wie sie durch LPS vermittelt wird. HSP 60 kann an TLR4 binden und zu einer Aktivierung von Makrophagen beitragen, was wiederum zu einer erhöhten Produktion von NO und Zytokinen wie IL-12, IL-15, TNF und IL-6 führt (Chen et al., 1999). Ähnlich wie HSP 60 wird HSP 70 ebenfalls durch myokardiale Ischämie freigesetzt (Jaattela, 1999). Außerdem zeigen neuere Studien, dass endogenes HSP 70 den TLR4-Signaltransduktionsweg in einer ähnlichen Weise stimuliert wie HSP 60 (Dybdahl et al., 2002; Vabulas et al., 2002). Allerdings spielt HSP auch in der Präkonditionierung eine Rolle und kann somit - gegensätzlich zum bisher gesagten - kardioprotektiv wirken. So kann eine vermehrte Expression von HSP 70 im Vorfeld eines I/R-Ereignisses das Myokard und seine Funktion vor diesem I/R-Schaden im Sinne einer Präkonditionierung schützen (Jayakumar et al., 2001). Auch HSP 20 zeigt diese präkonditionierenden Effekte (Fan, G. C. et al., 2005), allerdings gibt es noch keine Untersuchungen zum Zusammenhang zwischen TLR4 und HSP 20. Limitierend muss hinzugefügt werden, dass der experimentell kardioprotektive Einfluss von HSP im Sinne einer Präkonditionierung von einigen Autoren allerdings auch darauf zurückgeführt wird, dass HSP mit LPS verunreinigt sein könnte (Tsan and Gao, 2004).

Fibrinogen ist ein weiterer Stimulator, der bei Gewebsschäden freigesetzt und in den Inflammationsarealen durch eine Retraktion der Endothelzellen in das extravasale Kompartiment verschoben wird (Dvorak et al., 1985). Dort aktiviert Fibrinogen die Chemokinproduktion und -sekretion in Makrophagen über den TLR4-Signaltransduktionsweg und wirkt somit chemotaktisch auf T-Zellen, Neutrophile und weitere Makrophagen (Smiley et al., 2001). Auch niedermolekulare Oligosaccharide, die Degradationsprodukte der Hyaluronsäure sind, stellen potentielle Liganden des TLR4 dar. Diese Oligosaccharide treten während einer Entzündungsreaktion auf und aktivieren immunkompetente Zellen wie Makrophagen oder Dendritische Zellen (Termeer et al., 2002). Weiterhin kann zelluläres Fibronectin, welches als Antwort auf einen Gewebsschaden gebildet wird, an TLR4 binden und damit eine Immunantwort auslösen (Okamura et al., 2001).

In einem tierexperimentellen Modell myokardialer I/R können die o.g. bei Gewebsschaden freigesetzten Liganden zu einem Reperfusionsschaden führen, wobei wiederum der TLR4-Signaltransduktionsweg eine Rolle spielt. Daraufhin werden Kaskaden induziert, die zu einer Expression proinflammatorischer Mediatoren führen.

Die Bindung der Liganden an TLR4 und der anschließende Signaltransduktionsweg wird in Abbildung 9 näher dargelegt. Die Signaltransduktion von TLR4 ist am Ausführlichsten anhand der LPS-Signaltransduktion untersucht. Nachdem LPS aus der Wand von gramnegativen Bakterien freigesetzt wird (Freudenberg et al., 1991), liegt es in LPS-Multimeren vor, die in dieser Form noch nicht immunstimulierend wirken (Seydel et al., 1993; Takayama et al., 1994). Erst die Bindung des LPS an LBP (Lipoprotein-Bindungsprotein) (Schumann et al., 1994), welches die LPS-Multimere monomerisiert, ermöglicht im Folgenden die LPS-Erkennung (Schumann et al., 1990). Anschließend formen LPS und LBP einen Komplex mit CD14 (Ferrero et al., 1993; Hailman et al., 1994; Knuefermann et al., 2002b; Orr and Tobias, 2000; Tada et al., 2002; Tobias et al., 1995). Obwohl CD14 ein extrazellulärer Rezeptor ist, kann er nicht alleine für die Signaltransduktion von LPS verantwortlich sein, da er nicht über eine transmembranäre Domain verfügt (Wright et al., 1990). TLR4 hingegen besitzt einen transmembranären Teil und formt mit MD-2 einen LPS-Rezeptor-Komplex, an den LPS andocken kann (Miyake, 2004). MD-2 ist ein extrazelluläres Adapterprotein, welches die LPS-Spezifität des TLR4 steigert (Kennedy et al., 2004; Schromm et al., 2001; Visintin et al., 2001).

Nach der Aktivierung des Rezeptorkomplexes, bestehend aus TLR4, MD-2 und CD14, findet eine Konformationsänderung in der intrazellulären TIR (Toll/IL-1)-Region des TLR4 statt. An diese TIR-Domäne binden zwei verschiedene Adaptermolekül-Paare. Man unterscheidet zwischen einem MyD88 („myeloid differentiation factor 88“)-abhängigen und einem MyD88-unabhängigen Transduktionsweg: Beim Letzteren fungieren TRIF („Toll/IL-1R-domain-containing-adaptor-inducing-IFN- β “) und TRAM („TRIF-related adaptor molecule“) als entsprechendes Adaptermolekül-Paar, wodurch die Spätphase der „nuclear transcription factor κ B“(NF- κ B)-Aktivierung mit nachfolgender Produktion kostimulierender Moleküle (CD40, CD80 und CD86) vermittelt wird.

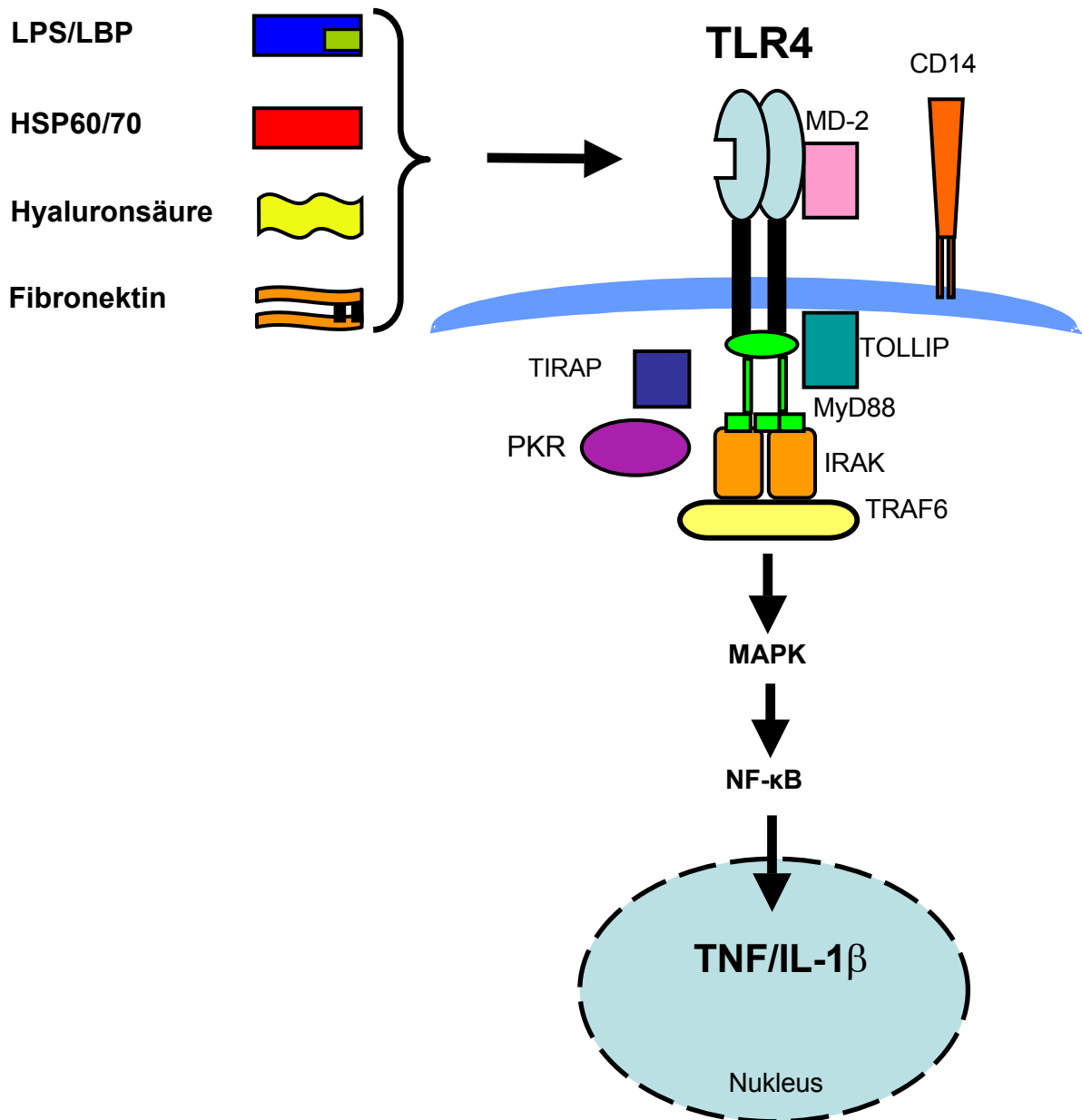


Abb. 9: Der TLR4-Signaltransduktionsweg. Man geht davon aus, dass Liganden wie der LPS/LBP-Komplex, HSP 60 und 70, Hyaluronsäure und Fibronektin an den TLR4-Komplex (TLR4 wird exprimiert mit MD-2) binden und somit die Signalkaskade initiieren. Der hier dargestellte MyD88-abhängige Transduktionsweg besteht aus verschiedenen essentiellen Komponenten, wie MyD88, TOLLIP („Toll-interacting protein“), IRAK („IL-1 receptor-associated kinase“), TIRAP („Toll/II-1 receptor domain-containing adaptor protein“) und die dsRNA-abhängige Proteinkinase (PKR). Die Kaskade führt schließlich zu einer Aktivierung von TRAF6 („TNF-receptor-associated factor 6“), welches durch MAP („Mitogen-activated-protein“)-Kinasen NF-κB („nuclear transcription factor κB“) aktiviert. Die Translokation von NF-κB in den Nukleus induziert die Aktivierung proinflammatorischer Gene, wie z.B TNF und IL-1β.

Im MyD88-abhängigen Transduktionsweg agieren MyD88 und TIRAP („Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor protein“) als Adapterproteine an der intrazellulären Domäne des TLR4 (Fitzgerald et al., 2001; Horng et al., 2001). Da der MyD88-abhängige Weg für die Frühphase der NF- κ B-Aktivierung und damit für die Produktion der proinflammatorischen Zytokine und die Hochregulation kostimulatorischer Moleküle verantwortlich ist (Akira et al., 2001), soll er an dieser Stelle näher betrachtet werden. Die durch MyD88 aktivierte IRAK („IL-1-receptor-associated-kinase“) (Anderson, 2000; O'Neill and Greene, 1998) führt zu einer Rekrutierung von TRAF6 („TNF-receptor-associated factor 6“). Hierbei spielt auch die dsRNA-abhängige Proteinkinase (PKR) eine Rolle (Ghosh and Karin, 2002). Im MyD88-abhängigen sowie –unabhängigen Transduktionsweg bewirken schließlich die aktivierten MAP („Mitogen-activated protein“)-Kinasen eine Translokation des NF- κ B („Nuclear transcription factor κ B“) in den Nukleus (Karin and Ben-Neriah, 2000) und somit eine Aktivierung proinflammatorischer Gene (Baumgarten et al., 2001; Martin and Wesche, 2002; Medzhitov, 2001; Medzhitov and Janeway, 2000).

Vorher veröffentlichte Daten unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass eine LPS-induzierte intramyokardiale Zytokinexpression in TLR4-hyporesponsiven Mäusen im Vergleich zu Wildtypmäusen signifikant abgeschwächt ist. Dies wurde anhand einer reduzierten mRNA- und Proteinexpression von TNF und IL-1 β , iNOS-Proteinexpression und NO-Produktion so wie anhand einer reduzierten Aktivierung des myokardialen NF- κ B nachgewiesen (Baumgarten et al., 2001). NF- κ B ist ein Transkriptionsfaktor und bildet häufig die gemeinsame Endstrecke einer Rezeptor-Aktivierung in der angeborenen und erworbenen Immunabwehr. Die Konsequenz seiner Aktivierung ist die Expression zahlreicher Immunmodulatoren wie Zytokine (IL-1,-2,-6,-12 und TNF), Chemokine (z.B. IL-8) und Adhäsionsmoleküle (ICAM, VCAM) sowie die Induktion von Effektorproteinen wie iNOS und COX-2 (Ghosh and Karin, 2002). Die bei TLR4-hyporesponsiven Tieren abgeschwächte inflammatorische Antwort auf die o.g. durch Ischämie freigesetzten Substanzen könnte ähnlich verlaufen wie die durch TLR4-Funktionsuntüchtigkeit abgeschwächte Antwort auf LPS. Wie bei LPS könnte es durch die o.g. Substanzen ebenfalls bei TLR4-Defizienz zu einer verringerten NF- κ B-Aktivierung und somit einer abgeschwächten Zytokin-Expression führen.

Ergebnis der Inflammationskaskade, die durch myokardiale Ischämie und Reperfusion induziert wird, ist die Invasion und Akkumulation von neutrophilen Granulozyten in betroffenen Myokardarealen (Engler et al., 1986). In einem Tierversuch an Mäusen erfolgt die Neutrophilen-Infiltration des ischämischen und reperfundierten Myokards während der ersten zwei Tage nach der Ischämie (Yang et al., 2002). Als Zeichen einer Immunantwort im Rahmen des Reperfusionsschadens findet die intensivste Entzündungsreaktion im Gebiet zwischen Infarkt und perfundiertem Gewebe statt (Youker et al., 1992). Ob die Präsenz von Neutrophilen der Grund oder die Konsequenz eines myokardialen Schadens - oder sogar beides - ist, wird weiterhin kontrovers diskutiert (Baxter, 2002). TLR4 reguliert das Neutrophilen-Überleben (Sabroe et al., 2003) und ist bedeutend für deren Migration, indem es über eine verminderte Transkription der G-Protein-gebundenen Rezeptorkinasen (GRK) 2 und 5 die Chemokinrezeptor-Sensibilität erhöht (Fan, J. and Malik, 2003). Inwieweit dieser über TLR4 vermittelte Mechanismus einen Einfluss auf die I/R-Phase hat, bleibt bisher ungeklärt.

Auch wenn in unserer Arbeit nicht die Infiltration von Entzündungszellen in die ischämisierten und reperfundierten Myokardareale gemessen wurde, sprechen Befunde anderer Arbeitsgruppen für eine verminderte Rekrutierung von Entzündungszellen wie neutrophilen Granulozyten in inflammatorisches Myokard bei TLR4-hyporesponsiven Tieren (Oyama et al., 2004). Die Produktion von Reactive Oxygen Species (ROS) und Proteasen durch Neutrophile Granulozyten im ischämischen und reperfundierten Myokard sind potentielle Effektoren eines myokardialen Schadens (Dhalla et al., 2000b; Hansen, 1995). Zu einer Reduktion der Infarktgröße trägt die Inhibierung der Neutrophilen (Hoffmeyer et al., 2000) sowie eine Blockierung der ROS-Bildung (Dhalla et al., 2000a) bei. Dies wäre ein weiterer Anhaltspunkt dafür, dass die o.g. abgeschwächte Immunantwort auf I/R bei TLR4-hyporesponsiven Tieren der Grund für den in der vorliegenden Arbeit gemessenen verminderten I/R-Schaden sein könnte.

4.1 Klinische Relevanz

Die große klinische Relevanz dieses Themas zeigt sich am nahezu epidemischen Auftreten der KHK und ihrer klinischen Manifestationen. Akute myokardiale ischämische Ereignisse sind für ca. 171.000 Todesfälle pro Jahr in Deutschland verantwortlich und sind damit die häufigste Todesursache. Eine frühe Reperfusion wird heutzutage als optimale therapeutische Möglichkeit angesehen, da hierdurch die Infarktausbreitung limitiert und die Überlebensraten verbessert werden (Kim and Braunwald, 1993). Obwohl die nach ischämischen Ereignissen durchgeführten revaskularisierenden Maßnahmen wie Lyse, PTCA („percutaneous transluminal coronary angioplasty“) oder operativer Bypass aktuell die optimale Therapie darstellen, sind die Mechanismen in dieser Ischämie/Reperfusion noch ungenügend erforscht. So kann eine Reperfusion neben dem großen Benefit einer Infarktlimitierung auch eine Entzündungsreaktion hervorrufen, genannt „reperfusion injury“, die möglicherweise den myokardialen Schaden vergrößert (Entman et al., 2000). Somit ist unklar, ob im Rahmen akuter ischämischer Ereignisse eine frühe, inflammatorisch geprägte Reperfusion die optimale Therapie darstellt, oder ob durch eine Ausschaltung der genannten „reperfusion injury“ der ischämiebedingte myokardiale Schaden noch weiter eingedämmt werden könnte. Bei der Entwicklung neuer Therapiekonzepte steht daher die initiale Entzündungsreaktion bei Reperfusion im Mittelpunkt des Interesses. Allerdings sind die Mechanismen der myokardialen I/R-Phase noch nicht vollständig verstanden und antiinflammatorische Konzepte in klinischen Versuchen zeigten bisher enttäuschende Ergebnisse. So wurde die „RENAISSANCE und RECOVER“-Studie mit einem TNF-blockierenden TNF-Rezeptor-Analogen (Etanercept) wegen fehlender Verbesserung des klinischen Outcomes im Sinne der Überlebensrate abgebrochen (Louis et al., 2001). Eine weitere klinische Studie mit dem Einsatz von Antikörpern gegen den CD11/CD18-Integrin-Rezeptor von Leukozyten zeigte trotz einer tierexperimentell nachgewiesenen Verringerung der Infarktgröße kein reduziertes Infarktareal bei Patienten nach revaskularisierenden Maßnahmen (Faxon et al., 2002). Ein anderes therapeutisches Konzept nach einer Revaskularisierung ischämischen Myokardgewebes könnten allerdings spezielle TLR4-Antagonisten (z.B. Eritoran) sein, welche bisher Anwendung in der Sepsistherapie finden (Rossignol and Lynn, 2005).

4.2 Ausblick

Weitere Untersuchungen werden die Mechanismen in der I/R klären. Die Rolle des myokardialen TLR4 und der Mediatoren des TLR4-Signaltransduktionsweges in der Beeinflussung der Infarktgröße werden nachfolgende Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe näher untersuchen. Die Ergebnisse dieser Arbeit werden publiziert als Kontrollgruppe für einen Versuch unserer Arbeitsgruppe, bei dem TLR4-hypo-responsive und WT-Mäuse 16 Stunden vor Ischämie einem präkonditionierendem Reiz durch LPS ausgesetzt werden (Stapel H, 2006). Neben der Bestimmung der Infarktgrößen wurden in dieser Arbeit die Niveaus der in der Zytokinkaskade wichtigen Metallo-Matrix-Proteinasen bestimmt.

5. Zusammenfassung

Das angeborene Immunsystem spielt eine zentrale Rolle in der myokardialen Ischämie und Reperfusion (I/R). Zahlreiche Untersuchungen legen nahe, dass der „Toll-Like-Receptor“ 4 (TLR4) eine bedeutende Funktion in der Vermittlung proinflammatorischer Signale im I/R-Modell hat. Proinflammatorische Zytokine wie Tumor Nekrose Faktor (TNF) und Interleukin 1 β (IL-1 β) sind Bestandteile der intrazellulären Signalkaskade und vermitteln schließlich die zelluläre Entzündungsreaktion im ischämischen und reperfundierten Gewebe. Bestimmte Liganden des TLR4, insbesondere HSP („Heat Shock Protein“) und Fibronectin, werden durch myokardiale I/R freigesetzt und vermitteln somit die Entzündungsreaktion in Abwesenheit einer Infektion.

In der vorliegenden Arbeit wurde bei TLR4-hyporesponsiven Mäusen (C3H/HeJ) sowie bei Wildtypmäusen (C3H/HeN) gleichermaßen operativ ein Faden um die LAD („left anterior descending coronary artery“) implantiert. Nach einer 5 bis 7-tägigen postoperativen Erholungsphase wurde durch Zug am Faden bei geschlossenem Thorax eine temporäre 60-minütige Okklusion durchgeführt. Nach einer 24-stündigen Reperusionszeit wurden die Herzen der Versuchstiere entnommen und die Infarktgröße anhand der Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC)-Methode bestimmt. Bei Wildtypmäusen (n=12) wurde eine Infarktgröße von 50,69 +/- 7,02% der „area at risk“ (AAR) gemessen, bei den TLR4-hyporesponsiven (n=17) hingegen ein signifikant kleineres Infarktareal von 30,13 +/- 4,81% der AAR.

Die vorliegenden Daten legen den Schluss nahe, dass TLR4 eine wichtige Funktion in der Vermittlung der Inflammationsreaktion während Ischämie und früher Reperusionsphase hat. TLR4-Funktionsuntüchtigkeit bedingt in unseren Versuchen verminderte Größe des Infarktgebietes und weniger Letalität nach I/R.

6. Literaturverzeichnis

- Akira S, Takeda K, Kaisho T, Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol* 2001; 2: 675-680.
- Anderson KV, Toll signaling pathways in the innate immune response. *Curr Opin Immunol* 2000; 12: 13-19.
- Arbour NC, Lorenz E, Schutte BC, Zabner J, Kline JN, Jones M, Frees K, Watt JL, Schwartz DA, TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. *Nat Genet* 2000; 25: 187-191.
- Baldassare JJ, Bi Y, Bellone CJ, The role of p38 mitogen-activated protein kinase in IL-1 β transcription. *J Immunol* 1999; 162: 5367-5373.
- Barber SA, Perera PY, Vogel SN, Defective ceramide response in C3H/HeJ (Lpsd) macrophages. *J Immunol* 1995; 155: 2303-2305.
- Baumgarten G, Knuefermann P, Schuhmacher G, Vervölgyi V, von Rappard J, Dreiner U, Fink K, Djoufack C, Hoeft A, Grohé C, Knowlton AA, R M, Toll-like receptor 4, nitric oxide, and myocardial depression in endotoxemia. *Shock* 2006; 25: 43-49.
- Baumgarten G, Knuefermann P, Mann DL, Cytokines as emerging targets in the treatment of heart failure. *Trends Cardiovasc Med* 2000; 10: 216-223.
- Baumgarten G, Knuefermann P, Nozaki N, Sivasubramanian N, Mann DL, Vallejo JG, In vivo expression of proinflammatory mediators in the adult heart after endotoxin administration: the role of toll-like receptor-4. *J Infect Dis* 2001; 183: 1617-1624.
- Baxter GF, The neutrophil as a mediator of myocardial ischemia-reperfusion injury: time to move on. *Basic Res Cardiol* 2002; 97: 268-275.
- Baxter GF, Goma FM, Yellon DM, Involvement of protein kinase C in the delayed cytoprotection following sublethal ischaemia in rabbit myocardium. *Br J Pharmacol* 1995; 115: 222-224.

- Baxter GF, Mocanu MM, Yellon DM, Attenuation of myocardial ischaemic injury 24 h after diacylglycerol treatment in vivo. *J Mol Cell Cardiol* 1997; 29: 1967-1975.
- Belhomme D, Peynet J, Louzy M, Launay JM, Kitakaze M, Menasche P, Evidence for preconditioning by isoflurane in coronary artery bypass graft surgery. *Circulation* 1999; 100: 340-344.
- Bernardo NL, D'Angelo M, Okubo S, Joy A, Kukreja RC, Delayed ischemic preconditioning is mediated by opening of ATP-sensitive potassium channels in the rabbit heart. *Am J Physiol* 1999; 276: H1323-1330.
- Bolli R, Mechanism of myocardial "stunning". *Circulation* 1990; 82: 723-738.
- Bolli R, The late phase of preconditioning. *Circ Res* 2000; 87: 972-983.
- Bolli R, Dawn B, Tang XL, Qiu Y, Ping P, Xuan YT, Jones WK, Takano H, Guo Y, Zhang J, The nitric oxide hypothesis of late preconditioning. *Basic Res Cardiol* 1998; 93: 325-338.
- Bolli R, Shinmura K, Tang XL, Kodani E, Xuan YT, Guo Y, Dawn B, Discovery of a new function of cyclooxygenase (COX)-2: COX-2 is a cardioprotective protein that alleviates ischemia/reperfusion injury and mediates the late phase of preconditioning. *Cardiovasc Res* 2002; 55: 506-519.
- Bozkurt B, Torre-Amione G, Warren MS, Whitmore J, Soran OZ, Feldman AM, Mann DL, Results of targeted anti-tumor necrosis factor therapy with etanercept (ENBREL) in patients with advanced heart failure. *Circulation* 2001; 103: 1044-1047.
- Braunwald E, Seluya G, Disorders of the cardiovascular system. In: Kasper DL, Braunwald E, Fauci AS, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL, Harrison's principles of internal medicine, 16th ed. New York - Chicago - San Francisco - Lisbon - London - Madrid - Mexico City - Milan - New Delhi - San Juan - Seoul - Singapor - Sidney - Toronto: McGraw-Hill, 2006; 1434.
- Brown JM, Grosso MA, Terada LS, Whitman GJ, Banerjee A, White CW, Harken AH, Repine JE, Endotoxin pretreatment increases endogenous myocardial catalase

- activity and decreases ischemia-reperfusion injury of isolated rat hearts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86: 2516-2520.
- Burns K, Martinon F, Esslinger C, Pahl H, Schneider P, Bodmer JL, Di Marco F, French L, Tschopp J, MyD88, an adapter protein involved in interleukin-1 signaling. *J Biol Chem* 1998; 273: 12203-12209.
- Cario E, Rosenberg IM, Brandwein SL, Beck PL, Reinecker HC, Podolsky DK, Lipopolysaccharide activates distinct signaling pathways in intestinal epithelial cell lines expressing Toll-like receptors. *J Immunol* 2000; 164: 966-972.
- Cason BA, Gamperl AK, Slocum RE, Hickey RF, Anesthetic-induced preconditioning: previous administration of isoflurane decreases myocardial infarct size in rabbits. *Anesthesiology* 1997; 87: 1182-1190.
- Chen W, Syldath U, Bellmann K, Burkart V, Kolb H, Human 60-kDa heat-shock protein: a danger signal to the innate immune system. *J Immunol* 1999; 162: 3212-3219.
- Chien GL, Wolff RA, Davis RF, van Winkle DM, "Normothermic range" temperature affects myocardial infarct size. *Cardiovasc Res* 1994; 28: 1014-1017.
- Comstock KL, Krown KA, Page MT, Martin D, Ho P, Pedraza M, Castro EN, Nakajima N, Glembotski CC, Quintana PJ, Sabbadini RA, LPS-induced TNF- α release from and apoptosis in rat cardiomyocytes: obligatory role for CD14 in mediating the LPS response. *J Mol Cell Cardiol* 1998; 30: 2761-2775.
- Dhalla NS, Elmoselhi AB, Hata T, Makino N, Status of myocardial antioxidants in ischemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 2000a; 47: 446-456.
- Dhalla NS, Temsah RM, Netticadan T, Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. *J Hypertens* 2000b; 18: 655-673.
- Dibbs Z, Kurrelmeyer K, Kalra D, Seta Y, Wang F, Bozkurt B, Baumgarten G, Sivasubramanian N, Mann DL, Cytokines in heart failure: pathogenetic mechanisms and potential treatment. *Proc Assoc Am Physicians* 1999; 111: 423-428.

- Duncker DJ, Klassen CL, Ishibashi Y, Herrlinger SH, Pavek TJ, Bache RJ, Effect of temperature on myocardial infarction in swine. *Am J Physiol* 1996; 270: H1189-1199.
- Dvorak HN, Senger DR, Dvorak AM, Harvey VS, McDonagh J, Regulation of extravascular coagulation by microvascular permeability. *Science* 1985; 227: 1059-1061.
- Dybdahl B, Wahba A, Lien E, Flo TH, Waage A, Qureshi N, Sellevold OF, Espevik T, Sundan A, Inflammatory response after open heart surgery: release of heat-shock protein 70 and signaling through toll-like receptor-4. *Circulation* 2002; 105: 685-690.
- Elliott GT, Monophosphoryl lipid A induces delayed preconditioning against cardiac ischemia-reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol* 1998; 30: 3-17.
- Elsasser A, Nef HM, Mollmann H, Hamm CW, Treatment of ST Segment Elevation Myocardial Infarctions According to the Guidelines. *Herz* 2005; 30: 685-694.
- Engler RL, Dahlgren MD, Morris DD, Peterson MA, Schmid-Schonbein GW, Role of leukocytes in response to acute myocardial ischemia and reflow in dogs. *Am J Physiol* 1986; 251: H314-323.
- Entman ML, Smith CW, Postreperfusion inflammation: a model for reaction to injury in cardiovascular disease. *Cardiovasc Res* 1994; 28: 1301-1311.
- Entman ML, Youker KA, Frangogiannis N, Lakshminarayanan V, Nossuli T, Evans A, Kurrelmeyer K, Mann DL, Smith CW, Is inflammation good for the ischemic heart--perspectives beyond the ordinary. *Z Kardiol* 2000; 89 Suppl 9: IX/82-87.
- Eurostat, Statistiken zur Gesundheit - Atlas zur Sterblichkeit in der Europäischen Union - Daten 1994 - 1996. Amt für amtliche Veröffentlichungen der Europäischen Gemeinschaften, Luxemburg, 2002: 53-59.

- Fan GC, Ren X, Qian J, Yuan Q, Nicolaou P, Wang Y, Jones WK, Chu G, Kranias EG, Novel cardioprotective role of a small heat-shock protein, Hsp20, against ischemia/reperfusion injury. *Circulation* 2005; 111: 1792-1799.
- Fan J, Malik AB, Toll-like receptor-4 (TLR4) signaling augments chemokine-induced neutrophil migration by modulating cell surface expression of chemokine receptors. *Nat Med* 2003; 9: 315-321.
- Faxon DP, Gibbons RJ, Chronos NA, Gurbel PA, Sheehan F, The effect of blockade of the CD11/CD18 integrin receptor on infarct size in patients with acute myocardial infarction treated with direct angioplasty: the results of the HALT-MI study. *J Am Coll Cardiol* 2002; 40: 1199-1204.
- Fearon DT, Locksley RM, The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science* 1996; 272: 50-53.
- Ferrero E, Jiao D, Tsuberi BZ, Tesio L, Rong GW, Haziot A, Goyert SM, Transgenic mice expressing human CD14 are hypersensitive to lipopolysaccharide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90: 2380-2384.
- Fitzgerald KA, Palsson-McDermott EM, Bowie AG, Jefferies CA, Mansell AS, Brady G, Brint E, Dunne A, Gray P, Harte MT, McMurray D, Smith DE, Sims JE, Bird TA, O'Neill LA, Mal (MyD88-adaptor-like) is required for Toll-like receptor-4 signal transduction. *Nature* 2001; 413: 78-83.
- Frangogiannis NG, Youker KA, Rossen RD, Gwechenberger M, Lindsey MH, Mendoza LH, Michael LH, Ballantyne CM, Smith CW, Entman ML, Cytokines and the microcirculation in ischemia and reperfusion. *J.Mol.Cell Cardiol.* 1998; 30: 2567-2576.
- Frantz S, Kobzik L, Kim YD, Fukazawa R, Medzhitov R, Lee RT, Kelly RA, Toll4 (TLR4) expression in cardiac myocytes in normal and failing myocardium. *J Clin Invest* 1999; 104: 271-280.

- Freudenberg MA, Meier-Dieter U, Staehelin T, Galanos C, Analysis of LPS released from *Salmonella abortus equi* in human serum. *Microb Pathog* 1991; 10: 93-104.
- Ghosh S, Karin M, Missing pieces in the NF- κ B puzzle. *Cell* 2002; 109 Suppl: S81-S96.
- Goldhaber JI, Kim KH, Natterson PD, Lawrence T, Yang P, Weiss JN, Effects of TNF- α on $[Ca^{2+}]_i$ and contractility in isolated adult rabbit ventricular myocytes. *Am J Physiol* 1996; 271: H1449-1455.
- Guo Y, Wu WJ, Qiu Y, Tang XL, Yang Z, Bolli R, Demonstration of an early and a late phase of ischemic preconditioning in mice. *Am J Physiol* 1998; 275: H1375-1387.
- Hailman E, Lichenstein HS, Wurfel MM, Miller DS, Johnson DA, Kelley M, Busse LA, Zukowski MM, Wright SD, Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein accelerates the binding of LPS to CD14. *J Exp Med* 1994; 179: 269-277.
- Hale SL, Kloner RA, Myocardial temperature in acute myocardial infarction: protection with mild regional hypothermia. *Am J Physiol* 1997; 273: H220-227.
- Hansen PR, Role of neutrophils in myocardial ischemia and reperfusion. *Circulation* 1995; 91: 1872-1885.
- Haziot A, Ferrero E, Kontgen F, Hijiya N, Yamamoto S, Silver J, Stewart CL, Goyert SM, Resistance to endotoxin shock and reduced dissemination of gram-negative bacteria in CD14-deficient mice. *Immunity* 1996; 4: 407-414.
- Hearse DJ, Bolli R, Reperfusion induced injury: manifestations, mechanisms, and clinical relevance. *Cardiovasc Res* 1992; 26: 101-108.
- Hearse DJ, Tosaki A, Reperfusion-induced arrhythmias and free radicals: studies in the rat heart with DMPO. *J Cardiovasc Pharmacol* 1987; 9: 641-650.
- Herold G, *Innere Medizin*. Köln: Eigenverlag (Bezug über www.herold-innere-medizin.de), 2006: 202.

- Hiasa G, Hamada M, Ikeda S, Hiwada K, Ischemic preconditioning and lipopolysaccharide attenuate nuclear factor- κ B activation and gene expression of inflammatory cytokines in the ischemia-reperfused rat heart. *Jpn Circ J* 2001; 65: 984-990.
- Hoffmann JA, Kafatos FC, Janeway CA, Ezekowitz RA, Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* 1999; 284: 1313-1318.
- Hoffmeyer MR, Scalia R, Ross CR, Jones SP, Lefer DJ, PR-39, a potent neutrophil inhibitor, attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury in mice. *Am J Physiol* 2000; 279: H2824-2828.
- Hornig T, Barton GM, Medzhitov R, TIRAP: an adapter molecule in the Toll signaling pathway. *Nat Immunol* 2001; 2: 835-841.
- Hultmark D, Macrophage differentiation marker MyD88 is a member of the Toll/IL-1 receptor family. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 199: 144-146.
- Imagawa J, Baxter GF, Yellon DM, Genistein, a tyrosine kinase inhibitor, blocks the "second window of protection" 48 h after ischemic preconditioning in the rabbit. *J Mol Cell Cardiol* 1997; 29: 1885-1893.
- Ito WD, Schaarschmidt S, Klask R, Hansen S, Schafer HJ, Mathey D, Bhakdi S, Infarct size measurement by triphenyltetrazolium chloride staining versus in vivo injection of propidium iodide. *J Mol Cell Cardiol* 1997; 29: 2169-2175.
- Jaattela M, Heat shock proteins as cellular lifeguards. *Ann Med* 1999; 31: 261-271.
- Jayakumar J, Suzuki K, Sammut IA, Smolenski RT, Khan M, Latif N, Abunasra H, Murtuza B, Amrani M, Yacoub MH, Heat shock protein 70 gene transfection protects mitochondrial and ventricular function against ischemia-reperfusion injury. *Circulation* 2001; 104: 303-307.
- Karin M, Ben-Neriah Y, Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- κ B activity. *Annu Rev Immunol* 2000; 18: 621-663.

- Kato R, Foex P, Myocardial protection by anesthetic agents against ischemia-reperfusion injury: an update for anesthesiologists. *Can J Anaesth* 2002; 49: 777-791.
- Kennedy MN, Mullen GE, Leifer CA, Lee C, Mazzone A, Dileepan KN, Segal DM, A complex of soluble MD-2 and lipopolysaccharide serves as an activating ligand for Toll-like receptor 4. *J Biol Chem* 2004; 279: 34698-34704.
- Kim CB, Braunwald E, Potential benefits of late reperfusion of infarcted myocardium. The open artery hypothesis. *Circulation* 1993; 88: 2426-2436.
- Kloner RA, Yellon D, Does ischemic preconditioning occur in patients? *J Am Coll Cardiol* 1994; 24: 1133-1142.
- Knuefermann P, Nemoto S, Baumgarten G, Misra A, Sivasubramanian N, Carabello BA, Vallejo JG, Cardiac inflammation and innate immunity in septic shock: is there a role for toll-like receptors? *Chest* 2002a; 121: 1329-1336.
- Knuefermann P, Nemoto S, Misra A, Nozaki N, Defreitas G, Goyert SM, Carabello BA, Mann DL, Vallejo JG, CD14-deficient mice are protected against lipopolysaccharide-induced cardiac inflammation and left ventricular dysfunction. *Circulation* 2002b; 106: 2608-2615.
- Latini R, Bianchi M, Correale E, Dinarello CA, Fantuzzi G, Fresco C, Maggioni AP, Mengozzi M, Romano S, Shapiro L, et al., Cytokines in acute myocardial infarction: selective increase in circulating tumor necrosis factor, its soluble receptor, and interleukin-1 receptor antagonist. *J Cardiovasc Pharmacol* 1994; 23: 1-6.
- Lien E, Means TK, Heine H, Yoshimura A, Kusumoto S, Fukase K, Fenton MJ, Oikawa M, Qureshi N, Monks B, Finberg RW, Ingalls RR, Golenbock DT, Toll-like receptor 4 imparts ligand-specific recognition of bacterial lipopolysaccharide. *J Clin Invest* 2000; 105: 497-504.
- Loewel H, Pressemitteilung der Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung, Neuherberg. 1996a.

- Loewel H, Sozialmedizin und Epidemiologie: Bedeutung für die Krankheitsbewältigung. Gesundheitswesen 1996b; Sonderheft 58/3: 155-165.
- Loewel H, Meisinger C, Heier M, Hörmann A, von Scheidt W, Herzinfarkt und koronare Sterblichkeit in Süddeutschland. Dtsch Arztebl 2006; 103(10): A616-622.
- Louis A, Cleland JG, Crabbe S, Ford S, Thackray S, Houghton T, Clark A, Clinical Trials Update: CAPRICORN, COPERNICUS, MIRACLE, STAF, RITZ-2, RECOVER and RENAISSANCE and cachexia and cholesterol in heart failure. Highlights of the Scientific Sessions of the American College of Cardiology, 2001. Eur J Heart Fail 2001; 3: 381-387.
- Ludwig LM, Tanaka K, Eells JT, Weihrauch D, Pagel PS, Kersten JR, Warltier DC, Preconditioning by isoflurane is mediated by reactive oxygen species generated from mitochondrial electron transport chain complex III. Anesth Analg 2004; 99: 1308-1315.
- Marber MS, Latchman DS, Walker JM, Yellon DM, Cardiac stress protein elevation 24 hours after brief ischemia or heat stress is associated with resistance to myocardial infarction. Circulation 1993; 88: 1264-1272.
- Martin MU, Wesche H, Summary and comparison of the signaling mechanisms of the Toll/interleukin-1 receptor family. Biochim Biophys Acta 2002; 1592: 265-280.
- Medzhitov R, Toll-like receptors and innate immunity. Nat Rev Immunol 2001; 1: 135-145.
- Medzhitov R, Janeway C, Jr., Innate immunity. N Engl J Med 2000; 343: 338-344.
- Mei DA, Elliott GT, Gross GJ, K_{ATP} channels mediate late preconditioning against infarction produced by monophosphoryl lipid A. Am J Physiol 1996; 271: H2723-2729.
- Michael LH, Ballantyne CM, Zachariah JP, Gould KE, Pocius JS, Taffet GE, Hartley CJ, Pham TT, Daniel SL, Funk E, Entman ML, Myocardial infarction and remodeling in mice: effect of reperfusion. Am J Physiol 1999; 277: H660-668.

- Michael LH, Entman ML, Hartley CJ, Youker KA, Zhu J, Hall SR, Hawkins HK, Berens K, Ballantyne CM, Myocardial ischemia and reperfusion: a murine model. *Am J Physiol* 1995; 269: H2147-2154.
- Miyake K, Innate recognition of lipopolysaccharide by Toll-like receptor 4-MD-2. *Trends Microbiol* 2004; 12: 186-192.
- Muller-Werdan U, Schumann H, Loppnow H, Fuchs R, Darmer D, Stadler J, Holtz J, Werdan K, Endotoxin and tumor necrosis factor α exert a similar proinflammatory effect in neonatal rat cardiomyocytes, but have different cardiodepressant profiles. *J Mol Cell Cardiol* 1998; 30: 1027-1036.
- Murry CE, Jennings RB, Reimer KA, Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 1986; 74: 1124-1136.
- Nemoto S, Vallejo JG, Knuefermann P, Misra A, Defreitas G, Carabello BA, Mann DL, Escherichia coli LPS-induced LV dysfunction: role of toll-like receptor-4 in the adult heart. *Am J Physiol* 2002; 282: H2316-2323.
- Nishikawa Y, Lew WY, Endotoxin-induced left ventricular depression is blocked by nitrogen mustard or dimethylthiourea in rabbits. *Am J Physiol* 1995; 269: H1098-1105.
- Nossuli TO, Lakshminarayanan V, Baumgarten G, Taffet GE, Ballantyne CM, Michael LH, Entman ML, A chronic mouse model of myocardial ischemia-reperfusion: essential in cytokine studies. *Am J Physiol* 2000; 278: H1049-1055.
- Ohashi K, Burkart V, Flohe S, Kolb H, Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex. *J Immunol* 2000; 164: 558-561.
- Ohtsuka K, Hata M, Molecular chaperone function of mammalian Hsp70 and Hsp40-a review. *Int J Hyperthermia* 2000; 16: 231-245.

- Okamura Y, Watari M, Jerud ES, Young DW, Ishizaka ST, Rose J, Chow JC, Strauss JF, The extra domain A of fibronectin activates Toll-like receptor 4. *J Biol Chem* 2001; 276: 10229-10233.
- O'Neill LA, Greene C, Signal transduction pathways activated by the IL-1 receptor family: ancient signaling machinery in mammals, insects, and plants. *J Leukoc Biol* 1998; 63: 650-657.
- Orr SL, Tobias P, LPS and LAM activation of the U373 astrocytoma cell line: differential requirement for CD14. *J Endotoxin Res* 2000; 6: 215-222.
- Oyama J, Blais C, Jr., Liu X, Pu M, Kobzik L, Kelly RA, Bourcier T, Reduced myocardial ischemia-reperfusion injury in toll-like receptor 4-deficient mice. *Circulation* 2004; 109: 784-789.
- Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C, Du X, Birdwell D, Alejos E, Silva M, Galanos C, Freudenberg M, Ricciardi-Castagnoli P, Layton B, Beutler B, Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 1998a; 282: 2085-2088.
- Poltorak A, Smirnova I, He X, Liu MY, Van Huffel C, McNally O, Birdwell D, Alejos E, Silva M, Du X, Thompson P, Chan EK, Ledesma J, Roe B, Clifton S, Vogel SN, Beutler B, Genetic and physical mapping of the Lps locus: identification of the toll-4 receptor as a candidate gene in the critical region. *Blood Cells Mol Dis* 1998b; 24: 340-355.
- Rossignol DP, Lynn M, TLR4 antagonists for endotoxemia and beyond. *Curr Opin Investig Drugs* 2005; 6: 496-502.
- Sabroe I, Prince LR, Jones EC, Horsburgh MJ, Foster SJ, Vogel SN, Dower SK, Whyte MK, Selective roles for Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 in the regulation of neutrophil activation and life span. *J Immunol* 2003; 170: 5268-5275.
- Sasaki N, Sato T, Ohler A, O'Rourke B, Marban E, Activation of mitochondrial ATP-dependent potassium channels by nitric oxide. *Circulation* 2000; 101: 439-445.

- Schett G, Metzler B, Kleindienst R, Amberger A, Recheis H, Xu Q, Wick G, Myocardial injury leads to a release of heat shock protein (hsp) 60 and a suppression of the anti-hsp65 immune response. *Cardiovasc Res* 1999; 42: 685-695.
- Schromm AB, Lien E, Henneke P, Chow JC, Yoshimura A, Heine H, Latz E, Monks BG, Schwartz DA, Miyake K, Golenbock DT, Molecular genetic analysis of an endotoxin nonresponder mutant cell line: a point mutation in a conserved region of MD-2 abolishes endotoxin-induced signaling. *J Exp Med* 2001; 194: 79-88.
- Schumann RR, Lamping N, Kirschning C, Knopf HP, Hoess A, Herrmann F, Lipopolysaccharide binding protein: its role and therapeutical potential in inflammation and sepsis. *Biochem Soc Trans* 1994; 22: 80-82.
- Schumann RR, Leong SR, Flaggs GW, Gray PW, Wright SD, Mathison JC, Tobias PS, Ulevitch RJ, Structure and function of lipopolysaccharide binding protein. *Science* 1990; 249: 1429-1431.
- Seydel U, Labischinski H, Kastowsky M, Brandenburg K, Phase behavior, supramolecular structure, and molecular conformation of lipopolysaccharide. *Immunobiology* 1993; 187: 191-211.
- Shishido T, Nozaki N, Yamaguchi S, Shibata Y, Nitobe J, Miyamoto T, Takahashi H, Arimoto T, Maeda K, Yamakawa M, Takeuchi O, Akira S, Takeishi Y, Kubota I, Toll-like receptor-2 modulates ventricular remodeling after myocardial infarction. *Circulation* 2003; 108: 2905-2910.
- Smiley ST, King JA, Hancock WW, Fibrinogen stimulates macrophage chemokine secretion through toll-like receptor 4. *J Immunol* 2001; 167: 2887-2894.
- Stapel H, Kim S-C, Osterkamp S, Knuefermann P, Hoefft A, Meyer R, Grohé C, Baumgarten G, Toll-like Receptor 4 modulates myocardial ischemia-reperfusion injury: role of matrix metalloproteinases. *Europ J Heart Fail* 2006; (in press).

- Szmagala P, Morawski W, Krejca M, Gburek T, Bochenek A, Evaluation of perioperative myocardial tissue damage in ischemically preconditioned human heart during aorto coronary bypass surgery. *J Cardiovasc Surg (Torino)* 1998; 39: 791-795.
- Tada H, Nemoto E, Shimauchi H, Watanabe T, Mikami T, Matsumoto T, Ohno N, Tamura H, Shibata K, Akashi S, Miyake K, Sugawara S, Takada H, Saccharomyces cerevisiae- and Candida albicans-derived mannan induced production of tumor necrosis factor α by human monocytes in a CD14- and Toll-like receptor 4-dependent manner. *Microbiol Immunol* 2002; 46: 503-512.
- Takano H, Bolli R, Black RG, Jr., Kodani E, Tang XL, Yang Z, Bhattacharya S, Auchampach JA, A(1) or A(3) adenosine receptors induce late preconditioning against infarction in conscious rabbits by different mechanisms. *Circ Res* 2001; 88: 520-528.
- Takano H, Tang XL, Bolli R, Differential role of K_{ATP} channels in late preconditioning against myocardial stunning and infarction in rabbits. *Am J Physiol* 2000; 279: H2350-2359.
- Takayama K, Mitchell DH, Din ZZ, Mukerjee P, Li C, Coleman DL, Monomeric Re lipopolysaccharide from Escherichia coli is more active than the aggregated form in the Limulus ameobocyte lysate assay and in inducing Egr-1 mRNA in murine peritoneal macrophages. *J Biol Chem* 1994; 269: 2241-2244.
- Takeuchi O, Takeda K, Hoshino K, Adachi O, Ogawa T, Akira S, Cellular responses to bacterial cell wall components are mediated through MyD88-dependent signaling cascades. *Int Immunol* 2000; 12: 113-117.
- Termeer C, Benedix F, Sleeman J, Fieber C, Voith U, Ahrens T, Miyake K, Freudenberg M, Galanos C, Simon JC, Oligosaccharides of Hyaluronan activate dendritic cells via toll-like receptor 4. *J Exp Med* 2002; 195: 99-111.
- Tobias PS, Soldau K, Gegner JA, Mintz D, Ulevitch RJ, Lipopolysaccharide binding protein-mediated complexation of lipopolysaccharide with soluble CD14. *J Biol Chem* 1995; 270: 10482-10488.

- Tsan MF, Gao B, Endogenous ligands of Toll-like receptors. *J Leukoc Biol* 2004; 76: 514-519.
- Vabulas RM, Ahmad-Nejad P, Ghose S, Kirschning CJ, Issels RD, Wagner H, HSP70 as endogenous stimulus of the Toll/interleukin-1 receptor signal pathway. *J Biol Chem* 2002; 277: 15107-15112.
- Vanoverschelde JL, Wijns W, Depre C, Essamri B, Heyndrickx GR, Borgers M, Bol A, Melin JA, Mechanisms of chronic regional postischemic dysfunction in humans. New insights from the study of noninfarcted collateral-dependent myocardium. *Circulation* 1993; 87: 1513-1523.
- 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: 121-135.
- Vink A, de Kleijn DP, Pasterkamp G, Functional role for toll-like receptors in atherosclerosis and arterial remodeling. *Curr Opin Lipidol* 2004; 15: 515-521.
- Visintin A, Mazzone A, Spitzer JA, Segal DM, Secreted MD-2 is a large polymeric protein that efficiently confers lipopolysaccharide sensitivity to Toll-like receptor 4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 12156-12161.
- Vogel SN, Johnson D, Perera PY, Medvedev A, Lariviere L, Qureshi ST, Malo D, Cutting edge: functional characterization of the effect of the C3H/HeJ defect in mice that lack an *Lpsn* gene: in vivo evidence for a dominant negative mutation. *J Immunol* 1999; 162: 5666-5670.
- Werdan K, Muller-Werdan U, Elucidating molecular mechanisms of septic cardiomyopathy - the cardiomyocyte model. *Mol Cell Biochem* 1996; 163-164: 291-303.
- Wesche H, Henzel WJ, Shillinglaw W, Li S, Cao Z, MyD88: an adapter that recruits IRAK to the IL-1 receptor complex. *Immunity* 1997; 7: 837-847.

- Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, Ulevitch RJ, Mathison JC, CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* 1990; 249: 1431-1433.
- Yang F, Liu YH, Yang XP, Xu J, Kapke A, Carretero OA, Myocardial infarction and cardiac remodelling in mice. *Exp Physiol* 2002; 87: 547-555.
- Yasuda S, Lew WY, Lipopolysaccharide depresses cardiac contractility and β -adrenergic contractile response by decreasing myofilament response to Ca^{2+} in cardiac myocytes. *Circ Res* 1997; 81: 1011-1020.
- Yellon DM, Dana A, The preconditioning phenomenon: A tool for the scientist or a clinical reality? *Circ Res* 2000; 87: 543-550.
- Yoshidome H, Kato A, Edwards MJ, Lentsch AB, Interleukin-10 suppresses hepatic ischemia/reperfusion injury in mice: implications of a central role for nuclear factor κ B. *Hepatology* 1999; 30: 203-208.
- Youker K, Smith CW, Anderson DC, Miller D, Michael LH, Rossen RD, Entman ML, Neutrophil adherence to isolated adult cardiac myocytes. Induction by cardiac lymph collected during ischemia and reperfusion. *J Clin Invest* 1992; 89: 602-609.
- Zacharowski K, Otto M, Hafner G, Chatterjee PK, Thiemermann C, Endotoxin induces a second window of protection in the rat heart as determined by using p-nitro-blue tetrazolium staining, cardiac troponin T release, and histology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 2276-2280.
- Zeuke S, Ulmer AJ, Kusumoto S, Katus HA, Heine H, TLR4-mediated inflammatory activation of human coronary artery endothelial cells by LPS. *Cardiovasc Res* 2002; 56: 126-134.

7. Danksagung

Herrn Prof. Dr. rer. nat. Rainer Meyer möchte ich für das grosse Interesse an dieser Arbeit danken. Er schuf durch seine ausdauernde und stets freundliche Unterstützung erst die Voraussetzung für die Realisierung dieser Arbeit. Auch seinem Team am Institut für Physiologie in Bonn gebührt Dank für die unkomplizierte Hilfe, neben den Doktoranden möchte ich Frau Bock, Herrn Beck und Herrn Krüger nennen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. med. Georg Baumgarten für die Betreuung dieser Arbeit, seinen grossen Einsatz bei der Durchführung und für die freundliche Überlassung der Thematik. Mit der von ihm ins Leben gerufenen Arbeitsgruppe an der Medizinischen Poliklinik II in Bonn hat er beste Voraussetzungen für die Realisierung dieser Arbeit geschaffen. In diesem Team möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Christian Grohé für sein großes Interesse und Britta Überdieck für die gute Zusammenarbeit danken. Dr. med. Se-Chan Kim möchte ich herzlich für die gute Kooperation bei der Etablierung der teils diffizilen Methode danken. Besonderer Dank gebührt Heidi Stapel, die die Arbeiten am Institut für Physiologie erfolgreich fortführt.

Ferner möchte ich zwei guten Freunden für ihre Hilfe danken: Gerade zu Beginn der Arbeit hat Martin Zörlein mir bei operationstechnischen Fragen und der Erstellung des Manuskripts geholfen. Für seinen Einsatz bei der kritischen und konstruktiven Korrektur dieser Arbeit und die ermutigenden Worte bin ich Georg Daniel Dürr zu tiefem Dank verpflichtet.

Danke, Julia.